



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«РОССИЙСКИЙ ЦЕНТР СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ»

*Богомолов Д.В., Федулова М.В., Куприянов Д.Д., Киреева Е.А.,
Збруева Ю.В.*

**СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКАЯ ДИАГНОСТИКА ПРИЖИЗНЕННОСТИ
И ДАВНОСТИ ПОВРЕЖДЕНИЙ МЯГКИХ ТКАНЕЙ
ГИСТОЛОГИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ
(второе издание)**

Методические рекомендации

Москва
2021



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«РОССИЙСКИЙ ЦЕНТР СУДЕБНО - МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ»
(125284, г. Москва, ул. Поликарпова, д. 12/13)**

Утверждаю»

**И.о. директора ФГБУ «РЦСМЭ»
Минздрава России,
Главный внештатный специалист
по судебно-медицинской экспертизе
Минздрава России
доктор медицинских наук, профессор**

И.Ю. Макаров

«05» октября 2021 г.

Богомолов Д.В., Федулова М.В., Куприянов Д.Д., Кирсева Е.А., Збруева Ю.В.

**СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКАЯ ДИАГНОСТИКА ПРИЖИЗНЕННОСТИ
И ДАВНОСТИ ПОВРЕЖДЕНИЙ МЯГКИХ ТКАНЕЙ
ГИСТОЛОГИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ
(второе издание)**

Методические рекомендации

**Москва
2021**

УДК: 340.6
ББК: 58

Авторы:

БОГОМОЛОВ ДМИТРИЙ ВАЛЕРЬЕВИЧ – главный научный сотрудник лаборатории морфологических исследований отдела морфологических судебно-медицинских экспертиз ФГБУ «Российский центр судебно-медицинских экспертиз» Минздрава России, доктор медицинских наук

ФЕДУЛОВА МАРИЯ ВАДИМОВНА – заведующая отделом морфологических судебно-медицинских экспертиз ФГБУ «Российский центр судебно-медицинских экспертиз» Минздрава России, доктор медицинских наук

КУПРИЯНОВ ДМИТРИЙ ДМИТРИЕВИЧ – заведующий отделением судебно-гистологических экспертиз отдела морфологических судебно-медицинских экспертиз ФГБУ «Российский центр судебно-медицинских экспертиз» Минздрава России

КИРЕЕВА ЕЛЕНА АНДРЕЕВНА – заведующая судебно-гистологическим отделением ФГКУ «111 Центр судебно-медицинских и криминалистических экспертиз» Министерства обороны Российской Федерации

ЗБРУЕВА ЮЛИЯ ВЛАДИМИРОВНА – доцент кафедры судебной медицины ФГБУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, кандидат медицинских наук

Аннотация

Методические рекомендации предназначены для судебно-медицинских экспертов при проведении исследований трупов в случаях обнаружения повреждений, а также может использоваться в учебном процессе при подготовке ординаторов и аспирантов. Описаны гистоморфологические критерии, позволяющие устанавливать давность повреждения мягких тканей, и приведены принципы их оценки и данные о факторах, изменяющих реактивность организма. Использование этих данных позволяет унифицировать процесс изъятия биологического материала для судебно-гистологического исследования, изготовления гистологических препаратов и их анализа, рационально использовать новейшие научные разработки, гарантировать максимальную объективность результатов, достижимую на современном уровне развития науки, и документировать результаты судебно-гистологических исследований. В отличие от первого издания 2010 года в настоящем представлены новые данные по иммуногистохимической характеристике прижизненности некоторых повреждений мягких тканей.

Рецензент:

Кильдюшов Евгений Михайлович – заведующий кафедрой судебной медицины лечебного факультета Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, доктор медицинских наук, профессор

Рекомендовано к изданию Ученым советом ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России (протокол № 3 от 5 октября 2021 г.).

ISBN: 978-5-9631-0920-5

ВВЕДЕНИЕ

Установление давности повреждений – одна из основных задач судебной медицины. В РФ она на практике решается практически исключительно на базе судебно-гистологического исследования образцов поврежденных тканей и органов, иногда с привлечением морфометрических и гистохимических методик. Поэтому научных работ по данной теме проведено очень много, но результаты, полученные разными авторами, совершенно не совпадают даже в случаях исследования одних и тех же признаков и одних и тех же повреждений. По мере роста количества публикаций растет и количество противоречий, и в последнее время использовать литературные данные в судебно-медицинской практике стало практически невозможно. Настоятельная практическая потребность в решении вопроса заставляет проанализировать причины создавшегося положения и найти пути выхода из кризиса. Поэтому в основу представляемых методических рекомендаций положены не только результаты собственных исследований, но и результаты метаанализа всех литературных данных по давности травмы – 288 источников, из них 245 отечественных и 43 зарубежных.

Ни один из исследователей не решил главную задачу – преодоление субъективности в исследованиях. Она связана прежде всего с различными объектами исследования (разные виды повреждений, разный фон и т.д.). Помимо этого, как исследователь, разрабатывающий новый метод, так и эксперт, применяющий его, описывают препараты субъективно, поскольку нет единых требований в отношении того, какие признаки надо фиксировать, какие изменения следует расценивать как определенный признак (например, что считать «муфтой», «валом», «уменьшением количества лейкоцитов») и при каких изменениях размеров и количества исследуемых элементов следует констатировать их уменьшение или увеличение. Так, «валом» одни считают любые скопления лейкоцитов на границе повреждения, другие – только непрерывные. Одни, увидев один-два полнокровных сосуда, расценивают это как полнокровие, другие – нет, и т.д. Количественный подход помог бы преодолеть это противоречие. Далее, многие различия реактивных процессов в разные сроки имеют количественный, а не качественный характер, и поэтому должны оцениваться количественными, а не качественными методами.

