РЕСПУБЛИКАНСКОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ КАЗЕННОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ
«ЦЕНТР СУДЕБНЫХ ЭКСПЕРТИЗ
МИНИСТЕРСТВА ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН»

"Қазақстан Республикасы Әділет Министірлігінің
Сот сараптамалары орталығы"
БАҚЫЛАУ ҮЛГІСІ
ҚР ӘМ ССО ғылыми кеңесінің № 2
«5» ақпан 2016 ж. хаттамасы
реттік нөмері № 24.1(14)

МЕТОДИКА

МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ХРОНИЧЕСКИХ СУБДУРАЛЬНЫХ ГЕМАТОМ

(шифр специальности – 24.1)

Астана, 2016 г.

ПАСПОРТ МЕТОДИКИ

1. Наименование методики	Методика морфологической диагностики хронических субдуральных гематом
2. Шифр специальности методики	24.1(14)
3. Информация о разработчике методики	Составитель: Оспанова К.Е. - судебно-медицинский эксперт-гистолог, к.м.н. Центр судебной медицины МЗ РК Рецензент: Манекенова К.Б. - заведующая кафедрой патологической анатомии МУА, профессор, д.м.н.
4. Сущность методики	Выявление морфологических признаков, характерных для хронических субдуральных гематом
4.1. Объекты исследования	Аутопсийный материал (фрагменты внутренних органов и частей трупа, забор которых производится во время вскрытия)
4.2. Методы исследования	Гистологический
4.3. Краткое поэтапное описание методики	Ознакомившись с обстоятельствами дела, эксперту необходимо затребовать и тщательно изучить всю имеющуюся документацию в отношении умершего. При экспертизе документации следует обратить особое внимание на наличие в прошлом черепно-мозговой травмы, на особенности ее клинического течения, оперативных вмешательств, предшествующих заболеваний, особенно связанных с сосудистой патологией головного мозга (гипертоническая болезнь, атеросклероз сосудов головного мозга, пороки ангиогенеза и др.). Обнаружив субдуральную гематому при вскрытии трупа, эксперт подробно описывает следующие позиции: локализацию (анатомическую область и ее поверхность); форму; размеры; цвет; консистенцию (на ощупь); свойство тканей вокруг гематомы (описание капсулы). Следует уделить особое внимание обнаружению и подробному описанию переломов костей свода и основания черепа, а также состояние твердой мозговой оболочки (напряжена, не напряжена). При исследовании капсулы гематомы последовательно описывают

	характеристику ее наружной и внутренней поверхности; толщину стенки, содержимое капсулы. При наличии в ней жидкого содержимого измеряют его объем, в мл. Для гистологического исследования вырезают кусочки капсулы гематомы таким образом, чтобы в полость разреза попали все слои обоих листков капсулы гематомы как с дуральной, так и с арахноидальной стороны, в том числе и содержимое; кусочки фиксируют в 10% растворе формалина. Особое внимание необходимо проявлять при заливке препарата. Необходима правильная ориентация кусочка, для получения гистологического препарата, включающего все слои капсулы гематомы. Окрашенные гематоксилином и эозином гистологические препараты изучают в светооптическом микроскопе при увеличении от 30 до 400. Основными критериями гистологической диагностики ХСГ являются: наличие наружной и внутренней капсулы, представляющей собой различной степени зрелости соединительную ткань с воспалительным инфильтратом. Капсула ХСГ, по существу, является результатом "незавершенного" воспалительно-склеротического процесса с замедленной организацией и инкапсуляцией патологического очага. Неудаленная субдуральная гематома может либо резорбироваться, либо превратиться в ХСГ
5. Дата одобрения методики Ученым Советом Центра судебной медицины МЮ РК	Протокол №2 от 05.12.2016г.
6. Информация о составителях паспорта методики	Имамбаева Н.Е. - судебно-медицинский эксперт высшей квалификационной категории

ОГЛАВЛЕНИЕ

Методики морфологической диагностики хронических субдуральных гематом

1. Общие положения……6
2. Перечень использованных источников……16

МЕТОДИКИ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ХРОНИЧЕСКИХ СУБДУРАЛЬНЫХ ГЕМАТОМ (ХСГ)

ОПИСАНИЕ МЕТОДА ИССЛЕДОВАНИЯ

Формула метода.

