

► <http://dx.doi.org/10.19048/2411-8729-2019-5-3-28-32>

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПАРАМЕТРОВ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ ДЛЯ УСТАНОВЛЕНИЯ ДЛИТЕЛЬНОСТИ АГОНАЛЬНОГО ПЕРИОДА

И. С. Эделев², Л. М. Обухова³, Н. А. Андриянова¹, Н. С. Эделев^{1,2*}

¹ГБУЗ НО «Нижегородское областное бюро судебно-медицинской экспертизы», Нижний Новгород, Российская Федерация

²Кафедра клинической судебной медицины ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, Нижний Новгород, Российская Федерация

³Кафедра биохимии ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, Нижний Новгород, Российская Федерация

Аннотация. В представленной статье приведены исследования в случаях смерти с длительным постмортальным периодом.

Цель. Установление длительности агонального периода. Для реализации этой цели была поставлена задача изучить особенности окислительной модификации белков сыворотки крови в случаях смерти с длительным агональным периодом.

Материал и методы. Во всех экспериментах исследовалась жидкая кровь от 54 трупов лиц обоего пола, умерших в результате насильственной и ненасильственной смерти, в возрасте от 13 до 89 лет. Определение окислительной модификации белков (ОМБ) проводили по уровню карбонильных производных, выявляемых в реакции с 2,4-динитрофенилгидразином. Определяли уровень абсолютной и относительной (в пересчете на белок) суммарной окислительной модификации белков сыворотки крови трупов при длительном агональном периоде по сравнению с коротким. Длительность агонального периода определяли анализом сведений об обстоятельствах наступления смерти и следственных данных, с разрешения органа или лица, назначившего экспертизу, а также учитывали особенности секционной картины, исследования трупов.

Результаты. Установлена зависимость уровня окислительной модификации белков сыворотки крови от длительности агонального периода. Значение суммарной окислительной модификации белков сыворотки крови (в пересчете на белок) при длительном агональном периоде снижалось на 45,46%. Данные исследования показали, что параметры окислительной модификации белков сыворотки крови с учетом всех привходящих факторов могут послужить для разработки критериев установления длительности агонального периода, а также повышению доказательственной значимости судебно-медицинских экспертных исследований.

Ключевые слова: окислительная модификация белков, длительность, танатогенез

PROSPECTS FOR THE USE OF THE PARAMETERS OF OXIDATIVE MODIFICATION OF SERUM PROTEINS FOR ASSESSMENT OF THE AGONAL PERIOD DURATION

I. S. Edelev², L. M. Obukhova³, N. A. Andriyanova¹, N. S. Edelev^{1,2*}

¹Nizhnii Novgorod Regional Bureau of Forensic Medicine, Nizhnii Novgorod, Russian Federation

²Department of Clinical Forensic Medicine, Privolzhskii Research Medical University, Nizhnii Novgorod, Russian Federation

³Department of Biochemistry, Privolzhskii Research Medical University, Nizhnii Novgorod, Russian Federation

Abstract. In the article we present results of the studies in cases of death with a long agonal period to determine the length of the agony.

Objectives. The task was to examine the features of oxidative modification of serum proteins in cases of deaths with a long agonal period.

Material and methods. In all experiments we analyzed the liquid blood sampled from 54 corpses of persons of both sexes who died from the violent and natural death in age of 13 to 89 years. The assessment of the oxidative modification of proteins (OMP) was performed by the level of carbonyl derivatives detected in the reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine. The levels of absolute and relative (in terms of protein) total OMP in cases of long agonal period were compared with the counterpart levels in cases of the short agony. The duration of the agony was determined using information about the circumstances of the case and investigative data with the permission of the authority ordered the forensic examination. The autopsy data also were taken into account.

• Received: 02.04.2019 • Accepted: 03.09.2019

Для цитирования: Эделев И. С., Обухова Л. М., Андриянова Н. А., Эделев Н. С. Перспективы использования параметров окислительной модификации белков сыворотки крови для установления длительности агонального периода. *Судебная медицина*. 2019;5(3):28-32. <http://dx.doi.org/10.19048/2411-8729-2019-5-3-28-32>.

For reference: Edelev I. S., Obukhova L. M., Andriyanova N. A., Edelev N. S. Prospects for the use of the parameters of oxidative modification of serum proteins for assessment of the agonal period duration. *Russian Journal of Forensic Medicine*. 2019;5(3):28-32. (In Russ.) <http://dx.doi.org/10.19048/2411-8729-2019-5-3-28-32>.