Еще один источник субъективности задается в процессе разработки методов и состоит в том, что весь материал искусственно разбивают на несколько временных интервалов (чисто условных, не имеющих никакого биологического смысла и различных для разных исследователей) и сравнивают их между собой, доказывая, что они различаются. Такой

способ обработки данных пригоден лишь для установления принципиальной возможности использования метода, но не для его внедрения в практику, поскольку он неизбежно даст ошибки в случаях, приходящихся на границу между двумя интервалами. Кроме того, если описывать случаи, относящиеся к одному периоду, вместе, это лишает исследователей возможности заметить различия внутри выбранных ими интервалов.

Поэтому для дифференциальной диагностики взаимоисключающих состояний (например, прижизненности и посмертности повреждений) оптимальным является дискриминантный анализ, позволяющий оценивать вероятность ошибки в каждой экспертизе. Для величин же, которые по своей природе не являются дискретными (давность травмы), целесообразнее всего использовать корреляционный и регрессионный анализ. Однако для этого также необходим количественный подход к регистрации всех признаков.

Тонкие иммуногистохимические методы, позволяющие безошибочно определять принадлежность даже единичных клеток (А. К. Панченко, 2000), показали, что практически все формы клеточных реакций начинаются уже через 1 час после травмы. В этот период на границе зоны повреждения или периваскулярно можно обнаружить не только нейтрофильные лейкоциты, но также макрофаги, лимфоциты и фибробласты, хотя последние три типа клеток еще единичны и малодифференцированы (например, макрофаги еще имеют форму моноцитов, а лимфоциты не активированы). Наиболее выдающиеся гистологи прошлого (Л.И. Громов, Н.А. Митяева, 1958) при обычной световой микроскопии иногда наблюдали эти клетки при травмах давностью не более 2 часов. Таким образом, срок обнаружения клеточных реакций разных типов зависит не только от давности травмы, но и от квалификации гистолога, и, кроме этого, от качества взятия материала и изготовления препарата, а также от возможности применения иммуногистохимических методов. Переход на количественные характеристики клеточных реакций повышает объективность исследования, но не решает ее в полной мере, поскольку для подсчета количества клеточных элементов необходимо определить их принадлежность, а точность этого определения зависит от тех же факторов – квалификации гистолога, танатолога и лаборантов и технической оснащенности лаборатории. Проблему можно решить только сочетанием количественного подхода с современными методами исследования, прежде всего иммуногистохимическими. В патологической анатомии такие методы давно уже стали рутинными и внедрены во всех крупных лабораториях, однако в судебной медицине внедрение новых разработок в практику идет крайне медленно и почти все судебно-медицинские учреждения предпочитают или

вынуждены пользоваться устаревшими методическими подходами, но желают использовать их возможности максимально. Для этого необходима унифицированная схема применения общепринятых показателей давности травмы, обобщающая многочисленные литературные данные и проверенная в ходе экспертной практики.

В отношении прижизненности травмы возможно выявлять более ранние маркеры, чем отек и кровоизлияния, но для них облигатным является иммуногистохимический метод.

Именно на такой подход и рассчитаны данные рекомендации.

Признаки, на которых они основаны, в отличие от предлагавшихся ранее, стандартизированы и детализованы, их перечень максимально полон, и приводятся сведения не только по типичным срокам появления, но также по возможным нетипичным срокам появления и срокам исчезновения. При этом авторы отказались от использования понятий «максимальная выраженность», «уменьшается» и т.п., поскольку в экспертной практике приходится иметь дело с материалом, взятым одномоментно, и проследить его изменения в динамике невозможно.

Таблица включает не только собственные данные авторов, но и все описанные в достоверных источниках сроки обнаружения или отсутствия перечисленных признаков, поэтому она пригодна для оценки любых повреждений, в том числе при измененной реактивности организма. Предлагаемая методика включает гистологические аспекты установления давности и прижизненности повреждений исключительно мягких тканей, при этом не затрагивает черепно-мозговую травму. Особое внимание обращено на правильное изъятие материала для гистологического исследования, подробно изложена методика его проведения, выявления диагностических признаков и их оценки. Не секрет, что динамика реактивных процессов зависит от вида повреждений, в этой связи особняком стоят огнестрельные повреждения, а также исследование странгуляционной борозды при механической асфиксии. Для решения задачи диагностики давности и прижизненности огнестрельных повреждений мягких тканей и прижизненности странгуляционной борозды гистологическими методами целесообразно применять методы иммуногистохимического и морфометрического исследования. Некоторые их результаты будут также представлены в данных рекомендациях.

Практические учреждения, в которых рекомендуется осуществить реализацию данных методических рекомендаций – ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России и бюро судебно-медицинской экспертизы Российской Федерации; кроме этого рекомендации могут использоваться в учебном процессе при подготовке ординаторов и аспирантов.