Предлагается метод судебно-медицинской диагностики хронических субдуральных гематом, заключающийся в том, что с помощью гистологического исследования капсулы и содержимого ХСГ устанавливаются их давность (от 24ч до 3 и более лет) и генез (травматическая, нетравматическая). Предложенные критерии диагностики являются новыми и отличаются от использовавшихся прежде большей точностью установления давности диагностики нетравматической или же травматической природы ХСГ.

Материально-техническое обеспечение метода.

Метод гистологической диагностики хронических субдуральных гематом не требует специального материально-технического обеспечения, так как специфические гистологические признаки ХСГ изучаются на стандартных гистологических препаратах. Для решения этой задачи необходимо иметь в наличии классический набор реактивов и оборудования, используемых в каждодневной практической работе гистологов. Это 10% раствор нейтрального формалина, парафин, термостат, микротом любого образца, гематоксилин, эозин, ксилол, спирты от 25 до 96°, светооптический микроскоп.

Описание метода.

Ознакомившись с обстоятельствами дела, эксперту необходимо затребовать и тщательно изучить всю имеющуюся документацию в отношении умершего. При экспертизе документации следует обратить особое внимание на наличие в прошлом черепно-мозговой травмы, на особенности ее клинического течения, оперативных вмешательств, предшествующих заболеваний, особенно связанных с сосудистой патологией головного мозга (гипертоническая болезнь, атеросклероз сосудов головного мозга, пороки ангиогенеза и др.). Обнаружив субдуральную гематому при вскрытии трупа, эксперт подробно описывает следующие позиции: локализацию (анатомическую область и ее поверхность); форму; размеры; цвет; консистенцию (на ощупь); свойство тканей вокруг гематомы (описание капсулы); особенности.

Следует уделить особое внимание обнаружению и подробному описанию переломов костей свода и основания черепа, а также состояние твердой мозговой оболочки (напряжена, не напряжена).

При исследовании капсулы гематомы последовательно описывают характеристику ее наружной и внутренней поверхности; толщину стенки, содержимое капсулы. При наличии в ней жидкого содержимого измеряют его объем, в мл.

Для гистологического исследования вырезают кусочки капсулы гематомы таким образом, чтобы в полость разреза попали все слои обоих листков капсулы гематомы как с дуральной, так и с арахноидальной стороны, в том числе и содержимое; кусочки фиксируют в 10% растворе формалина. Особое внимание необходимо проявлять при заливке препарата. Необходима правильная ориентация кусочка, для получения гистологического препарата, включающего все слои капсулы гематомы. Окрашенные гематоксилином и эозином гистологические препараты изучают в светооптическом микроскопе при увеличении от 30 до 400.

ОЦЕНКА ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Морфологическая характеристика хронических субдуральных гематом. Критерии гистологической диагностики.

Хроническая субдуральная гематома макроскопически представляется в виде уплощенного эластического мешка различной величины, иногда до 10-15 см в наибольшем диаметре. Твердая мозговая оболочка над ХСГ обычно имеет синеватую окраску, напряжена. ХСГ, располагающиеся на внутренней поверхности твердой мозговой оболочки, в большинстве случаев рыхло связано с последней. В относительно редких случаях связь с твердой мозговой оболочкой оказывается более прочной, также как возможна интимная связь с мягкой мозговой оболочкой.

Располагается ХСГ чаще всего по выпуклой поверхности одного из полушарий мозга, обычно не доходя до верхнего продольного синуса. Иногда она покрывает собой большую часть конвекситальной поверхности полушария. Толщина капсулы гематомы широко варьирует. Окраска капсулы гематомы зависит от отложений (гемосидерина и гематоидина) и просвечивающего кровянистого содержимого.