Results. We revealed the dependence of the OMP level on the duration of the agonal period. The total OMP (in terms of protein) in cases of long agony have decreased by 45.46%. The data obtained have showed that the parameters of the OMP, taking into account all the relevant factors, can be used to develop criteria for establishing the duration of the agonal period as well as to increase the evidence-based significance of medico-legal conclusions.

Keywords: oxidative modification of proteins, duration, thanatogenesis

ЭДЕЛЕВ Николай Серафимович – д.м.н., проф., начальник ГБУЗ НО «НОБСМЭ», заведующий кафедрой клинической судебной медицины ФГБОУ ВО ПИМУ МЗ РФ [Nikolai S. Edelev, Dr. Sci. (Med.), Prof., main place of work: Nizhni Novgorod Regional Bureau of Forensic Medicine, 70 Gagarin Ave, Nizhni Novgorod, 603104, Russian Federation] • **603104, г. Нижний Новгород, пр-т Гагарина, д. 70** • sudmedex-nn@mail.ru • {ORCID: 0000-0002-7341-8833}

Оценка особенностей и длительности агонального периода чрезвычайно важна для установления скорости наступления смерти, что нередко имеет решающее значение для выявления обстоятельства дела, а также при разрешении вопросов о своевременности и полноте проведенных лечебных и реанимационных мероприятий в случаях расследования дел о профессиональных правонарушениях медицинских работников. Вышеизложенное свидетельствует об актуальности разработки новых способов, критериев для ответов на поставленные следствием вопросы.

В связи с этим интерес к проблеме определения особенностей танатогенеза неуклонно возрастает, что обусловлено новыми требованиями к работе судебно-медицинского эксперта и ее результатам. Для полного, объективного, научно обоснованного судебно-медицинского заключения о причине смерти необходим всесторонний анализ характеристик агонального периода [1]. На сегодняшний день использование для этой цели макроморфологического исследования и стандартных лабораторных исследований недостаточно, поскольку нередко выявляются различные несоответствия между клиническим и секционным диагнозами [2], что, в свою очередь, обусловило разработку и внедрение в судебно-медицинскую практику новых маркеров характеристики особенностей агонального периода.

В настоящее время в этом направлении имеются научные исследования, посвященные использованию биохимических показателей крови и мочи [3–5].

Одним из перспективных может быть исследование свободнорадикальных процессов в биологическом материале при патологических состояниях. Белки, в силу особенностей своего строения, одними из первых подвергаются действию активных форм кислорода, в связи с чем окислительная модификация белков (ОМБ) служит одним из ранних и наиболее надежных маркеров окислительного стресса [6]. В доступной литературе была обнаружена только одна статья [7], в которой свободнорадикальная активность, определенная методом индуцированной биохемилюминесценции, предлагалась к использованию в судебно-медицинской экспертизе для определения давности и прижизненности механической травмы.

В связи с вышеизложенным *целью* данной работы стало изучение особенностей окислительной модификации белков сыворотки крови для установления длительности агонального периода.

♦ МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Проводилось исследование активности свободнорадикального окисления и окислительной модификации белков в сыворотке крови от 54 трупов лиц обоего пола, умерших в результате насильственной и ненасильственной смерти, в возрасте от 13 до 89 лет. Длительность агонального периода делилась на две группы. Первую группу составили 44 случая смерти с коротким агональным периодом, который не превышал 2 часов. Другую группу составили 10 случаев смерти от онкологических

заболеваний как пример танатогенеза, характеризующегося длительным, не менее 6 часов, агональным периодом [8].

Длительность агонального периода определялась анализом сведений об обстоятельствах наступления смерти и следственных данных (протокол осмотра места происшествия, показания свидетелей, имеющаяся медицинская документация); с разрешения органа или лица, назначившего экспертизу, у родственников узнавались обстоятельства, заболевания, травмы, вредные привычки, общее состояние здоровья перед наступлением смерти. Также учитывалась особенность секционной картины; исследование трупов производилось в соответствии с Приказом Минздравсоцразвития РФ от 12.05.2010 № 346н, п. 4 «Особенности порядка организации и проведения экспертизы трупа», в период от 6 до 12 часов с момента наступления смерти, с обязательным судебно-гистологическим и судебно-химическим исследованием.

Забор крови осуществлялся при аутопсии в срок не более 35 часов после наступления смерти в количестве 10,0 мл сухим шприцем из бедренной вены трупа в стерильную склянку согласно параграфу VII гл. 88 Приказа № 346н «Об утверждении порядка организации и производства судебно-медицинских экспертиз в государственных судебно-экспертных учреждениях Российской Федерации».