МАТЕРИАЛЬНО-ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ МЕТОДА

Метод классической гистологической диагностики прижизненности и давности механических повреждений мягких тканей, в том числе при огнестрельной травме и прижизненности странгуляционной асфиксии не требует специального материально-технического обеспечения, так как необходимые признаки изучают на стандартных гистологических препаратах. Для решения этой задачи необходимо иметь в наличии классический набор реактивов и оборудования, используемых в каждодневной практической работе гистологов. В качестве красителя используют гематоксилин и эозин, а также окраска по Ван-Гизону, Шпильмайеру, толуидиновым синим.

Для проведения иммуногистохимического исследования кроме штатного оснащения необходимо иметь иммуногистостейнер и реагенты для ИГХ исследования – антитела к фибриногену, фибронектину, цитокератинам, CD-117, саркомерному актину, гладкомышечному актину, виментину, а также CD-панель для выявления элементов клеточной реакции.

ОПИСАНИЕ МЕТОДА

Взятие трупного материала на исследование и приготовление препаратов

Реакция организма на травму не отличается равномерностью, поэтому, чем больше материала представлено, тем точнее оценка. Обязательно должны быть изучены все слои поврежденных тканей, а также центральная зона повреждения (центр области некроза или кровоизлияния, стенка раневого канала) и ткани на границе повреждения – от границы зоны некроза или кровоизлияния до интактных тканей, не вовлеченных в реактивные процессы. Кроме того, при любом, даже поверхностном, повреждении кожи необходимо изучить более глубокие слои – ведь на травму раньше всего реагируют артерии, в частности, по нашим данным, диапедез нейтрофилов наиболее рано, интенсивно и долго происходит именно через этот тип сосудов. Так как артерии кожи ведут начало от крупных магистральных сосудов, скрытых в глубине, поэтому их ветви, кровоснабжающие поврежденный участок и реагирующие на травму, находятся не вокруг зоны повреждения, а под ней. Соответственно при травме внутреннего органа надо исследовать его ткань, прилегающую к зоне травмы и реактивных изменений со стороны кровоснабжающих их артерий. Если эти же ткани нужны также для иных исследований, например, медико-криминалистического характера, следует сначала провести исследования, не разрушающие ткани, документируя результаты

фотографиями, затем передать материал в судебно-гистологическую лабораторию и после вырезки отдать остатки в спектральную и прочие лаборатории для исследований, разрушающих ткани.

С момента смерти в тканях начинаются процессы аутолиза – посмертного разрушения структур всех видов и уровней, приводящего к потере информации при гистологическом исследовании. Заметным этот процесс становится лишь спустя несколько часов при высокой температуре окружающей среды и через сутки – при низкой. Чтобы его остановить, кусочки органов и тканей помещают в фиксирующую жидкость – раствор формалина, который должен быть 10% нейтральным во избежание образования формалинового пигмента, который может исказить гистологическую картину. Для дальнейшего проведения иммуногистохимического метода качество формалина имеет особое значение, при этом время фиксации материала не должно превышать 48 часов. Фрагменты, направляемые на исследование, должны быть не более 1 см в толщину для удовлетворительного проведения фиксации; площадь фрагмента должна быть не менее 2 см², так как широкие срезы обладают большей информативностью, тем более что длина и ширина фрагмента при соблюдении указанной выше толщины никак не влияют на качество фиксации. Фиксация, а также дальнейшая проводка и заливка в парафин материала осуществляется согласно общепринятым методикам.

Давность травмы оценивают по проявлениям общепатологических процессов реакции организма на травму – некроза, нарушений кровообращения, воспаления и регенерации. Эти процессы не являются специфичными только для травмы и наблюдаются также при ряде патологических процессов. Кроме того, частым источником ошибок служит повторная травматизация одной и той же области. Чтобы исключить наличие в ткани реактивных процессов, развившихся до исследуемой травмы, необходимо, помимо пораженного участка, брать контрольный – неповрежденный участок той же ткани, расположенный симметрично (при травме правой височной области взять также образцы кожи и мозга с оболочками из левой височной области) или просто вне зоны повреждения.

Реакция организма на повреждение не сводится к местным изменениям, поэтому желательно взять также лимфоузлы, региональный по отношению к зоне травмы, а также полный набор внутренних органов:

- головного мозга (коры из переднецентральной извилины, подкорковых ядер из области бледного шара, поперечный срез продолговатого мозга выше оливы);

- миокарда (левого желудочка и межжелудочковой перегородки);
- легких (из нижней доли и прикорневого отдела вне зоны гипостаза);
- правой доли печени (на отдалении от ворот и капсулы);
- почки (содержащий кору, пирамиды и стенку чашечки);
- надпочечника (с захватом всех слоев органа)
- гипофиза целиком.

При наличии жидкого содержимого внутричерепных гематом и прочих жидких сред из них делают мазок – наносят каплю на предметное стекло и другим предметным стеклом размазывают одним движением с постепенным отдалением стекол друг от друга, чтобы добиться тонкого мазка. Окраска мазков может быть произведена гематоксилином и эозином вместе с гистопрепаратами.

Особое внимание необходимо проявлять при дорезке кусочков и заливке препаратов. Необходима правильная ориентация фрагмента для получения гистологического препарата, включающего зону повреждения, интактную ткань и ткань между ними, а для субдуральных гематом – содержимое и все слои обеих листков капсулы гематомы как с дуральной, так и с арахноидальной стороны.