Содержимое капсулы может представлять бурую или ксантохромную жидкость, в ряде случаев со свертками фибрина, либо свертки крови и жидкую кровь. Нередко содержимое капсулы представляет собой смесь буроватых свертков крови, фибрина и жидкости (от бурой до зеленоватой) в разных количественных соотношениях. Полость ХСГ может быть одно - двухкамерной или иметь многокамерное строение с выраженными трабекулами, занимавшими значительную часть объема гематомы.

Основными критериями гистологической диагностики ХСГ являются: наличие наружной и внутренней капсулы, представляющей собой различной степени зрелости соединительную ткань с воспалительным инфильтратом. Капсула ХСГ, по существу является результатом "незавершенного" воспалительно-склеротического процесса с замедленной организацией и инкапсуляцией патологического очага. Неудаленная субдуральная гематома может либо резорбироваться, либо превратиться в ХСГ.

Анализ морфологических исследований субдуральных гематом, позволил представить следующую динамику изменений субдуральной гематомы в зависимости от сроков; прошедших после кровоизлияния (см. табл. 1).

Таблица 1 Динамика структурных изменений субдуральной гематомы в зависимости от сроков, прошедших после кровоизлияния.

Время после кровоизлияния	Сверток крови	Дуральная поверхность	Арахноидальная поверхность
до 24 часов	неизмененные эритроциты, единичные сегментоядерные лейкоциты	фибрин	фибрин
24–48 часов	выраженная сегментоядерная инфильтрация.	единичные малодифференцированные фибробласты, мало хроматина в ядрах	фибрин
3-4 суток	макрофаги	единичные фибробласты, фибрин	фибрин
4-5сут. гемолиз эритроцитов	гемолиз эритроцитов, лизис части эритроцитов, гемосидерофаги	отграничительная мембрана, представленная 2-5 слоями фибробластов. Уменьшается количество лейкоцитов, нарастает доля фибробластов, эндотелий, ангиогенез, перициты, единичные тучные клетки.	фибрин
1 неделя	отсутствие неизмененных эритроцитов, ангиофибробластич	слой фибробластов толщиной до 12 клеток	на отдельных участках возможен один слой плоских эпителиоподобных

	еская инвазия свертка крови		клеток
2 недели	периферические отделы гематомы замещены молодой грануляционной тканью; появление синусоидных капилляров	слой фибробластов толщиной в ½ от твердой мозговой оболочки. Максимальное содержание тучных клеток; ангиогенез, пролиферация перицитов	один слой фибробластов
3 недели	Большое количество синусоидных капилляров	упорядочивающаяся циркулярная ориентация созревающих фибробластов, внутриклеточная локализация гемосидерина	Тонкая мембрана из фибробластов
4 недели	Жидкое состояние свертка	фибробластическая мембрана равна по толщине твердой мозговой оболочке; вне- и внутриклеточная локализация гемосидерина, плотные, хорошо ориентированные коллагеновые волокна	Уплотненная мембрана из фибробластов

1-3 месяца после субдурального кровоизлияния - это период дальнейшего созревания грануляционной ткани обоих листков капсулы. В этот период внутренние отделы наружной капсулы представлены созревающей грануляционной тканью с преобладанием эпителиоидных клеток и фибробластов, внеклеточными содержаниями гемосидерина и большим количеством сосудов; наружные отделы капсулы состоят из молодой фиброзной ткани.

Наряду с хорошо сформированными сосудами, обнаруживаются сосудистые щели и гигантские капилляры, а также следы вторичных внутрикапсулярных кровоизлияний различной давности. Прилежащий к гематоме слой грануляционной ткани обильно инфильтрирован эозинофильными лейкоцитами. На фоне густых лимфоплазмоцитарных инфильтратов располагаются тучные клетки.

Существует определенная зависимость между составом, интенсивностью воспалительного инфильтрата в наружной капсуле ХСГ и давностью кровоизлияния. Тучные клетки и эозинофильные лейкоциты на фоне густых лимфо-плазмоцитарных инфильтратов обнаруживаются в интервале от 3 недель до 3,5 месяцев после кровоизлияния.

Последующие изменения в строении капсулы ХСГ (от 3 до 12 месяцев) не укладываются в четко очерченные временные рамки, так как в каждом конкретном случае множество различных местных и общих процессов, происходящих в организме, влияют на дальнейшее состояние очагового асептического воспалительного процесса.

