ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ ДЛЯ УСТАНОВЛЕНИЯ ДАВНОСТИ НАСТУПЛЕНИЯ СМЕРТИ

ДЕНИСЕНКО А.Г.

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», кафедра судебной медицины

Резюме. Статья посвящена определению давности наступления смерти по изменению функциональной активности лейкоцитов (спонтанный и индуцированный НСТ – тест, фагоцитарное число – ФЧ, фагоцитарный индекс – ФИ. Кровь исследовалась в динамике от 28 умерших: из них от ишемической болезни сердца (ИБС) – 13, от отравления этиловым алкоголем – 9 и от прочих причин смерти – 6.

Цель нашего исследования – изучение динамики функциональной активности нейтрофильных лейкоцитов и разработка математической модели для определения давности наступления смерти (ДНС).

При отравлении этиловым алкоголем показатели спонтанного теста с нитросиним тетразолием (НСТ) были ниже, по сравнению с группой ИБС и имели тенденцию к снижению на протяжении всего изученного периода.

В результате изучения показателей (НСТ-теста и фагоцитоза) установлено статистически значимое снижение среднего значения показателей, что позволяет использовать полученные данные для определения ДНС.

Полученные результаты были подвергнуты математическому моделированию с использованием регрессионной зависимости. В качестве примера созданы математические модели для определения ДНС лиц, умерших от ИБС.

Ключевые слова: давность наступления смерти, тест с нитросиним тетразолием, фагоцитоз.

Abstract. The article clause is devoted to definition of prescription of approach of death on change of functional activity of leukocytes (namely, by spontaneous and induced NBT-test, phagocyte number, phagocytosis index). Blood was investigated in dynamics from 28 died: persous (ischemic heart failure (IHF)-13, poisoning with ethyl alcohol-9 and 6 – of other reasons).

The purpose of our research was studying of dynamics of functional activity of neutrophyls and development of mathematical model for definition of prescription of approach of death. In case of poisoning with ethyl alcohol the parameters of spontaneous NBT-test were lower, in comparison with group of IHF and tended to decrease during all studied period.

As the parameters of NBT-test and phagocytosis it allows to use obtained data for definition ДНС. The obtained data was subjected to mathematical modeling according to repression model/. As an example the model for definition ДНС of the persons who died from IHF was created.

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 210027 г. Витебск, ул. Чкалова, д. 11, кор. 10, кв. 91, т. р. 43-22-97, моб. МТС 811-18-92, - Денисенко А.Г.

Установление ДНС входит в число самых актуальных проблем судебной медицины [1, 2]. Одним из основных направлений в разработке этой проблемы является изучение посмертных процессов, протекающих в органах, тканях и жидкостях трупа с помощью морфологических, биохимических, гистохимических и иммунологических методов [3, 4, 5, 6].

Существенный интерес представляют иммунологические исследования крови в зависимости от времени после наступления смерти [7,8]. При анализе динамики показателей способности Т- и В-лимфоцитов к розеткообразованию в раннем посмертном периоде в зависимости от температуры окружающей среды Костылев В.И. [7] установил, что эта способность лимфоцитов зависит от температуры окружающей среды.

Сафиным Р.Я. [8] изучен количественный состав лейкоцитов, процент живых лейкоцитов, функциональная активность нейтрофилов в крови умерших лабораторных крыс в различные промежутки времени после наступления смерти. Автор нашел, что с увеличением времени, прошедшего с момента наступления смерти, отмечается постепенное снижение общего числа лейкоцитов крови, изменение функциональной активности нейтрофильных лейкоцитов вплоть до полного их исчезновения в трупной крови к 72-м часам посмертного интервала времени. Однако автором не предложено математических моделей и обоснованных методов определения ДНС, на основании динамики иммунологических параметров.

Целью исследования было установление ДНС по изменению в динамике иммунологических показателей крови – функциональной активности нейтрофилов и фагоцитарной активности лейкоцитов.

Методы

Исследовали кровь, взятую из правой половины сердца и бедренной артерии у 28 трупов людей, умерших от ишемической болезни сердца (13), от отравления этиловым алкоголем (9) и от прочих причин смерти (6) (механическая асфиксия, падение с высоты, острая кровопотеря, геморрагический инсульт). Из них мужчин – 21, женщин – 7. Возраст умерших варьировал от 24 до 84 лет. Трупы находились в морге при температуре от 15 до 20°С (осенне-зимний период) и от 20 до 25° (весенне-летний период). На момент забора крови, ДНС умерших была известна: по данным материалов проверки, выездов экспертов на места происшествий, данным вскрытия трупов (ранние трупные явления, термометрия и т.д.) и констатаций смерти бригадой скорой медицинской помощи.