Для выявления липофагии необходима дополнительная окраска на жир (например, суданом), гемосидерина – реакция Перлса.

Результаты судебно-гистологических исследований следует документировать микрофотографиями, демонстрирующими те признаки, которые соответствуют наибольшей давности травмы или малозаметны (например, единственный на весь препарат сосуд с диапедезом лейкоцитов, единичные сидерофаги).

Проведение исследования и оценка полученных результатов

Начинать установление давности травмы следует с оценки реактивности организма пострадавшего и состояния поврежденных тканей до исследуемого повреждения.

Конечно, выразить реактивность организма точной величиной и столь же точно установить ее влияние на гистологические параметры, характеризующие давность травмы, на современном уровне развития науки невозможно. Но даже сделать это ориентировочно лучше, чем не пытаться сделать вообще. По возможности учитывать надо следующее.

1. Особенности социального положения и физические состояния, снижающие реактивность организма, замедляющие все реакции и снижающие их интенсивность,

диагностируемые по материалам дела или у секционного стола: истощение (как алиментарного, так и любого иного генеза), отсутствие постоянного места жительства и работы, шизофрения, хроническая алкогольная интоксикация, общее переохлаждение как причина смерти, сахарный диабет и другие эндокринные расстройства, любое хроническое заболевание с поражением жизненно важных органов в стадии декомпенсации, старческий возраст. При тяжелой, особенно смертельной травме (тяжелая черепно-мозговая травма, сочетанные повреждения, шок, массивная кровопотеря), заживление всех повреждений также происходит значительно медленнее. При коме, вызванной черепно-мозговой травмой, некоторые реакции на черепно-мозговую травму отсутствуют даже через 24-48 ч (Пушаков С.М., 1993).

2. Физические состояния, снижающие реактивность, замедляющие все реакции и снижающие их интенсивность, диагностируемые при лабораторных исследованиях: тяжелые отравления и иммунодефициты. Их диагностика, соответственно, возможна только в случае забора и направления материала на эти исследования.

При травмах на фоне алкогольной интоксикации тяжелой степени клеточные реакции и даже гемолиз эритроцитов кровоизлияния, могут запаздывать в 2 раза и более.

Иммунодефициты диагностируются при исследовании мазка крови (ее общий анализ и иммунограмма), органов иммуногенеза (тимус, селезенка, лимфоузлы) и кроветворения (костный мозг из ребра, грудины и бедренной кости). Чем более полный набор этих исследований проведен, тем точнее учет реактивности организма.

3. Физические состояния, ускоряющие и/или усиливающие все реакции и заживление повреждения.

Прежде всего это детский возраст. Например, Т. К. Осипенкова (2000) приводит данные, согласно которым у детей переломы срастаются в два раза быстрее (за 1,5-2 мес.), чем у людей 50-60 лет (за 3-4 мес.) и в 1,5 раза, чем у людей 20-30 летнего возраста.

Выраженный лейкоцитоз в крови, вызванный развитием острого или обострением хронического гнойного процесса, в том числе не связанного с травмой, приводит к усилению клеточных реакций. Так, в одном нашем наблюдении при давности травмы 30 мин наблюдалось большое количество нейтрофилов на границе кровоизлияния (26 в одном поле зрения при увеличении $\times 400$), что объяснялось наличием у пострадавшего обострения хронического гнойного бронхита с выраженным лейкоцитозом в крови (лейкоциты 28,7 при норме 4,0-9,0 $\times 10^9$).

4. Особенности исследуемого повреждения.

В операционных ранах, причиненных в асептических условиях, обнаруживают гораздо менее выраженная лейкоцитарная реакция, чем в ранах такой же давности, но полученных в бытовой обстановке. Периваскулярные кровоизлияния, лейкоцитарные инфильтраты, макрофагальная и фибробластическая реакции более резко выражены при нанесении повреждений тупыми предметами, чем острыми. Авторы, исследовавшие ссадины, ушибленные раны, черепно-мозговую травму и повреждения внутренних органов, указывают более поздние сроки начала лейкоцитарной реакции, чем при кровоизлияниях и переломах костей.

К этим же особенностям относятся огнестрельные повреждения. Показано, что лейкоцитарная реакция в зоне молекулярного сотрясения отмечается с опозданием в сравнении с колото-резаными повреждениями.

Большой объем повреждения обуславливает повышенную концентрацию медиаторов воспаления, что приводит к ускорению некротических процессов и, в частности, гемолиза, а также усиливает диapedез клеток белой крови. Но увеличение объема повреждения приводит к замедлению очищения очага от некротизированных тканей, что, в свою очередь, замедляет начало процессов организации в виде пролиферации фибробластов.

Для динамики заживления ран и сращения переломов важен их тип (для ран – под струпом, первичным или вторичным натяжением и т.д.). Еще один фактор, влияющий на динамику заживления, – это и степень смещения костных отломков, протяженность отслоения надкостницы, степень повреждения ее и ее сосудов. Для плоских и губчатых костей степень сближения отломков – основной фактор, определяющий исход (Осипенкова Т. К., 2000).

Осложнения, начиная от банального нагноения гематомы и кончая формированием ложного сустава, также препятствуют своевременному заживлению.

Большинство исследователей отмечает различную динамику реактивных процессов при разной локализации. Например, В.С. Громов, Н.И. Неволин (1989) приводят сводную таблицу сроков формирования костной мозоли, которые весьма различны для разных костей.