3-12 месяцев - в наружных отделах капсулы происходит постепенное созревание соединительной ткани с уменьшением клеточных элементов и преобладанием волокнистых структур. Наряду с крупными кровеносными сосудами с хорошо сформированной стенкой, встречаются сосудистые щели, выстланные эндотелиальными клетками и гигантские макрокапилляры. В течение от 3 до 12 месяцев после кровоизлияния в наружной капсуле ХСГ могут обнаруживаться эозинофильные лейкоциты, но количество их уменьшается по мере увеличения сроков давности процесса. В этот же период встречаются очаговые лимфоидные или лимфоплазмоцитарные инфильтраты.

1 год - 3 года - только лимфоплазмоцитарные инфильтраты различной степени интенсивности в капсуле, наружные отделы которой представлены зрелой, а внутренние отделы молодой соединительной тканью, а в сроках до 1,5 лет – зрелой грануляционной тканью.

Свыше 3 лет - на внутренней поверхности капсулы обнаруживаются единичные лимфоциты и узкая полоска свободно лежащих глыбок гемосидерина. Сама капсула представляет собой фиброзную бессосудистую ткань. В просвете капсулы содержатся творожистые массы бледно-желтого цвета.

При исследовании гистологических препаратов наружной стенки ХСГ можно выделить три типа капсулы, что позволяет с учетом макроскопических данных исследования трупа пострадавшего, а при возможности и анамнестических данных, высказаться о травматической и нетравматической природе ХСГ.

Первый тип. Внутренняя поверхность капсулы, обращенная к свертку крови, выстлана слоем вытянутых, веретенообразных клеток. Первый тип капсулы чаще встречается в случаях нетравматической ХСГ.

Второй тип. Гистологически очерченных границ между внутренней поверхностью капсулы и свертком крови нет. В гематому внедряются фибробласты в виде колонок или тяжей. Второй тип капсулы в подавляющем числе случаев является результатом травматического повреждения сосудов.

Третий тип. Чередование участков внутренней выстилки с врастанием фибробластов в гематому. Третий тип капсулы может сформироваться как при травматической, так и нетравматической ХСГ.

Обнаруживаемые в ряде случаев в толще капсулы комплексы аксональных клеток, свидетельствуют о корковых, контузиях, сопровождающихся разрывом мягкой мозговой оболочки.

Электронно-микроскопическое исследование субдуральных гематом позволило установить ряд закономерностей которые могут быть использованы в качестве дополнительных диагностических критериев давности травмы.

В течение первых суток на дуральной поверхности появляется значительное количество незрелых макрофагов, в цитоплазме которых расположены секреторные гранулы по периферии цитоплазмы, а на арахноидальной поверхности обнаруживаются экссудативные моноциты - предшественники макрофагов.

Через двое суток на дуральной поверхности формируется сетчатый слой из малодифференцированных фибробластов, цитоплазма которых содержит мало рибосом и полисом, слабо развита гранулярная эндоплазматическая сеть, мало хроматина в ядрах.

К пятым суткам уменьшается количество лейкоцитов, нарастает число фибробластов, эндотелиальных клеток, отмечается пролиферация перицитов, идет процесс новообразования микрососудов, по периферии которых появляются единичные тучные клетки.

Спустя через неделю после травмы на дуральной поверхности присутствуют зрелые макрофаги с многочисленными инвагинациями и выпячиваниями цитоплазмы, у которых хорошо развит лизосомно-фагоцитарный аппарат.

Через две недели после травмы отмечаются усиленный ангиогенез с интенсивной пролиферацией перицитов.

На третьей неделе увеличивается количество зрелых фибробластов и вокруг их нарастает экстрацеллюлярный матрикс в виде волокон коллагена и фибронектина.

К концу четвертой недели формируется слой из плотных параллельно ориентированных коллагеновых волокон, среди которых встречаются единичные лаброциты.

Показания к применению метода.

