

В.А. Данилова¹, Г.В. Мережко¹, И.Л. Рябкова²

Новый метод выделения элементов диатомового планктона из крови при утоплении

*ГУ «80 Центральная военная судебно-медицинская лаборатория»¹
Центральная судебно-гистологическая лаборатория Государственной службы
медицинских судебных экспертиз²*

Судебно-медицинская экспертиза утопления относится к числу наиболее сложных и её проведение нередко оказывается затруднительным, в связи с чем совершенствование диагностики смерти от утопления является весьма актуальным. Для объективного подтверждения диагноза смерти от утопления необходимо комплекс наружных и внутренних морфологических признаков сопоставлять с данными, полученными при лабораторных исследованиях, из которых наиболее убедительным является обнаружение планктона и псевдопланктона в крови, внутренних органах (кроме легких) и в костном мозге.[2]

Анализ работы Центральной судебно-гистологической лаборатории Государственной службы медицинских судебных экспертиз за последние 5 лет показал крайне низкий процент положительных результатов исследования на диатомовый планктон внутренних органов трупов, извлеченных из воды (3-18% в разные годы).

| Год исследования | Всего исследовано трупов | Обнаружен диатом. планктон в легких | Обнаружен диатом. планктон во внутр. органах | Доля положит. результатов |
|------------------|--------------------------|-------------------------------------|--|---------------------------|
| 2005 | 100 | 22 | 7 | 7% |
| 2006 | 145 | 27 | 26 | 17,9% |
| 2007 | 157 | 58 | 25 | 15,9% |
| 2008 | 144 | 46 | 8 | 5,5% |
| 2009 | 150 | 56 | 5 | 3,3% |

Таб.1. Результаты исследования на диатомовый планктон на базе ЦСГЛ (г. Минск и Минская область) за 2005-2009 гг.

Данные, представленные в таблице 1, демонстрируют тенденцию к снижению частоты выявления элементов диатомового планктона во внутренних органах в последние годы. Подобная тенденция характерна и для других регионов Республики Беларусь. На возможные причины этого явления указывают исследования специалистов Витебского государственного медуниверситета

Яблонского М.Ф., Жолнеровского В.М., Буйнова А.А. и среди них отмечены следующие:

- использование техник выделения элементов планктона, снижающих чувствительность метода;
- исследование трупов утонувших в период диатомового минимума;
- отсутствие диатомей в воде при утоплении в колодцах, ваннах;
- изменение структуры гидроэкосистем в связи с усилением антропогенной нагрузки на водоемы. [5]

До недавнего времени в Государственной службе медицинских судебных экспертиз Республики Беларусь на практике применялись методики минерализации, изложенные в методическом письме «Об изъятии, направлении и лабораторном исследовании внутренних органов на элементы диатомового планктона» (Москва, 1961 г.). Данные методики достаточно трудоемкие, требуют использования сильнодействующих кислот и многоэтапного центрифугирования. При этом значительно теряется информативность в связи с разрушением элементов планктона и псевдопланктона. Неблагоприятно сказываются на результатах исследования и обилие кристаллических осадков, многоступенчатость анализа в целом. Предъявляются повышенные требования к организации рабочего места по охране труда и технике безопасности.

С целью повышения эффективности лабораторной диагностики утопления и оптимизации деятельности судебно-гистологических отделений в этом направлении мы обратились к опыту других исследователей в поиске более чувствительных методов выделения планктона из внутренней среды организма. Наиболее интересными на наш взгляд явились работы Incze Dyula (1949) [3], Попова С.И. (1972) [4], а также Алтаевой А.Ж., Айдакулова А.Ш., Журнисова С.С. (2006) [1]. Все вышеупомянутые специалисты пользовались сходными и в то же время оригинальными методиками выделения элементов диатомового планктона из крови левой половины сердца и аорты. Обобщив их опыт, мы разработали и апробировали собственную методику выделения планктона из крови.

Назначение и область применения

Методика выделения элементов планктона предназначена для лабораторного исследования крови из левой половины сердца либо смыва соответствующей камеры сердца, взятых от трупов, извлеченных из воды, во всех случаях подозрительных на утопление и заключается в следующем:

на исследование направляется цельная кровь либо промывные воды из левой половины сердца, которые гемолизируют дистиллированной водой с добавлением небольшого количества щелочи, с последующим многократным центрифугированием и микроскопией осадка. Метод позволяет выявить в крови элементы диатомового планктона, псевдопланктона и других микровключений, содержащихся в воде водоема.