Т. К. Осипенкова (2000) включает в число местных факторов, влияющих на регенерацию костной ткани в исходе переломов, нарушение кровоснабжения отломков и их иннервации. Однако этот фактор замедляет и заживление иных повреждений.

5. На динамику заживления влияют также наличие и характер оказания медицинской помощи, в частности, кровераспределение и микрогемоциркуляция изменяются под влиянием инфузионной терапии (Индиаминов С., 1987), сроки заживления переломов зависят от конструкции применяемых фиксаторов (Осипенкова Т. К., 2000). Проведение оперативных вмешательств является повторной травматизацией тканей и запускает новую волну всех реактивных процессов.

6. Еще один важный аспект учета реактивности организма – это сравнение всех исследуемых повреждений. Вот почему при множественных травмах надо брать на исследование ткани не только из области смертельного повреждения, но и из прочих областей – они несут информацию о реактивности. Если хотя бы на одно повреждение какая-либо реакция выражена, то объяснять ее малую выраженность при других повреждениях снижением реактивности нельзя.

Далее, следует описать образцы тканей из мест повреждений и оценить результаты в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1. Сводные данные гистологических признаков давности травмы мягких тканей (кроме огнестрельных повреждений).

Параметр	Раннее появление	Типичное появление	Позднее появление	Исчезновение
Сосудистые реакции				
спазм артерий (отсутствие или малое количество в них эритроцитов, сужение просвета и его фестончатые очертания)	до травмы, например, при местном действии холода	первые минуты	при коме, вызванной черепно-мозговой травмой, через 24-48 ч	
полнокровие артерий (заполнение просвета кровью более чем наполовину у 50% и более артерий, имеющих в препарате)	5-10 мин	30-40 минут	1 час	8 сут
полнокровие вен (аналогично)	5-10 мин	в пределах 2 часов после травмы		до 11 суток
полнокровие капилляров	5-10 мин	до 1 часа		до 16 суток

Экссудация				
отек соединительной или нервной ткани по периферии зоны травмы	1 час	ярко выражен через 3 ч		через 24 часа при кровоподтеках
выпадение фибрина в виде сети	через 10 мин	с 1-го часа	13-24 часов	с 15 суток
фибрин в виде плотных свертков	через 15 мин	Через 12 часов	2-3 сутки	с 15 суток
Некроз поврежденных тканей				
гемолиз эритроцитов в кровоизлиянии – их обесцвечивание и распад	30 минут	5-6 ч		завершение в мелких повреждениях 1 сут
фибриноидное набухание и некроз сосудистых стенок		4-6 часов	2-3 суток	
разрушение коллагеновых волокон	через 6-14 часов – набухание и изменение тинкториальных свойств волокон	от 12 до 24 часов фрагментация коллагеновых волокон		
некроз центральной зоны ран (гомогенизация и базофилия ткани)	4-8 час	16-24 часа	32 часа	
некроз паренхимы по периферии очага (лизис ядер, исчезновение исчерченности мышц, сморщивание нейронов и т.д.)	нейронов - даже при давности травмы до 1 часа	1-3 час	3-6 час	
Лейкоцитарная реакция				
увеличение количества лейкоцитов в просветах сосудов	15-30 мин	30-40 мин, в капиллярах свыше 1 часа		в просвете капилляров нейтрофилы исчезают через 6 час-11 сут, в просвете артерий через 1,5 часа - 27

				суток, в просветах вен только к 16 суткам
красное стояние	5-10 мин	30-40 мин	до 1 часа	до 3-х часов
внутристеночное расположение	через 30 мин единичные	от 1 до 10 часов после травмы		после 14 суток
периваскулярное расположение	5-10 мин единичные	30 мин-4 час		через 2-14 сут
“дорожки”: группы не менее чем из 3 лейкоцитов в ткани между сосудом и зоной травмы	30 минут	3-6 час	до 24-48 часов	
отдельные рассеянные лейкоциты на границе повреждения, количество лейкоцитов в поле зрения микроскопа (при окуляре 7 и объективе 40) 10-50 клеток	1 час	3-6 час		
скопления на границе повреждения 30-150 клеток в поле зрения микроскопа		6-12 час	2 суток	
скопления в толще кровоизлияния	от 30 мин	6-12 час		до 10 суток
лейкоцитарный демаркационный вал: 100-200 клеток в поле зрения микроскопа, в единичных случаях 20-50 клеток, но они расположены по границе повреждения равномерно	6 час	12-24 час		от 30 часов до 10 суток исчезновение лейкоцитов из зоны травмы
распад лейкоцитов	1-1,5 часа	3 час	12-24 ч	до 14 суток
уменьшение лейкоцитарной инфильтрации с преобладанием	24 час	2-3 сутки	4 сутки	5 сутки