Забор крови осуществляли стерильными шприцами из правой половины сердца и бедренной артерии в объеме по 10 мл. Кровь от трупов людей брали в динамике, начиная от часа до 47 часов. Для того, чтобы полученные данные можно было статистически обработать и создать модели были сформированы

группы с давностью наступления смерти 2-6; 7-11; 12-16; 17-21; 22-26; 27-31; 32-36; 37-41; 42-47 час. Кровь обрабатывали по методике Smithwick E. et all [9] в модификации Шубича М.Г. [10]. К забранной крови (в количестве 10 мл) добавляли 0,1 мл гепарина, который был предварительно разведен в 0,9% растворе хлорида натрия (10 ЕД в 1 мл). Кровь центрифугировали 10-15 мин при 1000 об/мин, затем собирали образовавшуюся пленку, обогащенную нейтрофильными лейкоцитами, в пластиковую пробирку. Лейкоциты разводили физиологическим раствором в 2 раза (до концентрации $5\text{-}6 \times 10^9$ кл/л). Для определения базальной активности в пластиковых пробирках смешивали по 0,05 мл суспензии лейкоцитов, физиологического раствора и 0,1% раствора нитросинего тетразолия, а для определения индуцированной активности по 0,05 мл суспензии лейкоцитов, культуру *S. aureus* ATCC 25923 и 0,1% раствора нитросинего тетразолия. Смесь инкубировали 15 минут при 37^0С, затем 15 минут при комнатной температуре, а затем центрифугировали при 1000 об/мин в течение 3 минут. Надосадочную жидкость удаляли, к осадку добавляли 0,1 мл физиологического раствора. Клетки аккуратно ресуспензировали, затем готовили мазки на предметных стеклах. После высыхания на воздухе мазки фиксировали 96^0 этанолом и окрашивали 0,1% раствором нейтрального красного 10-15 минут. При микроскопии учитывалось количество формазан положительных гранулоцитов (содержащих черные глыбки формазана).

Выделены 2 группы: 1-ая группа – нейтрофилы, не имеющие гранул формазана, и 2-ая группа – наличие в клетках гранул, занимающих различную площадь нейтрофила. Подсчитывали количество клеток, принадлежащих к каждой из двух групп на 200 сегментоядерных нейтрофилов. Спонтанную активность НСТ-теста выражали в процентах [10]. Фагоцитарную активность нейтрофилов определяли в реакции фагоцитоза с *S. aureus* ATCC 25923 с определением фагоцитарного индекса (ФИ) и фагоцитарного числа (ФЧ) [11].

Статистическую обработку данных проводили с помощью электронных таблиц Excel 7. (Microsoft) и Statgraphics 2.1. (Statistical graphics Corp.). С помощью описательной статистики определяли среднее значение показателя, стандартное отклонение (M±ó) [12].

Результаты и обсуждение

В ходе проведенных исследований было выявлено, что после наступления смерти происходит постепенное снижение функциональной активности нейтрофильных лейкоцитов (таблица).

При смерти от ИБС установлено статистически значимое снижение показателей индуцированного НСТ-теста спустя 7-11 час 42±3,36% ($p<0,05$), 12-16 час 36,47±6,37% ($p<0,01$), 17-21 час 31,92±5,85% ($p<0,05$), 22-26 час 27,66±2,41% ($p<0,05$), 27-31 час 23,9±6,56% ($p<0,05$) и через 32-36 час после наступления смерти 22±12,2% ($p<0,05$). При смерти от отравления этиловым алкоголем установлено статистически значимое снижение показателей индуцированного НСТ-теста ($p<0,001$) спустя 12-16 час 30,76±2,24%, 17-21 час 26,38±2,25% и через 22-26 час после наступления смерти 22,45±1,91%. Менее достоверное снижение показателей индуцированного НСТ-теста при смерти от отравления этиловым алкоголем установлено спустя 7-11 час 35,87±2,41

(p<0,01), 27-31 час 20±2,73% (p<0,05), 32-36 час 15,12±4,61% (p<0,05) и через 42-47 час после наступления смерти 8±1,82% (p<0,05). При прочих причинах смерти статистически значимое снижение показателей индуцированного НСТ-теста отмечалось спустя 12-16 час 30,85±5,33% (p<0,01), через 32-36 час 14,4±3,2% (p<0,01) и 37-41 час после наступления смерти 7,66±1,15% (p<0,05).

