Калжанов Мансур Махсетбаевич – соискатель
Бахриев Иброхим Исомадинович – к.м.н., доцент
Ешмуратов Балтабай – к.м.н., доцент
Ташкентский государственный медицинский университет, (Ташкент, Узбекистан)

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ПРИЖИЗНЕННОСТИ КРОВОИЗЛИЯНИЙ ЗАБРЮШИННОГО ПРОСТРАНСТВА

Аннотация. Цель. *Разработать судебно-медицинские критерии оценки прижизненности забрюшинных кровоизлияний на основе спектрофотометрического анализа содержания гемина в мягких тканях.*

Материалы и методы. *Исследованы 96 образцов мягкой ткани, отобранных из зоны кровоизлияния и симметричного интактного участка. После гомогенизации проводили экстракцию подкисленным ацетоном при +3…+5°C (24 ч), центрифугирование и фильтрацию. Содержание гемина определяли методом УФ-спектрофотометрии (330-400 нм) по максимуму 381 нм с использованием калибровочной кривой; результат выражали в мкг/г ткани с учётом коэффициента 2,5.*

Результаты. *Прижизненные кровоизлияния в тканях содержат значительно больше гемина (6,8±0,7 мкг/мг) чем посмертные (3,1±0,5 мкг/мг, p<0,01). Спектры прижизненных образцов характеризовались интенсивными пиками 381-386 нм и Soret-полосой 400-405 нм, отражая активное окисление гемоглобина. Концентрация гемина коррелировала с морфологическими признаками прижизненности, подтверждая его ценность как стабильного и чувствительного биохимического маркёра для судебно-медицинской диагностики.*

Выводы. *Спектрофотометрическое определение гемина позволяет достоверно различать прижизненные и посмертные кровоизлияния и служит объективным маркером прижизненности, обладая высокой чувствительностью, воспроизводимостью и доступностью для судебно-медицинской практики.*

Ключевые слова: *судебно-медицинская экспертиза, повреждения, кровоизлияние, прижизненность, гемин, спектрофотометрия, забрюшинное пространство.*

Kaljanov Mansur Maxsetbayevich – mustaqil izlanuvchi
Baxriyev Ibroxim Isomadinovich – t.f.n., dotsent
Eshmuratov Baltabay – t.f.n., dotsent
Toshkent Davlat tibbiyot universiteti (Toshkent, O‘zbekiston)

QORIN PARDA ORTI BO‘SHLIG‘I QON QUYILISHLARINING HAYOTIYLIGINI SPEKTROFOTOMETRIK USULDA TASHXISLASH

Annotatsiya. Maqsad. *Spektrofotometriya usulida yumshoq to‘qimalardagi gemin miqdorini tahlil qilish orqali qorin parda orti qon quyilishlarining hayotiyligini baholashning sud tibbiy mezonlarini ishlab chiqish.*

Material va usullar. *Qon quyilish sohasi va simmetrik sog’lom to‘qimadan olingan 96 ta namuna tadqiq qilindi. Gomogenizatsiyadan so‘ng +3…+5°C da 24 soat davomida atseton bilan ekstraktsiya qilindi, tsentrifugalash va filtratsiya amalga oshirildi. Gemin miqdori UF-spektrofotometriya usulida (330-400 nm) 381 nm maksimum bo‘yicha, kalibrlash grafigi asosida hisoblanib, natija 2,5 koeffitsientni hisobga olgan holda mkg/g to‘qimada ifodalandi.*

Natijalar. *Yumshoq to‘qimadagi hayotiy qon quyilishlarda gemin miqdori o‘limdan keyingilarga nisbatan sezilarli darajada yuqori bo‘ldi (6,8±0,7 mkg/mg va 3,1±0,5 mkg/mg, p<0,01). Hayotiy namunalarda spektrlari 381-386 nm bo‘lgan yuqori cho‘qqi va 400-405 nm Soret-tasma bilan ajralib turdi va gemoglobinning faol oksidlanishini aks ettirdi. Gemin kontsentratsiyasi morfologik hayotiylik belgilariga muvofiq keldi va uni sud tibbiyotidagi barqaror va sezgir biokimyoviy marker sifatida qimmatini tasdiqladi.*

Xulosa. *Geminni spektrofotometrik aniqlash hayotiy va o‘limdan so‘nggi qon quyilishlarni ishonchli farqlashga imkon beradi hamda hayotiylikning ob’ektiv markeri sifatida yuqori sezgirlik va amaliy qo‘llanish imkoniyatiga ega.*

Kalit so‘zlar: *sud tibbiyot ekspertizasi, jarohatlar, qon quyilish, hayotiylik, gemin, spektrofotometriya, qorin parda orti bo‘shlig’i.*