Определение окислительной модификации белков (ОМБ) проводилось по уровню карбонильных производных, выявляемых в реакции с 2,4-динитрофенилгидразином [9]. Метод основан на реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков белков с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ) с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов, которые регистрируют спектрофотометрически. В результате ОМБ наблюдается появление карбонильных производных, которые в присутствии 2,4-ДНФГ образуют 2,4-динитрофенилгидразоны. Оптическую плотность соединений регистрировали при длинах волн 230, 270, 370, 430, 530 нм.

Суммарную ОМБ определяли сложением всех значений на вышеуказанных длинах волн.

Количественное определение белков в растворе проводили методом Лоури (набор реагентов для определения белка, производитель ООО «Фирма Синтакон», Санкт-Петербург, Россия).

Кроме того, регистрировалось соотношение суммарной ОМБ и общего белка в сыворотке крови – суммарная ОМБ/Белок.

Статистический анализ был проведен с помощью программного обеспечения StatPlus компании AnalystSoft, 2018. Для выявления различий между выборками использовали U-критерий Манна – Уитни, различия считались статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Для оценки корреляционной связи данных двух выборок применяли корреляцию по Спирмену.

Таблица 1. Уровень суммарной окислительной модификации белков сыворотки крови при разной длительности агонального периода
Table 1. The level of the total oxidative modification of serum proteins in various lengths of the agonal period

| | Короткий агональный период | Длительный агональный период |
|---|----------------------------|------------------------------|
| Суммарная ОМБ, усл. ед. | 1,289 ± 0,133 | 0,759 ± 0,163 |
| Уровень значимости различий по критерию Манна – Уитни | | p = 0,046 |
| Суммарная ОМБ/белок, усл. ед. | 0,011 ± 0,002 | 0,006 ± 0,001 |
| Уровень значимости различий по критерию Манна – Уитни | | p = 0,041 |

♦ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении ОМБ сыворотки крови при коротком и длительном агональном периоде были получены следующие результаты (табл. 1).

Были выявлены статистически значимые различия между уровнем суммарной ОМБ при коротком агональном периоде ($p = 0,046$) (рис. 1). Исследованные выборки значительно отличались по содержанию общего белка в сыворотке крови, что не могло не повлиять на полученные количественные показатели, в связи с чем было принято решение рассмотреть, каким образом меняется соотношение суммарной окислительной модификации белков к концентрации белка в сыворотке крови (табл. 1).

Подобный пересчет привел к еще большему увеличению различий между группами, характеризующимися длительным агональным периодом и короткой агонией ($p = 0,041$) (рис. 1). Значение суммарной окислительной модификации белков сыворотки крови при длительном агональном периоде снижалось по сравнению с контрольной группой на 41,12 %. При использовании относительных значений ОМБ (в пересчете на белок) снижение составило 45,46 %.

Зависимость уровня относительного суммарного ОМБ крови в пересчете на белок от длительности агонального периода была подтверждена и корреляционным анализом с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена – был выявлен статистически значимый уровень взаимосвязи между этими параметрами ($R = -0,569$).

Различия в показателях значений суммарного ОМБ крови, по нашему мнению, обусловлены тем, что короткий агональный период характеризуется развитием острых стрессовых реакций, которые характеризуются прежде всего выбросом катехоламинов, в том числе адреналина. Адреналин способен активировать процессы свободнорадикального окисления [10]. Одним из механизмов такого влияния является окисление адреналина до адренохрома с образованием реакционноспособных хинонов, что сопровождается одноэлектронным восстановлением кислорода и появлением супероксид анион-радикала [11]. Кроме того, адреналин в высоких концентрациях способен напрямую инактивировать один из основных антиоксидантов – глутатион. Также через гиперстимуляцию адренорецепторов высокие концентрации адреналина активируют фосфолипазы и вызывают дисбаланс Ca^{2+} с последующим каскадом реакций усиления синтеза простагландинов и образования активных форм кислорода в процессе их метаболизма.

Активация свободнорадикального окисления, вызванная активацией симпато-адреналовой системы организма, провоцирует окислительную модификацию белков крови. При длительном темпе умирания такого выброса катехоламинов не наблюдается, и, хотя тканевая гипоксия, также запускающая свободнорадикальные процессы, локально активируется, такого значимого влияния, как в случае быстрой смерти, не наблюдается.

♦ ВЫВОДЫ

Выявлена зависимость окислительной модификации белков сыворотки крови трупа от длительности агонального периода. Параметры окислительной модификации белков сыворотки крови с учетом привходящих факторов могут послужить для разработки критериев установления длительности агонального периода.