Данная методика забора и исследования материала не применима только в случае выраженных гнилостных изменений тканей трупа с разрушением морфологической структуры органов (отсутствие полостей сердца).

Описание методики с указанием этапов

1. Забор материала.

1.1. Одноразовым 20-миллилитровым шприцем через прокол стенки левого желудочка сердца забирают кровь в количестве не менее 20 мл.

1.2. При недостаточном количестве крови или ее отсутствии полость левого желудочка сердца промывают 20 мл дистиллированной воды с помощью шприца, которым производят забор материала. Через прокол стенки левого желудочка вводят в полость сердца дистиллированную воду. Не извлекая шприца, сердце встряхивают, так как элементы планктона оседают на стенках камер и трабекулах (по этой же причине забор промывных вод предпочтителен).

1.3. Материал направляют на исследование в шприце, упакованном и опечатанном, согласно Правилам изъятия и направления трупного материала на лабораторное исследование. Материал можно сохранять в холодильнике до нескольких недель.

1.4. В направлении, помимо регистрационных данных, обязательно указывают название водоема, из которого извлечен труп.

Примечание: Брать на исследование кровь из правой половины сердца менее целесообразно, так как она прошла «паренхиматозный фильтр» и содержание элементов диатомового планктона в ней значительно уменьшено.

2. Методика проведения исследования.

2.1. Обработка материала.

2.1.1. Кровь либо промывные воды из шприца по 5 мл помещают в четыре центрифужные пробирки емкостью 10 мл и разбавляют дистиллированной водой до объема пробирки. В каждую пробирку добавляют по 1-2 капли 1 М раствора гидроксида натрия (калия) либо 25% раствора аммиака для просветления гемолизата. Жидкость в пробирках тщательно перемешивают пастеровскими пипетками.

2.1.2. Проводят центрифугирование в течение 10 минут при скорости 3000 об/мин, после чего удаляют 2/3 объема надосадочной жидкости и повторно добавляют дистиллированную воду и, при необходимости (при наличии большого количества рыхлого осадка), 1-2 капли 1 М раствора NaOH.

Обработку материала повторяют 5-7 раз до получения светло-розового раствора и визуально различимого небольшого осадка (осадок может быть не различим). В процессе обработки содержимое пробирок одного образца крови объединяют.

2.1.3. Перед изготовлением препарата необходимо проверить pH гемолизата с помощью универсальной индикаторной бумаги. Среда должна быть нейтральной или слабощелочной. Избыток щелочи устраняют отмыванием осадка в дистиллированной воде с последующим центрифугированием (при избытке щелочи препарат в процессе высыхания кристаллизуется).

2.2. Изготовление препаратов.

Полученный осадок помещается на предметное стекло пастеровской пипеткой и высушивается в термостате при температуре +50°C в течение 20-30 минут с последующим заключением в полистирол под покрывные стекла.

2.3. Микроскопия препаратов.

Полученный препарат изучается в проходящем свете при увеличении в 400 раз (окуляр 10х, объектив 40х). Возможно изучение препаратов в темном поле при поляризационной и фазово-контрастной микроскопии.

Кроме диатомового планктона выявляются элементы псевдопланктона

(силикатные частицы, растительные волокна, пыльца, яйца гельминтов, споры и цисты, фрагменты шерстяных и синтетических волокон).

Оценка результатов исследования

При условии соблюдения правил обработки лабораторной посуды, исключающих загрязнение материала водопроводной водой, достоверным положительным результатом исследования считается обнаружение даже единичных «живых» элементов диатомового планктона, т.е. содержащих хлоропласты и другие органеллы. Следует принимать во внимание наличие в препарате других хлорофиллсодержащих клеток и колоний. Содержание в препарате цист, яиц гельминтов, спор, пыльцы следует рассматривать как неспецифические включения, встречающиеся в 30% образцов крови лиц, умерших не от утопления. В тоже время, установлена возможность выявления мелких (до 10 мкм) «ферментированных» диатомей, т.е. не содержащих хлоропластов, в случаях смерти не от утопления.

Результаты апробации методики выделения элементов диатомового планктона из крови.