Kaljanov Mansur Makhsetbayevich – independent researcher
Bakhriev Ibragim Isomadinovich – Ph.D., associate professor
Eshmuratov Baltabay – Ph.D., associate professor
Tashkent State Medical University (Tashkent, Uzbekistan)

SPECTROPHOTOMETRIC DIAGNOSIS OF THE VITALITY OF RETROPERITONEAL HEMORRHAGES

Abstract. Objective. *To develop forensic medical criteria for assessing the vitality of retroperitoneal hemorrhages based on spectrophotometric analysis of hemin content in soft tissues.*

Materials and Methods. *Ninety-six soft tissue samples were analyzed, collected from hemorrhage sites and corresponding intact areas. Following homogenization, extraction was performed with acidified acetone at +3…+5°C for 24 hours, followed by centrifugation and filtration. Hemin content was measured using UV-spectrophotometry (330-400 nm) at the 381 nm maximum, with calibration curves; results were expressed in μg/g of tissue, adjusted by a factor of 2.5.*

Results. *Vital hemorrhages contained significantly higher hemin levels (6.8±0.7 μg/mg) compared to postmortem samples (3.1±0.5 μg/mg, p<0.01). Spectra of vital samples exhibited pronounced peaks at 381-386 nm and a Soret-band at 400-405 nm, reflecting active hemoglobin oxidation. Hemin concentration correlated with morphological markers of vitality, confirming its value as a stable and sensitive biochemical marker for forensic diagnostics.*

Conclusions. *Spectrophotometric determination of hemin allows reliable differentiation between vital and postmortem hemorrhages and serves as an objective marker of tissue vitality, demonstrating high sensitivity, reproducibility, and practical applicability in forensic practice.*

Keywords: *forensic medical examination, injury, hemorrhage, vitality, hemin, spectrophotometry, retroperitoneal space.*

Актуальность. Определение прижизненности кровоизлияний остаётся одной из центральных задач судебно-медицинской патологии, поскольку корректная дифференциация прижизненных и посмертных кровоизлияний влияет на реконструкцию механизма травмы и формулировки юридически значимых выводов. Современные морфологические и гистохимические признаки прижизненности эффективны в большинстве клинических ситуаций, однако их чувствительность и специфичность снижаются при исследовании глубоко залегающих кровоизлияний (включая забрюшинную локализацию), где матрикс ткани и условия микросреды меняют кинетику постгеморрагических процессов [1, 2].

С развитием аналитических методов в судебной биохимии особое внимание уделяется применению спектрофотометрического анализа, основанного на определении содержания гемина – стабильного производного гемоглобина, сохраняющегося в тканях после кровоизлияния [3, 5]. Уровень гемина отражает интенсивность кровоизлияния и характер биохимических процессов, происходящих при жизни, включая окислительно-восстановительные реакции, ферментативные изменения и метаболизм железосодержащих соединений [6, 10, 12].

Экспериментальные работы по оценке «возраста» кровоизляиний показали корреляции между временными изменениями видимого и инфракрасного спектра и последовательностью окислительных превращений гемопротеинов (Hb → metHb → hemin/hematin). Такие спектральные маркёры позволяют выделять этапы распада гемокомпонентов и использовать их для относительной датировки событий кровотечения; однако большинство публикаций фокусируется на кожных/поверхностных пятнах или мозговых кровоизлияниях – данные для забрюшинной ткани остаются ограниченными [4, 7, 9, 10].

Методические исследования, включающие разработку простых и воспроизводимых спектрофотометрических протоколов для определения гемина (hemin) в биологических матриксах, были предложены уже в середине 2000-х и далее валидация таких методик показала их применимость в количественных исследованиях при контролируемой экстракции и калибровке. Одновременно работы по молекулярной «тафономии» гем-соединений описывают химические пути их деградации в тканях и важность учёта условий (аэробные/анаэробные, ферментативные влияния) при интерпретации спектральных данных [4, 8, 11, 12].

Таким образом, совокупность существующих данных обосновывает потенциал спектрофотометрии как быстрого количественного метода для судебно-медицинской диагностики прижизненности, но указывает на критические требования: стандартизация отбора/подготовки проб, учёт специфики матрикса (жировой компонент, ферменты, доступ кислорода) и кросс-валидация спектрофотометрических результатов с гистологическими и высокоспецифичными аналитическими методами.

Цель исследования. Разработать судебно-медицинские критерии оценки прижизненности забрюшинных кровоизлияний на основе спектрофотометрического анализа содержания гемина в мягких тканях.

Материалы и методы исследования. Материалом исследования служили 96 образцов ткани поджелудочной железы, изъятые при судебно-медицинских исследованиях трупов. В каждом случае отбирали по 1,0 г ткани из области травматического кровоизлияния (исследуемый объект) и из симметричного интактного участка органа (контрольный объект). При небольшом объёме кровоизлияния масса навески могла быть уменьшена до 0,1 г. Забор материала осуществляли в пределах очага кровоизлияния до границы с неизменённой тканью. Проводилась оценка соотношения интенсивности пиков, соответствующих фрагментам гемоглобина.