♦ ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Mazeikiene S., Laima S., Chmieliauskas S., Fomin D., Andriuskeviciute G., Markeviciute M., Matuseviciute A., Yasulaitis A., Stasiuniene J. Deontological examination: Clinical and forensic medical diagnoses discrepancies. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*. 2016;6(4):323-327. <https://doi.org/10.1016/j.ejfs.2016.02.003>
- Rutty G. N., Duerden R. M., Carter N., Clark J. C. Are coroners' necropsies necessary? A prospective study examining whether a "view and grant" system of death certification could be introduced into England and Wales. *J Clin Pathol*. 2001;54(4):279-284. <http://doi.org/10.1136/jcp.54.4.279>
- Обухова Л. М., Эделев Н. С., Андриянова Н. А., Эделев И. С. Определение содержания миоглобина в крови в судебно-медицинской практике: методические особенности и перспективы. *Судебно-медицинская экспертиза*. 2016;(4):57-60. [Obukhova L. M., Edelev N. S., Andriyanova N. A., Edelev I. S. Determination of the blood myoglobin levels for the purpose of forensic medical expertise: The methodological peculiarities and the prospects for the further use. *Sudebno-meditsinskaya ekspertiza*. 2016;(4):57-60. (In Russ.)] <http://doi.org/10.17116/sudmed201659457-60>
- Эделев Н. С., Андриянова Н. А., Эделев И. С. Изучение влияния причины смерти, давности забора и температуры хранения трупной крови на концентрацию миоглобина. *Медицинская экспертиза и право*. 2016;(6):47-50. [Edelev N. S., Andri-

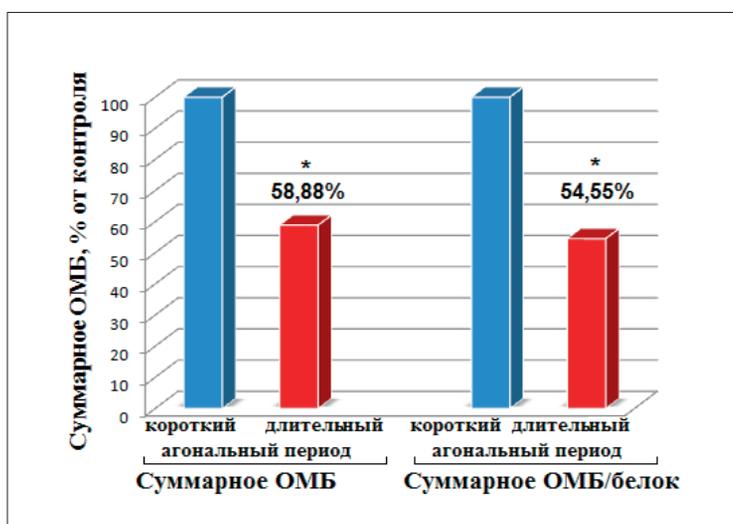


Рис. 1. Различия в абсолютном и относительном (в пересчете на белок) значении суммарной окислительной модификации белков сыворотки крови (короткий агональный период=100%) * $p < 0,05$, различия между группами статистически значимы

Fig. 1. Differences in the absolute and relative (in terms of protein) values of the total oxidative modification of serum proteins (short agonal period = 100%)