лимфоцитов и макрофагов над нейтрофильными лейкоцитами				
Макрофагальная реакция				
первые макрофаги в просвете сосудов или вблизи их	1 час	2-3 ч	> 3 дней	месяцы
первые макрофаги на границе повреждения	через 30 минут - 2 часа	3-8 часов; с 8-12 ч нейтрофилов > макрофагов в соотношении 5:1	18-24 часа	не ранее 8 суток
макрофаги скоплениями по 5-6 в поле зрения микроскопа	20-24 ч	24 ч	48 час	14 суток
макрофагов > нейтрофилов	20 ч	более 1 суток	6 суток	до 15 суток
липофаги	более 1 суток	3 дней		месяцы
эритрофаги	более 1 суток	3 дней		месяцы
Обмен пигментов				
гемосидерин внутриклеточно	3 суток	4 суток	5 суток	7-9 сут, мес
гемосидерин внеклеточно	6-7 суток	7-14 суток	17-18-е сут	месяцы
гематоидин		8 дней		месяцы
полное очищение места кровоизлияния от эритроцитов, но не от пигмента		10-15 сут	более месяца	
Иммунные реакции				
лимфоциты на границе кровоизлияния и в его толще	1-2 часа стадия распознавания антигена	к концу 1 суток	48 часов	свыше 10 суток
скопления лимфоцитов		8 дней		месяцы
преобладание лимфоцитов над нейтрофильными лейкоцитами	2-4 сут	4-5 сут	к 5-6 суткам	14 сут
плазмоциты		72 часа		
тучные клетки	3 часа	6-12 часов	12-24 часа	
Регенерация				

пролиферация фибробластов вокруг артерий, на границе и в толще кровоизлияния	от 6 до 12 часов	1 сут	3 сут	
фибробластов > макрофагов		7-10 сут		
пролиферация эпителия		к концу 1-х суток - на 2-е сутки		
пролиферация эндотелия капилляров	6-12 часов	к концу 1-х суток		
новообразование почкующихся капилляров		3-и сутки и позже	4-7 суток для мозга и его мягких оболочек	до восьмого дня
грануляционная ткань в виде скопления тонкостенных сосудов, между которыми имеются макрофаги, лимфоциты и фибробласты	3 сут	4-5 сут		месяцы
завершенная эпителизация	ссадины иногда 3 сут	не менее 4-5 суток	7 сут	> 21 дней
первые новые коллагеновые волокна		4 сут		
созревание грануляционной ткани: сокращение количества клеток воспаления, фибробластов и капилляров, увеличение числа и размеров волокон коллагена	7 сут	8-14 дней		1 мес зрелый рубец

Правила пользования таблицей 1

Учитывая наличие непредсказуемого влияния ряда факторов на организм пострадавшего и, как следствие, возможного несовпадения реальной и полученной в результате исследования давности образования повреждений, при формулировании выводов

иногда предлагают временной интервал указывать в виде нижней границы. Например, «давность повреждения селезенки составляет не менее 7-8 часов» (Т.И. Русакова, М.В. Федулова, 2007). Если же найдены факторы, ускоряющие реактивные процессы (например, лейкоцитоз в крови), такую формулировку применять нецелесообразно.

Сведения о возможности более ранних или более поздних сроков используются только при наличии особых причин:

- 1) при диагностике состояний, влияющих на реактивность (перечислены выше),
- 2) в случаях, указанных в самой таблице (например, позднее появление сосудистых реакций возможно при коме вследствие черепно-мозговой травмы),
- 3) при неисправимо низком качестве забора материала и приготовления препаратов,
- 4) при использовании иммуногистохимических и иных современных методов.

При попадании одного и того же случая сразу в два соседних временных интервала (по разным признакам) некоторые авторы советуют устанавливать давность образования повреждения как время, находящееся на границе между этими двумя интервалами (например, при попадании случая в интервалы 7-8 и 9-11 часов, давность образования повреждения устанавливают равной 8-9 часов). Это неправильная практика. Во-первых, отставание одной реакции никоим образом не означает ускорения второй. Обычно при действии фактора, изменяющего реактивность, одни реакции изменяют скорость, другие нет. Поэтому при несовпадении реакций прежде всего надо искать его причину. Причины, имеющие практическое значение, указаны выше в списке факторов, изменяющих реактивность организма, и в таблице для соответствующих реакций и повреждений.

При уверенности в однократности травмы ответ надо давать по наиболее выраженной, соответствующей наибольшему сроку повреждения реакции. Исключение представляет реакция лейкоцитов при повышении их уровня в крови.

Предшествовавшие травме патологические изменения – воспалительные инфильтраты, резидуальные явления старых травм, фиброз, рубцы, – диагностируют макроскопически при исследовании трупа и гистологически при исследовании контрольного образца ткани из симметричной или смежной области.

При повторной травматизации, оперативном вмешательстве следует изучать гистотопограммы либо серийные срезы и препараты, полученные из разных участков изучаемого повреждения в целях поиска первоначального, наиболее старого повреждения. Указывается его давность и по возможности давность повторных травм.

Определение прижизненности и давности огнестрельных повреждений

Производят изъятие мягких тканей из стенки огнестрельного канала с захватом как повреждённых, так и видимо неповрежденных тканей. Изымают мягкие ткани из интактного участка (подобные по строению пораженному). После приготовления срезов (см. пункт «Взятие трупного материала на исследование и приготовление препаратов») производят постановку иммуногистохимической реакции по стандартным методикам со срезами мягких тканей из стенки раневого канала с использованием антител к фибриногену, саркомерному и гладкомышечному актинам, виментину и CD-маркеров клеточных элементов, присутствующих в воспалительном инфильтрате.

Кроме этого применяют следующие гистологические и гистохимические окраски (по прописанным протоколам):

- гематоксилином и эозином (окрашивают как срезы мягких тканей из раневого канала, так и всех изъятых внутренних органов)
- по ван Гизону,
- по Шпильмайеру железным гематоксилином

Полуколичественная оценка реакции осуществляется по следующей схеме.