В период с апреля по октябрь 2009 года на базе ГУ «80 Центральная военная судебно-медицинская лаборатория» авторами статьи было исследовано 60 проб крови из левого желудочка сердца трупов, извлеченных из водоемов г.Минска и Минской области, по представленной методике. Кровь и промывные воды доставлялись в количестве от 2 до 20 мл в одноразовых шприцах, упакованных согласно действующим Правилам изъятия и направления трупного материала на лабораторное исследование (приказ Белорусской государственной службы судебно-медицинской экспертизы от 1 июля 1999 г, №38-с).

Элементы диатомового планктона в количестве от 2-х до свыше 100 экземпляров были выявлены в 35 случаях из 60, что составило 58% положительных результатов; это соответствует литературным данным о доле аспирационного типа утопления в структуре причин смерти в воде.

Параллельно с нашими исследованиями секционный материал (легкое, почка, грудина) из тех же трупов обрабатывался по общепринятой методике и исследовался медицинскими судебными экспертами Центральной судебно-гистологической лаборатории ГСМСЭ. Результаты исследований секционного материала были использованы в качестве контроля.

Из 60 случаев исследования секционного материала единичные (точное количество не указано) элементы диатомовых водорослей в препаратах внутренних органов (за исключением легких) были обнаружены в 5-ти случаях, что составило 8% положительных результатов.

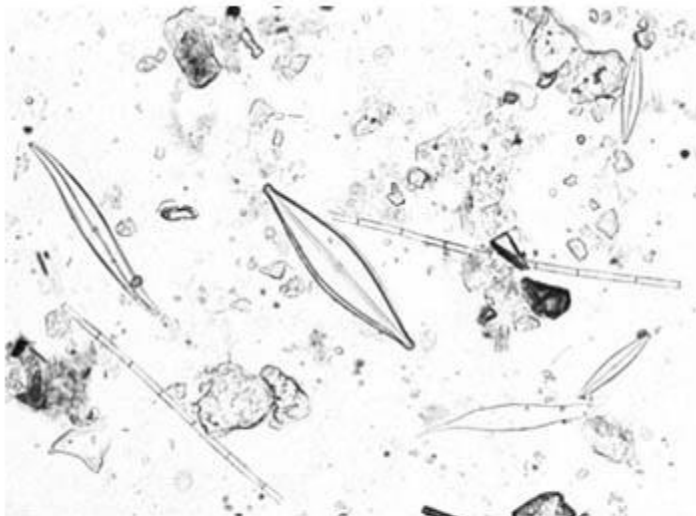


Рис.1. Микроскопическая картина препарата крови при аспирационном типе утопления.

Также было исследовано 54 образца крови из левого желудочка сердца трупов лиц, умерших от других причин (не утопление). Элементов диатомового планктона в указанных образцах крови выявлено не было. При этом в 18 образцах обнаружены цисты простейших, яйца гельминтов, пыльца, являющиеся

элементами псевдопланктона.