- yanova N. A., Edelev I. S. Izuchenie vliyaniya prichiny smerti, davnosti zabora i temperatury khraneniya trupnoi krovi na kontsentratsiyu mioglobina. *Meditsinskaya ekspertiza i pravo*. 2016;(6):47-50. (In Russ.)]
- Эделев Н. С., Эделев И. С. Посмертные изменения соотношения уровня содержания веществ низкой и средней молекулярной массы в сыворотке крови и моче. *Медицинская экспертиза и право*. 2017;(5):49-51. [Edelev N. S., Edelev I. S. Posthumous changes of the ratio of level of content of substances of low and medium molecular weight in serum of blood and urine. *Meditsinskaya ekspertiza i pravo*. 2017;(5):49-51. (In Russ.)]
 - Naito Y., Lee M.-C., Kato Y., Nagai R., Yoshikazu Y. Oxidative stress markers. *Anti-aging Medicine*. 2010; 7:36-44. <https://doi.org/10.3793/jaam.7.36>
 - Пашинян Г. А., Прутовых В. В. Использование метода хемилюминесценции для определения прижизненности и давности механической травмы скелетных мышц. *Судебно-медицинская экспертиза*. 1978;2:15-17. [Pashinian G. A., Prutovykh V. V. Ispolzovanie metoda khemilyuminesentsii dlya opredeleniya prizhiznennosti i davnosti mekhanicheskoi travmy skeletsykh myshts. *Sudebno-meditsinskaya ekspertiza*. 1978;2:15-17. (In Russ.)]
 - Путинцев В. А., Богомолов Д. В., Богомолова И. Н., Денисова О. П. *Определение длительности и темпа умирания по морфологическим признакам. Методические рекомендации*. Москва: ФГБУ РЦСМЭ; 2017. [Putintsev V. A., Bogomolov D. V., Bogomolova I. N., Denisova O. P. *Opredelenie dlitelnosti i tempa umiraniya po morfologicheskim priznakam. Metodicheskie rekomendatsii*. Moscow: Russian Center of Forensic Medical Expertise; 2017. (In Russ.)]
 - Дубинина Е. Е., Бурмистров С. О., Ходов Д. А., Поротов И. Г. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения. *Вопросы медицинской химии*. 1995;41(1):24-26. [Dubinina E. E., Burmistrov S. O., Khodov D. A., Porotov I. G. Okislitel'naya modifikatsiya belkov syvorotki krovi cheloveka, metod ee opredeleniya. *Voprosy meditsinskoi khimii*. 1995;41(1):24-26. (In Russ.)]
 - Gayen J. R., Zhang K., RamachandraRao S. P., Mahata M., Chen Y., Kim H.-S., Naviaux R. K., Sharma K., Mahata S.K., O'Connor D.T. Role of reactive oxygen species in hyper-adrenergic hypertension: Biochemical, physiological, and pharmacological evidence from targeted ablation of the chromogranin A (Chga) gene. *Circulation: Cardiovascular Genetics*. 2010;3(5):414-425. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.109.924050>
 - Карли Ф. *Метаболический ответ на острый стресс*. В кн.: Актуальные проблемы анестезиологии-реаниматологии (под ред. Е. В. Недашковского). Архангельск-Тромсе; 1997;31-34. [Karli F. *Metabolicheskii otvet na ostryi stress*. In: Aktualnye problemy anesteziologii-reanimatologii (E. V. Nedashkovskii, ed.). Arkhangelsk-Tromse; 1997;31-34. (In Russ.)]

Об авторах • Authors

ЭДЕЛЕВ Николай Серафимович – д.м.н., проф., начальник ГБУЗ НО «НОБСМЭ», заведующий кафедрой клинической судебной медицины ФГБОУ ВО ПИМУ МЗ РФ [Nikolai S. Edelev, Dr. Sci. (Med.), Prof., Nizhnii Novgorod Regional Bureau of Forensic Medicine] • 603104, г. Нижний Новгород, пр-т Гагарина, д. 70 • sudmedex-nn@mail.ru • {ORCID: 0000-0002-7341-8833}

АНДРИЯНОВА Наталья Александровна – к.х.н., заведующая судебно-химическим отделением, врач – судебно-медицинский эксперт ГБУЗ НО «НОБСМЭ» [Natalya A. Andriyanova, Cand. Sci. (Chem.), Nizhnii Novgorod Regional Bureau of Forensic Medicine] • 603104, г. Нижний Новгород, пр-т Гагарина, д. 70 • andriyanova.chim@yandex.ru

ЭДЕЛЕВ Иван Сергеевич – аспирант кафедры клинической судебной медицины ФГБОУ ВО ПИМУ МЗ РФ [Ivan S. Edelev, Privolzhskii Research Medical University] • 603005, г. Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, д. 10/1 • Edelev11lf133@yandex.ru • {ORCID: 0000-0002-5852-3758}

ОБУХОВА Лариса Михайловна – д.б.н., доцент, профессор кафедры биохимии ФГБОУ ВО ПИМУ МЗ РФ [Larisa M. Obukhova, Dr. Sci. (Biol.), Ass. Prof., Privolzhskii Research Medical University] • **603005, г. Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, д. 10/1** • ObuhovaLM@yandex.ru

► **Декларация о финансовых и других взаимоотношениях:** Исследование не имело спонсорской поддержки. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать. Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами. Авторы благодарны анонимным рецензентам за полезные замечания. Конфликт интересов отсутствует.

► **Declaration of financial and other relationships:** The study had no sponsorship. Authors are solely responsible for submitting the final manuscript to print. All authors participated in the development of the concept of the article and the writing of the manuscript. The final version of the manuscript was approved by all authors. The authors are grateful to anonymous reviewers for helpful comments. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.