Таблица 2. Полуколичественная оценка иммуногистохимической реакции

Полуколичественная оценка	Интенсивность реакции	Описание
++++	Очень высокая	Яркое окрашивание всех полей зрения
+++	Высокая	Интенсивное окрашивание до 3/4 полей зрения
++	Умеренная	Очаговое интенсивное окрашивание
+	Слабая	Очаговое окрашивание средней интенсивности
±	Сомнительная	Очаговое слабое окрашивание

Реакция считается положительной лишь в трех первых случаях при наличии адекватной реакции в соответствующих контролях

Все ИГХ реакции необходимо проводить в стандартных условиях (температура, влажность окружающей среды) в одной и той же лаборатории, с использованием одного набора антител и одного иммуноштейнера с позитивным и двумя негативными контролями.

Оценивают следующие морфологические признаки в мягких тканях стенки раневого канала:

- наличие кровоизлияний, фрагментации мышечных и коллагеновых волокон, жировых кист как в зоне некроза, так и молекулярного сотрясения, при рутинных окрасках;
- наличие мелких кровоизлияний в зоне молекулярного сотрясения при окраске по Шпильмайеру;
- наличие лизиса саркомерного актина в мышечных волокнах при постановке соответствующей реакции (отсутствие либо слабо выраженная его экспрессия в мышечных волокнах);
- интенсивность ИГХ реакции с антителами к фибриногену в толще мышечной ткани и в строме;
- интенсивность ИГХ реакции с антителами к виментину и гладкомышечному актину в стенках сосудов зоны молекулярного сотрясения;
- наличие дезорганизации цитоархитектоники цитоскелета в сосудистых миоцитах, в других стромальных элементах, выражающейся в потере циркулярной ориентации в сосудах, денатурации по типу глыбчатого распада.

Производят морфометрическую оценку лейкоцитарной реакции (подсчет клеток в поле зрения при увеличении 400х) в зонах некроза и молекулярного сотрясения с уточнением типа лейкоцитов, выявляемых при помощи CD-маркеров (для уточнения).

Критерии оценки

Для прижизненного огнестрельного повреждения характерны следующие признаки:

- Наличие отека, жировых кист и кровоизлияний в стенке раневого канала
- Интенсивность ИГХ реакции с антителами к фибриногену в строме в области молекулярного сотрясения значительно выше (++) и больше), чем в интактной ткани области дермы и подкожной клетчатки интактных мягких тканей кожи
- Наличие дезорганизации (дезориентация и глыбчатый распад) цитоархитектоники внутриклеточных сократительных и других промежуточных волокон мышечных и соединительнотканых структур в зоне молекулярного сотрясения

- Имбиция плазменными белками мышечных волокон в зоне молекулярного сотрясения при её отсутствии в зоне некроза, в том числе термического

Если этих признаков нет или они сомнительны, то достоверно утверждать о прижизненности огнестрельного повреждения нельзя.

Характерным маркёром огнестрельного характера повреждения служит грубая деформация цитоскелета мезенхимальных клеток в виде дезориентации и глыбчатого распада (виментина, гладкомышечного актина и др.), особенно в зоне молекулярного сотрясения. Этот признак свидетельствует об огнестрельном характере повреждения, так как не встречается в других повреждениях.

Что касается давности переживания огнестрельных повреждений, то при давности переживания не более 30 минут при огнестрельных повреждениях происходит замедление воспалительной реакции по сравнению с колото-резаными в зоне реактивных изменений. На более поздних сроках переживания происходит выравнивание воспалительной реакции (полностью к 7 суткам).

Следует отметить, что при темпе наступления смерти от 15-30 минут происходит замедление воспалительной реакции в зоне некроза. При быстром темпе смерти, от 30 минут до 2-х часов и от 2-х до 6-ти часов происходит постепенное выравнивание воспалительной реакции. При медленном темпе смерти от 6-ти до 12-ти часов происходит ускорение воспалительной реакции в зоне молекулярного сотрясения по отношению к зоне некроза.

Эти отличия могут быть связаны как со специфическими факторами выстрела, в частности термическим действием, так и с более выраженными изменениями микроциркуляции и клеточной миграции при огнестрельных повреждениях в сравнении с колото-резаными.

Возможен сомнительный или отрицательный результат ИГХ реакции, если давность наступления смерти превышает 1,5 суток и труп хранился в ненадлежащих условиях. В целях предупреждения этого необходимо начать исследование со срезов мягких тканей, окрашенных гематоксилином и эозином, и по степени выраженности аутолитических изменений определить пригодность материала для постановки ИГХ реакции.

Также возможен вариант пролонгированного танатогенеза, при котором утрачивается специфика временных особенностей реакции на повреждение. Это осложнение устраняется адекватным использованием методик танатогенетического анализа.

Определение прижизненности странгуляционной асфиксии

Производят изъятие кожи с подлежащей клетчаткой в области наибольшей выраженности странгуляционной борозды. Изымают кожу с интактного участка, а также фрагменты легких вне зоны гипостаза по два фрагмента из каждого легкого. После приготовления срезов (см. пункт «Взятие трупного материала на исследование и приготовление препаратов») производят постановку иммуногистохимической реакции по стандартным методикам с использованием антител к фибриногену (для срезов кожи и легких), фибронектину (для срезов кожи), CD-117 (для срезов легких) и общим цитокератинам (для срезов кожи).