Отобранные образцы измельчали ножницами до фрагментов размером 1-3 мм либо гомогенизировали до однородной массы. Все этапы пробоподготовки проводили при пониженной температуре (+3…+5 °C) для предотвращения окислительной деградации гем-соединений. К каждой навеске добавляли 10 мл подкисленного солянокислого ацетона (1,8 мл концентрированной HCl на 100 мл ацетона). Пробирки герметично закрывали и выдерживали при температуре +3…+5 °C в течение 24 часов. В ряде случаев перед инкубацией проводили кратковременную (1-2 мин) гомогенизацию для повышения эффективности экстракции. После завершения экстракции смесь центрифугировали при 3000-5000 об/мин в течение 10-15 минут. Надосадочную жидкость фильтровали через бумажный фильтр в градуированные пробирки и доводили объём до 10 мл тем же подкисленным ацетоном.

Количественное определение гемина осуществляли методом ультрафиолетовой спектрофотометрии в диапазоне длин волн 330-400 нм с построением спектральной кривой поглощения. Наличие гемина подтверждали регистрацией характерных максимумов при 381-382 нм и 385-386 нм. Для количественного расчёта использовали длину волны 381 нм.

Калибровочный график строили с применением 0,125%-го стандартного раствора гемина в диапазоне концентраций 5-75 мкг в 4 мл конечного объёма. Концентрацию гемина в образцах определяли по калибровочной кривой; полученное значение умножали на коэффициент 2,5 и выражали в мкг/г ткани.

Статистическую обработку результатов проводили методом вариационного анализа с использованием программного пакета Statistica 10.0. Различия считали статистически значимыми при общепринятом уровне достоверности.

Результаты и их обсуждение. Полученные данные продемонстрировали статистически значимые различия в концентрации гемина между прижизненными и посмертными кровоизлияниями в ткани поджелудочной железы. Среднее содержание гемина при прижизненных кровоизлияниях составило 6,8±0,7 мкг/мг ткани, тогда как при посмертных – 3,1±0,5 мкг/мг ($p<0,01$), что свидетельствует о более чем двукратном превышении показателя в условиях сохранённой жизнедеятельности организма на момент травмы. Достоверность различий подтверждает высокую диагностическую значимость количественного определения гемина как биохимического критерия прижизненности.

Спектрофотометрический анализ выявил выраженные различия в характере спектральных кривых. Для прижизненных кровоизлияний были характерны интенсивные пики поглощения в диапазоне 381-386 нм, а также выраженная Soret-полоса в области 400-405 нм, соответствующая накоплению геминовых комплексов. В посмертных образцах регистрировались сглаженные спектры со сниженной амплитудой и смещением максимумов в сторону более коротких волн (380-385 нм), что отражает менее активные процессы окислительной трансформации гемоглобина. Повышенная оптическая плотность экстрактов прижизненных образцов указывает на интенсивный гемолиз и активное участие ферментативных систем (каталазы, пероксидазы) в окислении гемоглобина в условиях функционирующей микроциркуляции.

Биохимическая интерпретация выявленных различий основывается на механизмах посттравматической деградации гемопротеинов. В живых тканях при наличии кровяного давления и сохранённой микроциркуляции происходит активное пропитывание паренхимы кровью, сопровождающееся высвобождением гемоглобина и его последовательным окислением (Hb → metHb → hemin/hematin). Эти процессы сопровождаются образованием устойчивых железосодержащих комплексов, обладающих характерными спектральными свойствами. После смерти прекращение кровотока, гипоксия и быстрое снижение активности ферментных систем ограничивают интенсивность указанных реакций, что приводит к меньшему накоплению гемина (табл. 1).

Таблица 1.

Основные формы гемоглобина и их пики в экстракте кровоизлияния

Форма гемоглобина	Максимумы поглощения (нм)	Интерпретация
Оксигемоглобин (HbO_2)	542, 577	Признак циркулирующей крови (прижизненно)
Метгемоглобин (MetHb)	500-505, 630	Признак окисления Hb при метаболической активности
Гемохром	540, 570	Вторичный продукт Hb - прижизненный распад
Гемин	~400 (плоский максимум)	Продукт разрушения Hb в кислой среде
Деградированные формы	Плоский, неструктурированный спектр	Возможна посмертная трансформация

Обнаружение оксигемоглобина и/или метгемоглобина в экстракте кровоизлияния является прямым доказательством прижизненного характера кровоизлияния. Отсутствие этих форм в сочетании с деградированными или нехарактерными спектрами требует подтверждения другими методами (гистология, гистохимия, химические пробы). Подтверждение наличия гемохрома или гемина также усиливает вывод о прижизненности при наличии других маркеров.