Таблица

Показатели функциональной активности фагоцитов трупной крови в зависимости от причины и давности наступления смерти

Показатель	Время, прошедшее с момента наступления смерти (часы)								
	2-6	7-11	12-16	17-21	22-26	27-31	32-36	37-41	42-47
индуцированный НСТ-тест, ИБС, % (n=13)	47,11±5,1	42±3,36**	36,47±6,37**	31,92±5,85*	27,66±2,41*	23,9±6,56*	22±12,2*	13,8±11,21	
спонтанный НСТ-тест, ИБС, % (n=13)	7,93±0,57	6,86±1,1**	4,64±1,15***	3,37±0,2***	2,4±0,24***	1,87±0,45***	1,26±0,47**	0,53±0,15*	
индуцированный НСТ-тест, ОЭА, % (n=9)	40,44±3,16	35,87±2,41**	30,76±2,24***	26,38±2,25***	22,45±1,91***	20±2,73*	15,12±4,61*	13,6±2,3	8±1,82**
спонтанный НСТ-тест, ОЭА, % (n=9)	4,41±0,32	4,01±0,18**	3,28±0,17***	2,51±0,25***	1,66±0,2***	1,42±0,27*	0,91±0,28**	0,46±0,2*	0,17±0,09*
спонтанный НСТ-тест, ППС, % (n=6)	6,47±2,4	5,85±1,91	3,21±0,57**	2,76±0,66	1,95±0,58*	1,48±0,44**	1±0,25	0,3±0,1*	
индуцированный НСТ-тест, ППС, % (n=6)	51,75±8,42	42,57±6,6	30,85±5,33**	28±5,1	23,33±6,04	20,57±2,87	14,4±3,2**	7,66±1,15*	
ФИ, ИБС,% (n=13)	68,7±4	61,89±3,63***	51,57±3,76***	46,12±2,87***	39,35±2,5***	34,33±4,24***	30,16±3,18*	23±3,74**	
ФЧ, ИБС,% (n=13)	8,02±0,62	7,41±0,6**	6,51±0,61***	5,85±0,92*	5,14±1,13*	5,10±0,9	4,33±2,31	4,7±1,26	
ФИ, ОЭА, % (n=9)	66,11±3,14	63,5±3,33	52,84±5,67***	42,38±1,12***	40,18±9	37,33±7,03	31±9	20±3,4*	13,25±6,13
ФЧ, ОЭА, % (n=9)	6,16±0,22	5,45±0,39***	4,5±0,17***	3,96±0,21***	3,29±0,24***	3,04±0,43	2,13±0,37***	1,66±0,24*	0,9±0,25
ФИ, ППС, % (n=6)	68,5±1,29	63±4,24*	50,85±5,2***	47,6±6,18	38,66±8,57*	37,85±5,43	25,2±5,8**	20,66±6,11	
ФЧ, ППС, % (n=6)	7,05±0,87	6,51±1,13	4,48±0,49***	4,39±1,22	3,64±1,45	3,71±1,15	2,22±0,58*	1,52±0,46*	

Примечание: * – p< 0,05, ** – p<0,01, *** – p<0,001, отсутствие звездочки p>0,05 – различие не достоверно.

При ИБС выявлено статистически значимое снижение показателей спонтанного НСТ - теста спустя 12-16 час после наступления смерти 4,64±1,15% (p<0,001), 17-21 час 3,37±0,2% (p<0,001), 22-26 час 2,4±0,24% (p<0,001), 27-31 час 1,87±0,45% (p<0,001), 7-11 час 6,86±1,1% (p<0,01), 32-36 час 1,26±0,47% (p<0,01) и через 37-41 час 0,53±0,15% (p<0,05). При отравлении

этиловым алкоголем наблюдается статистически значимое снижение показателей спонтанного НСТ-теста в интервалах времени: 12-16 час 3,28±0,17% (p<0,001), 17-21 час 2,51±0,25% (p<0,001), 22-26 час 1,66±0,2% (p<0,001), 7-11 час 4,01±0,18 (p<0,01), 27-31 час 1,42±0,27% (p<0,05), 32-36 час 0,91±0,28% (p<0,01), 37-41 час 0,46±0,2% (p<0,05) и через 42-47 час после наступления смерти 0,17±0,09% (p<0,05). При прочих причинах смерти выявлено статистически значимое снижение показателей спонтанного НСТ-теста через 12-16 час 3,21±0,57% (p<0,01), 22-26 час 1,95±0,58% (p<0,05) и спустя 37-41 час 0,3±0,1% (p<0,05).