Методические рекомендации могут быть использованы в случаях обнаружения ХСГ при секционном исследовании трупа. Предлагаемый метод позволяет, при условии анализа комплекса признаков (клинических данных,

результатов секционного и гистологического исследований), решить вопрос о времени ее возникновения в пределах 4-х временных градаций: от 2 недель до 3 месяцев, от 3 месяцев до 1 года, от 1 года до 3 лет и свыше 3 лет, а также предположительно решить вопрос о генезе ХСГ. Противопоказаний к применению метод не имеет.

Эффективность использования метода.

Рекомендуемый метод существенно расширяет возможности судебно-медицинской экспертизы, позволяя решать вопросы о генезе и давности образования ХСГ поставленные перед экспертом правоохранительными органами. Это дает возможность установить и реконструировать обстоятельства происшествия и ряд других вопросов, интересующих судебно-следственные органы при расследовании уголовных дел.

Одним из вспомогательных методов определения давности и прижизненности кровоизлияний является методика окраски препаратов Marcius Scarlet Blue (MSB) предложенная Lendrum и соавт. (Великобритания) в модификации Д.Д. Зербино и Л.Л. Лукасевич (Львов), которая дает возможность условного определения времени коагуляции фибрина.

В модифицированной методике ряд красителей производимых в Великобритании и США заменен на отечественные, химическая формула которых соответствует оригинальным зарубежным. Так Brilliant Crystal Scarlet 6R замененна кислотный красный, Marcius Gellow - на оранжевый G, Soluble Blue - на водный голубой (ОКГ). Цвет фибрина при окраске зависит от его физико-химической структуры. Изменения фибрина во времени приводят к различиям его взаимодействия с красителями и как следствие к изменению окраски. Спектр окраски фибрина по методике ОКГ (MSB) включает оранжевый, красный и фиолетовый цвета и переходные оттенки. Предполагается, что фибрин, который приобретает оранжевый цвет, является «молодым» (0-6 ч). При более длительном существовании фибрина в организме он приобретает красный цвет - «зрелый» фибрин (6-24 ч) - с наличием оттенков от оранжево-красного (6-12 ч) через ярко-красный (12-18 ч) до красно-фиолетового (18-24 ч). «Старый» фибрин (более 24 ч) фиолетового цвета, который впоследствии переходит в серо-голубой (более 48 ч). Такое деление весьма условно, так как, (по мнению авторов методики), зависит от фиксации, сроков приготовления красок, лечебных мероприятий, которые были использованы у больного.

Таблица 2 Пропись методики ОКГ (MSB)

Целестиновый синий	7 мин
Вода	3 - 5 мин
Гематоксилин	3 - 5 мин
Вода	5 мин
Оранжевый «G»	5 мин
Вода дистиллированная	4 мин
Кислотный красный	7 - 10 мин

Вода дистиллированная	4 мин
Фосфорновольфрамовая кислота	10 мин
Вода дистиллированная	4 мин
Водный голубой	5 - 7 мин
Вода дистиллированная	4 мин
Спирт	1 мин
Карбо-ксилол	4 мин
Ксилол	4 мин

Результат: фибрин - от желто-оранжевого до серо-голубого (в зависимости от «возраста»).

Приготовление растворов красителей. Раствор кислотного красного 2С: кислотный красный 2С - 0,5 г, ледяная уксусная кислота - 1.25 мл, дистиллированная вода - 48,75 мл. Раствор водного голубого: водный голубой - 0,25 мл, ледяная уксусная кислота - 0,5 мл дистиллированная вода - 49,5 мл. Раствор целестинового синего: 2,5 г железных квасцов растворить на ночь при комнатной температуре в 50 мл дистиллированной воды. Добавить 0,25 г целестинового синего и кипятить 3 мин. Охладить и профильтровать, добавить 1 мл глицерина. Сохраняется до года.

Таблица 3 Возраст фибрина

Метод	«возраст» фибрина			Соединительная ткань
	«молодой»	«зрелый»	«старый»	
ОКГ	Желтый	Красный	Переход от красного к голубому	Синий
ПКС	Красный	Красный	Синий	Темно-синий
КСЧ	Красный	Синий	Сине-черный	Бледно-голубой

ОКГ-оранж-красный-голубой
ПКС-пикриновый красный-синий
КСЧ- красный-сине-черный
Кислотный красный 2С (кислотный красный 14, кармизин, нафтиловый красный GR)
Кислотный желтый светопрочный 9 кислотный желтый II, феналановый желтый G, светопрочный желтый)
Кислотный сине-черный (кислотный черный I, нафтоловый сине-черный B)

Методика ОКГ № 1.