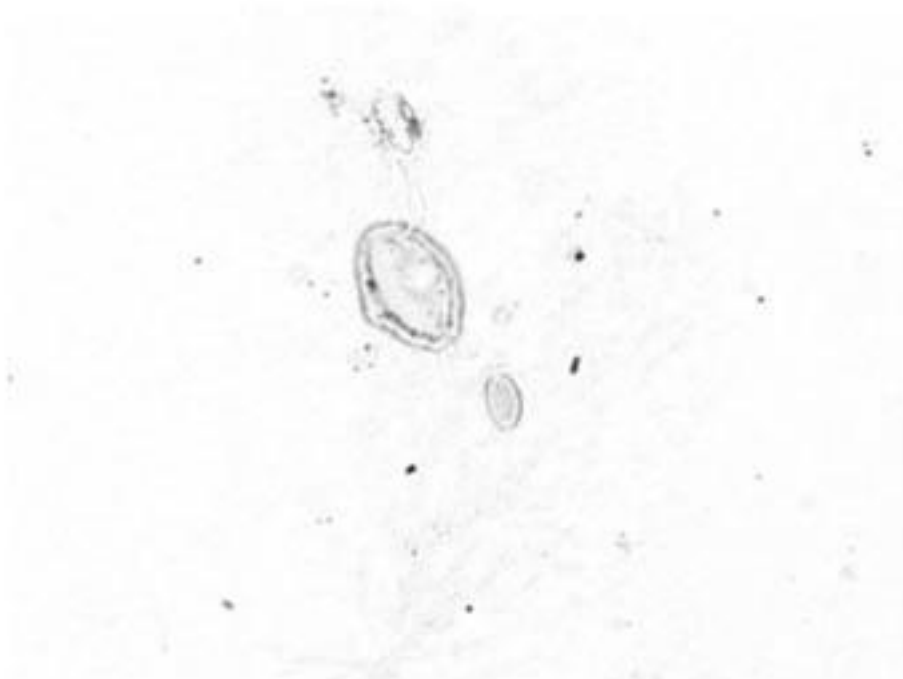


Рис.2



Рис.3



Рис.4

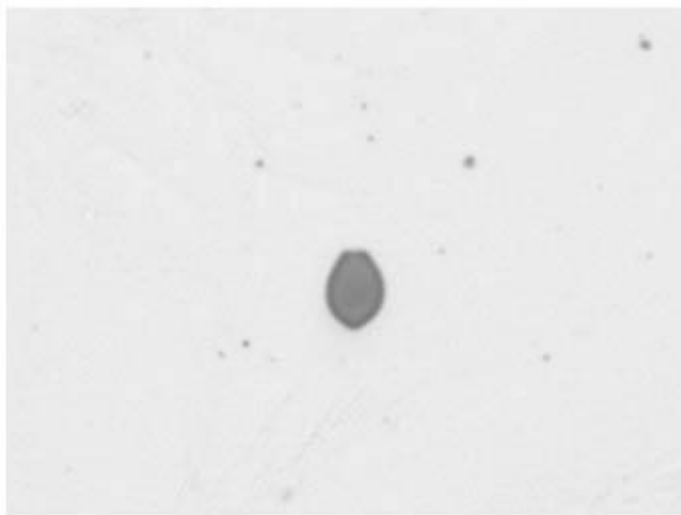


Рис.5

На рисунках 2-5 представлены элементы псевдопланктона в препарате крови из трупа умершего не от утопления.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с помощью программы BIOSTAT с использованием методов непараметрической статистики по критерию хи-квадрат:

Численность группы 1= 60; положительных результатов в группе 1= 35;
отрицательных результатов в группе 1= 25.

Численность группы 2= 60; положительных результатов в группе 2= 5;
отрицательных результатов в группе 2= 55.

$X^2 = 31,530$ с степенью свободы 1; $p < 0,001$.

Выявлены статистически значимые различия в распределении результатов применения двух методик ($X^2 = 31,5$ с степенью свободы 1; $p < 0,001$)

Выводы:

1. Предложенная методика выделения элементов диатомового планктона из крови значительно более чувствительна по сравнению с общепринятой методикой минерализации внутренних органов с использованием крепких кислот, что обусловлено кумуляцией элементов водной среды в полостях левой половины

сердца и щадящим режимом обработки биологического материала.

2. Методика не требует применения сложного технического оборудования и дорогостоящих реактивов.
3. Сроки обработки биологического материала от момента попадания в руки лаборанта до передачи готового препарата эксперту составляет от 1-го до 3-х часов. Время необходимое на проведение минерализации – от 3-х до 8-ми суток.
4. Используемый для гемолиза 1-Н раствор гидроксида натрия не имеет запаха и не оказывает раздражающего действия на слизистые оболочки глаз и дыхательных путей, что делает его более безопасным для персонала, чем пары крепких кислот.
5. Полученные микропрепараты пригодны для длительного архивного хранения и повторного исследования.

Литература

1. Алтаева, А. Ж. Исследование перикардальной жидкости и крови из левого и правого желудочков сердца при судебно-медицинской экспертизе утоплений / А. Ж. Алтаева, А. Ш. Айдакулов, С. С. Журнисов // Судебно-медицинская экспертиза. 2006. № 3. С. 28–29.
2. Калашников, Д. П. Новые лабораторные методы в подготовке и исследовании диатомового планктона / Д. П. Калашников, Д. В. Горностаев // Судебно-медицинская экспертиза. 2007. № 1. С. 39–43.
3. Лабораторные и специальные методы исследования в судебной медицине: практ. рук. / под ред. В. И. Пашковой, В.В. Томилина. М., 1975. С. 338–356.
4. Попов, С. И. Метод комплексного выделения элементов планктона из крови / С. И. Попов // Вопросы судебной медицины и криминалистики. Горький, 1972. С. 238–242.
5. Яблонский, М. Ф. Анализ результатов исследований определения диатомового планктона при утоплении / М. Ф. Яблонский, В. М. Жолнеровский, А. А. Буйнов // Вестник Витебского государственного медицинского университета. 2006. Т. 5. № 1. С. 85–88.