При ИБС установлено статистически значимое снижение ФИ в интервалах времени: 7-11 час 61,89±3,63% (p<0,001), 12-16 час 51,57±3,76% (p<0,001), 17-21 час 46,12±2,87 (p<0,001), 22-26 час 39,35±2,5 (p<0,001), 27-31 час 34,33±4,24 (p<0,001), 32-36 час 30,16±3,18 (p<0,05) и спустя 37-41 час после наступления смерти 23±3,74 (p<0,01). При отравлении этиловым спиртом статистически значимое снижение ФИ установлено спустя 12-16 час 52,84±5,67% (p<0,001), 17-31 час 42,38±12% (p<0,001) и спустя 37-41 час после наступления смерти 20±3,4% (p<0,05). При прочих причинах смерти статистически значимое снижение ФИ установлено спустя 12-16 час 50,85±5,2% (p<0,001), 7-11 час 63±4,24% (p<0,05), 22-26 час 38,66±8,57% (p<0,05) и через 32-36 час после наступления смерти 25,2±5,8% (p<0,01).

При изучении активности ФЧ крови трупов людей, умерших от ИБС отмечалось статистически значимое снижение спустя 12-16 час 6,51±0,61% (p<0,001), 7-11 час 7,41±0,6% (p<0,01), 17-21 час 5,85±0,92% (p<0,05) и через 22-26 час после наступления смерти 5,14±1,13% (p<0,05). В крови людей, умерших от отравления этиловым алкоголем, выявлено статистически значимое снижение ФЧ в интервалах времени от 7-11 час 5,45±0,39% (p<0,001), 12-16 час 4,5±0,17% (p<0,001) до 32-36 час 2,13±0,37% (p<0,01) и 37-41 час после наступления смерти 1,66±0,24% (p<0,05). При прочих причинах смерти статистически значимое снижение показателей активности ФЧ выявлено через 12-16 час 4,48±0,49% (p<0,001), 32-36 час 2,22±0,58% (p<0,05) и спустя 37-41 час после наступления смерти (p<0,05).

При отравлении этиловым алкоголем по сравнению с группой ИБС через 7-11 часов после наступления смерти начинается статистически значимое снижение спонтанного НСТ–теста от 4,01±0,18 (p<0,001) до 0,17±0,09 спустя 42-47 час (p<0,05).

Анализируя данные, полученные в результате анализа, в зависимости от времени наступления смерти различных групп (ИБС, отравления этиловым алкоголем и прочих причин смерти) отмечена общая статистически значимая тенденция к снижению показателей, что привело нас к созданию математической модели, отражающей зависимость ДНС от иммунологических показателей.

Регрессионный анализ данных и подбор математической модели проводили с помощью программы Statgraphics 2.1.

В результате получили уравнение (1), по которому, зная показатели НСТ-теста, определяем срок ДНС.

$t = 50{,}54 – 16{,}65 * \sqrt{a}$, (1)

где t – ДНС; a – показатель спонтанного НСТ-теста.

Построение осуществляли в простой регрессионной зависимости, модель (Square root – X) m. Коэффициент корреляции = -0,9947; p<0,001 (Рисунок 1).