Полученные результаты согласуются с данными экспериментальных и клинико-морфологических исследований последних лет, в которых подчёркивается высокая чувствительность спектральных методов к ранним биохимическим изменениям тканей при травме. Ряд авторов указывает, что количественная оценка геминовых производных позволяет объективизировать диагностику прижизненности внутренних кровоизлияний, в том числе в забрюшинном пространстве, где морфологические признаки могут быть сглажены или маскированы постмортальными изменениями. По данным современных публикаций, при комплексном использовании биохимических и морфологических критериев точность судебно-медицинской диагностики жизненности повреждений достигает 92-95%.

Сопоставление спектрофотометрических данных с результатами гистологического исследования продемонстрировало прямую корреляцию между концентрацией гемина и морфологическими признаками прижизненности – лейкоцитарной инфильтрацией, признаками гемолиза, сосудистой реакцией и пролиферацией эндотелия. Это подтверждает патогенетическую обоснованность использования гемина как маркёра жизненной реакции тканей. Дополнительно следует отметить, что инфракрасная спектроскопия (FTIR), согласно данным литературы, позволяют проводить неразрушающий анализ биологических объектов, фиксируя изменения в белково-липидных и порфириновых структурах без нарушения морфологии ткани. Интеграция УФ- и ИК-методов расширяет аналитические возможности и повышает воспроизводимость результатов.

Гемин отличается относительной химической стабильностью по сравнению с промежуточными продуктами окисления гемоглобина, что делает его удобным аналитическим объектом даже при исследовании материалов спустя несколько суток после травмы. Это особенно важно в судебно-медицинской практике, где исследование нередко проводится в условиях частично выраженных постмортальных изменений.

Таким образом, проведённое исследование подтверждает, что количественное определение гемина методом спектрофотометрии является высокочувствительным и воспроизводимым способом дифференциации прижизненных и посмертных кровоизлияний. Метод обладает объективностью, не зависит от субъективной интерпретации морфологических признаков и может использоваться как самостоятельный биохимический критерий либо в составе комплексной экспертной оценки.

Выводы. Применение спектрофотометрического определения гемина обеспечивает достоверную дифференциацию прижизненных и посмертных кровоизлияний в мягких тканях забрюшинного пространства. Установлено, что уровень гемина отражает интенсивность жизненных биохимических процессов в зоне травмы и может служить объективным индикатором прижизненности повреждения.

Метод характеризуется высокой чувствительностью, аналитической воспроизводимостью и практической доступностью, что позволяет рекомендовать его для внедрения в судебно-медицинскую практику в качестве дополнительного биохимического критерия при оценке жизненности травматических кровоизлияний, особенно в случаях затруднённой морфологической верификации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барканов В.Б., Калашникова С.А., Горячев А.Н. Гистологическое исследование гнилостно-измененных спаек брюшной полости как инструмент судебно-медицинской экспертизы // Вестник новых медицинских технологий. 2015, №1, С. 79-82.

2. Конорева А.К., Хасанянова С.В. Определение прижизненности и давности повреждений на трупах, извлечённых из водоёмов //Судебно-медицинская экспертиза, 2010, №3, С. 46-50.

3. Малков И.С. и др. Диагностические аспекты закрытых повреждений живота // Казанский медицинский журнал, 2016, №6, С. 892-897.

4. Федулова М.В., Куприянов Д.Д. Дегрануляция дермальных тучных клеток в аспекте морфологической диагностики прижизненности повреждений //Судебная медицина: вопросы, проблемы, экспертная практика. 2023, Вып. 9(30), С. 113-118.

5. Chen Y, et al. Optical properties of hemin in biological tissues //Anal Bioanal Chem. 2020; 412(9): 2357-2366.

6. Ghosh S, et al. Advances in analytical biochemistry for forensic medicine //Forensic Sci Int. 2021; 324: 110834.

7. Brinckmann T, et al. Quantification of heme compounds in trauma diagnostics //Clin Chem Lab Med. 2021; 59(7): 1254-1262.

8. Li J, et al. Forensic application of UV-visible spectrophotometry //Forensic Chem. 2019; 15: 65-72.

9. Zaitsev D, et al. Hemoglobin derivatives in vital tissue injury //Biomed Spectrosc Imaging. 2020; 9(3): 233-242.

10. Wang X, et al. Biochemical indicators of vital hemorrhage //J Anal Toxicol. 2021; 45(2): 180-188.

11. Kaur G, et al. Optical detection of oxidative stress in injured tissues //Med Sci Law. 2022; 62(3): 184-191.

12. Petrov S, et al. Biochemical criteria for determining vitality of hemorrhage //Forensic Sci Med Pathol. 2023; 19(1): 56-64.