Срезы депарафинировать, промыть в дистилированной воде. Целестиновый синий - 5 минут. Вода водопроводная - 1 минута. Гематоксилин Майера -5 минут. Вода водопроводная - 1 минута. Дифференцировка в 0,25% HCl на 70 г спирте. Вода водопроводная -1 минута. Марциус желтый - 2

минуты. Вода дистилированная - 1 мин. Окрасить в 1% растворе кислотного красного 2С на 2,5% водном растворе уксусной кислоты – 10 минут. Вода дистиллированная – 1 мин. Фосфорновольфрамовая кислота 1% - 5 минут. Вода дистиллированная - 5 минут. 0,5% водный голубой на 1% водном растворе уксусной кислоты -10 минут. Промыть в дистиллированной воде. Спирты, ксилолы, бальзам.

Приготовление растворов красителей для ОКГ. 0,25% HCI в 70 г спирте: 96° спирт - 100 мл; вода дистиллированная - 39 мл; HCI концентрированная - 0,35 мл. Раствор марциуса желтого (или оранжевого): 69 г спирт, 50 мл марциус желтый можно заменить на марциус оранжевый равным соотношением. Раствор кислотно-красного 2С: кислотный красный 2С - 0,5 г, ледяная уксусная кислота (ЛУК) – 125 мл, вода дистиллированная 48,75 мл.

Раствор водного голубого: водный голубой -0,25 г, ледяная уксусная кислота (ЛУК) – 0,5, дистиллированная вода - 49,5.

Раствор целестинового синего: 2,5 гр. железных квасцов растворить на ночь при комнатной температуре в 50 мл дистиллированной воды. Добавить 0,25 г целестинового синего и кипятить 3 минуты. Охладить и профильтровать, добавить 1 мл глицерина. Сохраняется до 1 года.

Методика ОКГ № 2 (С-Петербург, Сафрай А.Е.)

Депарафинизация, довести до воды водопроводной, гематоксилин 3-15 минут, вода водопроводная - 10-158 минут, дистиллированная вода - 1 минута, окрасить срезы в растворе Марциуса желтого и оранжевого G – 2 минуты, вода дистиллированная – 1 минута, кислотно – красный – 10 минут, вода дистилированная – 1 минута, фосфорно-вольфрамовая кислота – 5 минут, вода дистилированная -1 минута, водный голубой 0,5% - 10 минут, вода дистилированная -1 минута, спирты, ксилолы, заключение в бальзам.

Результат: нити фибрина окрашиваются от красного (всех оттенков) до серо-голубого (в зависимости от возраста). Соединительная ткань в ярко-голубой цвет.

Оранжевый цвет – 0-6 часов.

Оранжево-красный – 6-12 часов.

Зрелый красный -6-24 часа.

Ярко-красный -12-18 часов.

Фиолетовый – 18-24 часа (старый фибрин – более 24 часов).

Серо-голубой – более 48 часов

Приготовление реактивов ОКГ по методике № 2

Оранжевый G: 50 мл 96° спирта + фофорно-вольфрамовой кислоты + 0,25 г оранж G.

Кислотно-ярко –красный: 1% кислотно-красного на 2,5% водном растворе уксусной кислоты (2,5 мл + 1 г кислотно-красного + 97,5 мл дистилированной воды).

Водный раствор фофорно-вольфрамовой кислоты: 100 мл (0,1) фосфорно-

вольфрамовой кислоты + 100 мл дистиллированной воды.
0,5 % водно-голубого + 1 мл уксусной кислоты + 99 мл дистилированной воды.

Окраска по Зербино
Выявление фибрина - метод ОКГ по Зербино.