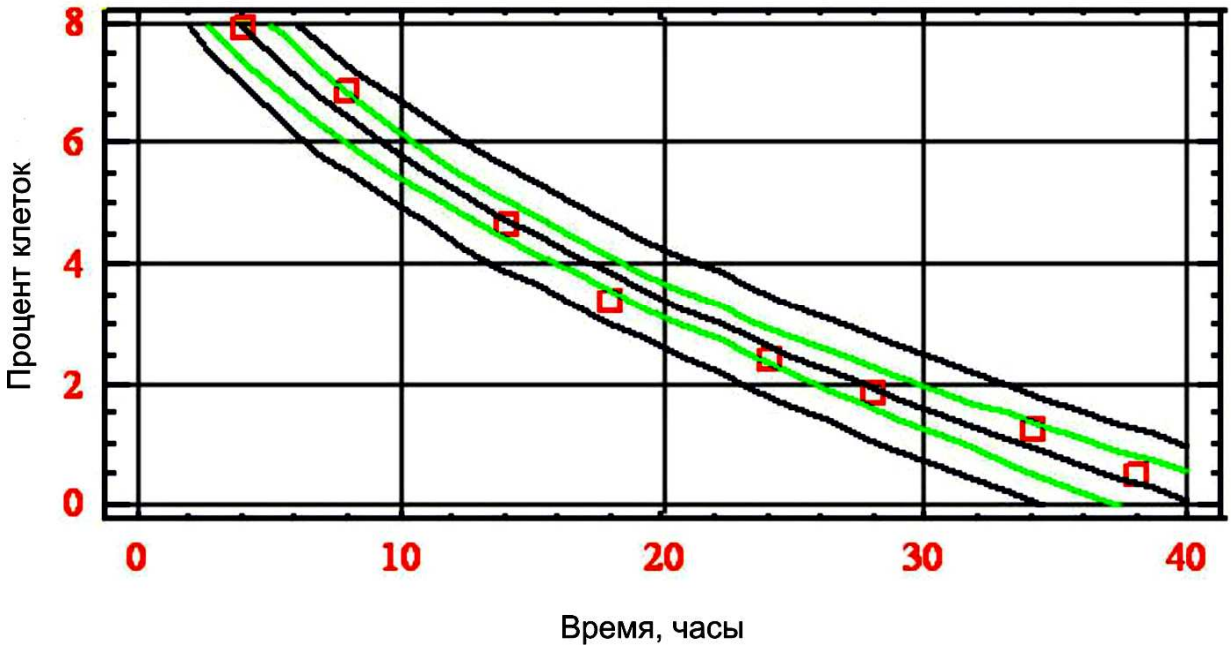

Рис. 1. Регрессионная модель зависимости времени наступления смерти (лиц умерших от ИБС) от показателей спонтанного НСТ-теста (Square root – X) m.

Примечание: по оси X – среднее время наступления смерти, по оси Y – √ a показателя спонтанного НСТ-теста.

Приводим в качестве примера использование предложенного нами метода. Мужчина возрастом 40 лет, умер от ишемической болезни сердца. Кровь исследована через 11 ч после наступления смерти. В крови определяют спонтанный НСТ тест, который составил 6,4%. Используя график и показатель НСТ-теста, определяем, что с момента наступления смерти прошло 8,4 часов.

Аналогично рассчитывали математическую модель для показателей ФИ (2). Получаем формулу: $t = 54{,}97 – 0{,}76 * b$,

где t – ДНС; b - показатель фагоцитарного индекса.

Построение осуществляется в линейной регрессионной зависимости. Коэффициент корреляции = -0,9932; p p<0,001 (Рисунок 2).