Также применяют следующие гистологические и гистохимические окраски:

- гематоксилином и эозином,
- толуидиновым синим,
- по Шпильмайеру,
- по Ван Гизону.

Полуколичественную оценку ИГХ реакции осуществляет по схеме, указанной в разделе «Определение прижизненности и давности огнестрельных повреждений» (таблица 2). Все реакции ИГХ необходимо проводить в стандартных условиях, в одной и той же лаборатории, с использованием одного набора антител и одного иммуноштейнера с позитивным и негативным контролем.

Оценивают следующие морфологические признаки:

- Наличие метахромазии дермы при окраске толуидиновым синим;
- Наличие гиперреактивности эпидермиса и дермы при окраске по Шпильмайеру;
- Наличие уплотнения волокон дермы при окраске по Ван Гизону;
- Интенсивность ИГХ реакции с антителами к фибриногену в области дермы и подкожной клетчатки странгуляционной борозды;
- Интенсивность ИГХ реакции с антителами к фибриногену в области дермы и подкожной клетчатки интактной кожи;
- Наличие дезорганизации citoархитектоники цитокератинов в эпидермисе странгуляционной борозды;
- Степень экспрессии CD -117 и фибриногена в ткани лёгких;
- Степень экспрессии фибронектина в тканях странгуляционной борозды.

Критерии оценки

Для прижизненной странгуляционной асфиксии характерны следующие признаки:

- Наличие метахромазии дермы при окраске толуидиновым синим;
- Наличие гиперреактивности эпидермиса и дермы при окраске по Шпильмайеру;
- Наличие утолщения волокон дермы при окраске по Ван Гизону;
- Интенсивность ИГХ реакции с антителами к фибриногену в области дермы и подкожной клетчатки борозды значительно выше, чем в области дермы и подкожной клетчатки интактной кожи;
- Наличие дезорганизации citoархитектоники цитокератинов в эпидермисе борозды;
- Гиперэкспрессия CD-117 и гипоекспрессия фибриногена в ткани лёгких;
- Гипоекспрессию фибронектина в изученном материале.

Если этих признаков нет или они сомнительны, то достоверно утверждать о прижизненности острой странгуляции нельзя.

Возможна сомнительная ИГХ-реакция, если давность наступления смерти превышает 1,5 сут. Также возможны случаи пролонгированной странгуляции, для которой характерно наличие экспрессии фибронектина в дерме борозды и более значительная экспрессия фибриногена в сосудах и альвеолах легких при положительных иных признаках странгуляции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сущность гистологического метода оценки прижизненности и давности любых видов повреждений мягких тканей основана на классическом учении о местной реакции организма на повреждение, в ходе которой закономерно последовательно сменяются фазы (альтерация-экссудация-резорбция-пролиферация) и реализующие их клеточные популяции в зоне повреждения. В то же время, множество дополнительных факторов, содружественно или разнонаправленно воздействующих как на зону повреждения, так и в целом на реактивность организма, обуславливают необходимость крайне тщательного подхода к оценке сроков развития местных реакций в каждом конкретном экспертном случае с учетом всех выявленных возможных причин замедленной или ускоренной реактивности.

К причинам отклонения от условной «нормальной реактивности», помимо

упомянутых выше, относятся собственно вид и характеристики повреждения: в дне ссадины, стенке раны, области ожога скорость развития реакций не будет одинакова (именно поэтому данные методические рекомендации содержат несколько разделов, где приведены различные подходы к оценке прижизненности и давности различных видов повреждений), а реактивный процесс в обширной разможенной ране не будет таким же, как в небольшой колото-резаной.

Инфицирование повреждений с развитием гнойного воспаления также способно существенно исказить обычную фазность развития перифокальных реакций и сделать установление времени возникновения повреждений практически невозможным. Категорически не следует пытаться применить описанные методы оценки повреждений для установления давности патологических воспалительных процессов в органах и тканях - несмотря на то, что в обоих случаях закономерности фаз процесса аналогичны, выраженность и скорость развития реакций различаются в них принципиально.

Гистологический метод оценки прижизненности и давности повреждений находится в постоянном развитии, поскольку в ходе фундаментальных и прикладных исследований появляются новые сведения о структуре, функциях и способах взаимодействия реактивных клеточных популяций, новых возможностях детекции типов клеток и выделяемых ими веществ. Классическая основа судебно-медицинской гистологии повреждений все больше дополняется новыми научными данными, для практического экспертного использования которых необходима разработка и адаптация современных, в первую очередь иммуногистохимических методов исследования.

**СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКАЯ ДИАГНОСТИКА ПРИЖИЗНЕННОСТИ
И ДАВНОСТИ ПОВРЕЖДЕНИЙ МЯГКИХ ТКАНЕЙ
ГИСТОЛОГИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ
(второе издание)**

Методические рекомендации

Подписано в печать 23.11.2021.

Формат 60х90/16. Бумага офсетная. Гарнитура Times.

Уч.-изд. л. 1,06. Усл.-печ. л. 1,29. Заказ № 2885.1. Тираж 200.

Отпечатано в типографии ООО «Принт».

426035, г. Ижевск, ул. Тимирязева, 5.