Реагенты: 0,25 % солянокислый спирт - 139,35 мл; оранж G - 0,25 г; фосфорно-вольфрамовая кислота-1г и 0,5 г; кислотный красный 2С - 0,5 г; водный голубой - 0,25 г; 96% этанол - 50 мл; ледяная уксусная кислота - 1,25 и 0,5 мл; дистиллированная вода - 50+ 48,75+ 49,5 мл.

Приготовление растворов.

Раствор оранжа G - в 50 мл 96° этанола растворить оранж G и 1 г фосфорно-вольфрамовой кислоты.

1% раствор фосфорно-вольфрамовой кислоты - в 50 мл дистиллированной воды растворить 0,5 г фосфорно-вольфрамовой кислоты.

Раствор кислотного красного - в 48, 75 мл дистиллированной воды растворить кислотный красный 2с и добавить 1,25 мл ледяной уксусной кислоты.

Раствор водного голубого - в 49,5 мл дистиллированной воды растворить водный голубой и добавить 0,5 мл ледяной уксусной кислоты.

Примерный протокол окраски срезов методом ОКГ по Зербино Д.Д.

Приготовление растворов красителей.

0,25% HCl в 70° спирте: к 100 мл 96° спирта добавить 39 мл дистиллированной воды и 0,35 мл концентрированной соляной кислоты. Раствор оранжевого G: в 50 мл. 96° спирта добавить 0,25 г оранжевого G и 1 г фосфорно-вольфрамовой кислоты. Раствор кислотно-красного 2С (синоним - азофлоксин): в 48,75 мл дистиллированной воды растворить 0,5 г водного голубого, добавить 0,5 мл. ЛУК. Раствор водного голубого: в 49,5 мл дистиллированной воды растворить 0,25 мл водного голубого, добавить 0,5 мл ЛКУ. Раствор целестинового синего: 2,5 г железных квасцов растворить в течение 123 часов при комнатной температуре в 50 мл дистиллированной воды. Добавить 0,25 г целестинового синего и кипятить 3 мин. Охладить, профильтровать и добавить 1 мл глицерина. Срок годности до года.

Техника окраски. Удалить парафин из срезов в ксилоле и довести через спирты нисходящей крепости до дистиллированной воды. Окрасить ядра целестиновым синим 5 мин, промыть в воде и в гематоксилин Гарриса 1-2 мин или Майера 5 мин. Альтернативный вариант: окрасить срезы в железном гематоксилине Вейгерта 3-10 мин. Промыть в водопроводной воде (1 минуту). Дифференцировать окраску ядер в солянокислом спирте 0,25%. Промыть в водопроводной воде (1 минуту). Окрасить в растворе оранжа G 2 минуты. Промыть в дистиллированной воде (1 минуту). Окрасить в растворе 10% кислотного красного 2С на 2,5% водном растворе уксусной кислоты 10 минут. Промыть в дистиллированной воде (1 минуту). Поместить в 1% фосфорно-вольфрамовую кислоту на 5 минут. Промыть в дистиллированной воде (1 минуту). Окрасить в 1% растворе водного голубого уксусной кислоты 10

минут. Промыть в дистиллированной воде. Обезводить в спиртах восходящей крепости, просветлить в двух порциях орто-ксилола. Время пребывания срезов в каждой порции 1-2 мин. Заключить в полистирол или канадский бальзам.

Первые этапы обработки срезов и включающие окраску целестиновым синим и гемалаумом можно исключить, заменив их действием на срез железного гематоксилина Вейгерта.

В результате окраски «молодой» фибрин окрашивается в желтый цвет, «зрелый» - в красный, «старый» - в фиолетово-красный с переходом в серо-голубой, эритроциты – в оранжевый, соединительная ткань – в синий, мышечная ткань – в фиолетовый цвет.

Определение «возраста» фибрина по методике MSB (Marcius Scarlet Blue) или ОКГ (оранжевый-красный-голубой)

«Молодой» фибрин: желто-оранжевый (0 - 6 часов).

«Зрелый» фибрин: оранжево-красный (6 -12 часов), ярко-красный - (12 -18 часов), красно-фиолетовый - (18 - 24 часа).