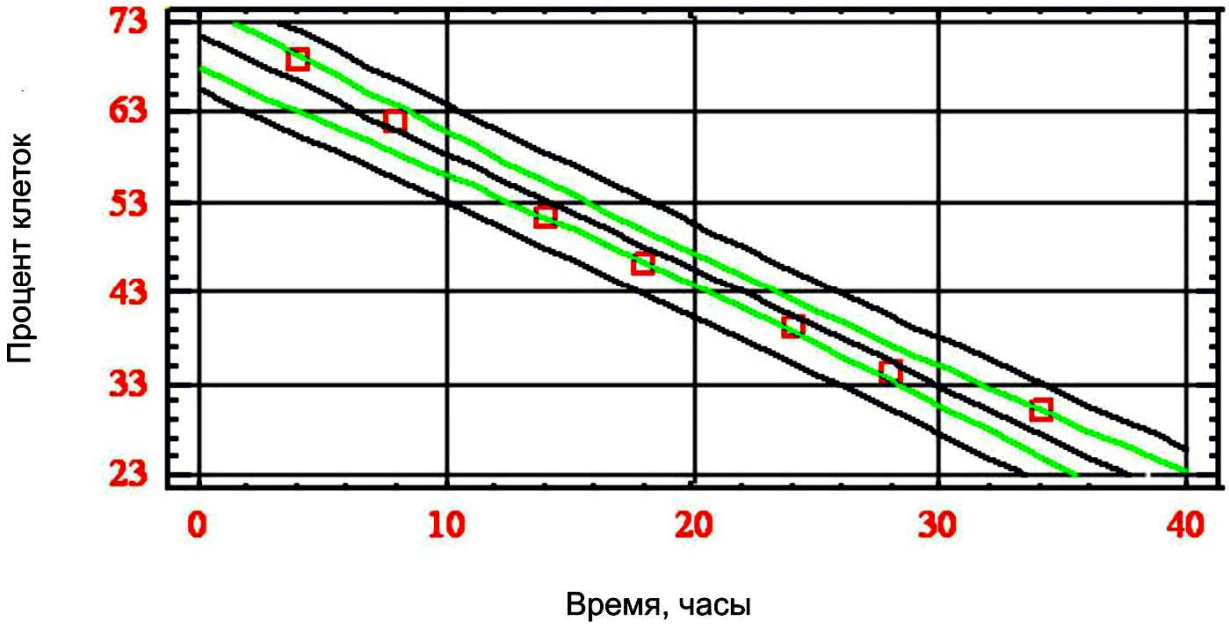

Рис. 2. Регрессионная модель зависимости времени наступления смерти (лиц умерших от ИБС) от показателей фагоцитарного индекса.

Примечание: по оси X – среднее время наступления смерти, по оси Y – средние показатели данных фагоцитарного индекса.

Приводим в качестве примера. Тот же мужчина, 40 лет, умерший от ишемической болезни сердца. Исследуется кровь через 11 ч после наступления смерти. Исследованием определяют фагоцитарный индекс, который составляет 58%. Используя график по показателю фагоцитарного индекса, находим, что с момента наступления смерти прошло 10,9 часов.

Таким образом, представленные математические модели позволяют определять ДНС.

Заключение

1. В результате изучения иммунных показателей крови (НСТ-теста и фагоцитоза) установлено статистически значимое снижение их среднего значения во все группах (ишемическая болезнь сердца, отравление этиловым алкоголем, прочие причины смерти), что соответствует литературным данным и позволяет их использовать в судебно-медицинской практике для определения давности наступления смерти.

2. В результате нами предложены математические модели определения давности наступления смерти в простом регрессионном анализе по показателям спонтанного НСТ-теста и фагоцитарному индексу для лиц, умерших от ишемической болезни сердца, и которые отвечают современным потребностям судебно-медицинской практики.

Литература

1. Ботезату, Г.А. Экспертиза давности смерти по данным ректальной температуры / Г.А. Ботезату // Современная диагностика в судебной медицине. — Кишинев, 1981. — с. 6–22.

2. Казарновская, М.Л. Репродукция лимфоцитов трупной крови /М.Л. Казарновская – Кишинев, 1983.-С. 37-41.

3. Dokgoz, H. Comparison of morphological changes in white blood cells after death and in vitro storage of blood for the estimation of postmortem interval/ H. Dokgoz, N. Arican [et al.]// Forensic Science Int. – 2001. – Vol.7, №1. – P.25-31.

4. Mohammed, M.A. Blood Changes as a Possible Tool for Estimation of the postmortem Interval/ M.A. Mohammed// Thesis, faculty of medicine. Cairo University, - 2004. – P. 43-44.

5. Swift, B. The Timing of Death. Ed. Rutty GN. /B. Swift//Essentials of Autopsy Practice. London. - 2006. – P. 189-214.

6. Мельников, Ю.Л. Определение давности наступления смерти по комплексу биофизических показателей / Ю.Л. Мельников, К.Н. Алыбаева// Суд. мед. эксперт. – 2001. -№1. –С. 3-7.

7. Костылев, В.И. Влияние температуры окружающей среды на динамику некоторых иммунных показателе крови в посмертном периоде / В.И. Костылев// Суд. мед. эксперт. – 1986. -№1. -С. 15-16.

8. Сафин, Р.Я. Применение иммунологических методов исследования трупной крови для определения давности наступления смерти / Р.Я. Сафин // Естествознание и гуманизм: сб. науч. трудов под ред. проф. Н.Н. Ильинских - Томск, 2006. – Т.3, №2. –- С. 94-95.

9. Smithwick E. / E. Smithwick, S.M. Fikrig [et al.]// - Lancet. J bid. - 1968.- Vol.2.- P 532-534.

10. Шубич, М.Г. НСТ-тест у детей в норме и при гнойно-бактериальных инфекциях /М.Г. Шубич// Лаб. дело. - 1978. - №9. - С. 515-518.

11. Новиков, Д.К. Клеточные методы иммунодиагностики/Д.К. Новиков, В.И. Новикова. – Минск: Беларусь, 1979.-169с.

12. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М.: Медиа Сфера, 2006. С. 9-312.