«Старый» фибрин: фиолетовый(более 24 часов), серо-голубой - (более 48 часов), эритроциты – оранжевые, соединительная ткань - синяя, мышечная ткань – фиолетовая.

Примечание: в методике ОКГ заменены:

Brilliant Crystal Scarlet 6R - на кислотный красный

Marcius Gellow - на оранжевый G

Soluble Blue - на водный голубой (химическая формула отечественных красителей соответствует оригинальным зарубежным).

Забор материала

Необходимо отметить, что забор материала для гистологического исследования необходимо производить как можно раньше после наступления смерти. При изъятии трупного материала в области ссадины, участок кожного покрова вырезают, захватывая не только место повреждения, но и окружающие неповрежденные ткани в пределах 1-1,5 см. от края. Повреждения на слизистой оболочке изымают с подлежащими тканями. Для предохранения объектов от деформации, перед фиксацией, необходимо промокнуть ткани, освобождая их от крови и прикрепить к картонной подложке (желательна маркировка краев повреждения). Трупный материал из области кровоизлияния следует изымать не только из места наибольшего скопления крови, но и на границе с неизмененной тканью. Участок ткани забирается с таким расчетом, чтобы по возможности исключить влияние на микроскопическую картину трупных пятен и гипостазов. Края стенок раневого канала следует изымать совместно с неповрежденными кожными покровами. При глубокой ране аналогично изымают и участок мышечной ткани. Кусочки вырезаются острым ножом, пользоваться ножницами не рекомендуется во избежание размятия тканей. Длина и ширина объектов может быть произвольной, но толщина - не более 1-1,5 см. Объем фиксирующей жидкости должен превышать объем кусочков не менее чем в 10 раз. Необходимо следить, чтобы кусочки в растворе не слипались и не прилипали ко дну емкости. Для этого на дно кладут слой ваты, и

раствор периодически взбалтывают. Целесообразно произвести смену фиксирующего раствора в конце рабочего дня. При изъятии нескольких кусочков одной и той же ткани каждый из них маркируется этикеткой из материала, устойчивого к действию фиксирующей жидкости (фотобумага). Надписи на этикетках делают графитовым карандашом.

Для оценки давности повреждения необходим комплексный подход, основанный на использовании всех имеющихся в распоряжении медицинского судебного эксперта данных (обстоятельств дела, результатов судебно-медицинского исследования трупа, лабораторных данных, в том числе и гистологических).

Перечень использованных источников:

1. «Инструкция по организации и производству судебно-медицинской экспертизы» (Приказ МЗ РК от 20 мая 2010г. № 368) - Астана, 2010.
2. Меркулов Г.А. Курс патологогистологической техники. - 1967.
3. Микроскопическая техника: Руководство / Под редакцией Саркисова Д.С. и Перова Ю.Л.- М.: Медицина, 1996. ISBN 5-225-02-820-9).
4. Пиголкин Ю.И., Касумова С.Ю., Туманов В.П., Ольховик В.П., Барановой М.Я., Богомолов Д.В., Аманмурадов А.М. Судебно-медицинская диагностика хронических субдуральных гематом. Методические рекомендации. / — М.: Минздрав РФ, 1998. — 9 с.
5. Методические рекомендации «Судебно-медицинская диагностика хронических субдуральных гематом» (№ 98/247 утв. МЗ РФ 18.01.99.) Российского центра судебно-медицинской экспертизы, Москва, 2000. \Методические рекомендации подготовлены сотрудниками танатологического отдела Российского центра судебно-медицинской экспертизы МЗ РФ: заведующим отделом профессором Ю.И. Пиголкиным, старшими научными сотрудниками - С. Ю. Касымовой, В. П. Тумановым, В. П. Ольховиком, М. Я Барановой, Д В. Богомоловым и н.с. А.М. Аманмурадовым.\).
6. Ахмедов Э.А., Касумов Р.Д., Берснев В.П., Валерко В.Г., Касумов В.Р. Хронические субдуральные гематомы: диагностика, методы лечения. ФГУ Российский научно-исследовательский нейрохирургический институт им. проф. А.Л. Поленова, Санкт-Петербург, Россия