

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM SIÊU CẤU TRÚC MÔ DA BIẾN ĐỔI SAU CHẾT TRONG GIÁM ĐỊNH PHÁP Y

Nguyễn Tiến Thành^{1*}
Trịnh Thanh Hiệp¹, Hà Văn Bắc¹

TÓM TẮT

Mục tiêu: Đánh giá đặc điểm siêu cấu trúc mô da biến đổi sau chết trong giám định pháp y.

Đối tượng, phương pháp: Nghiên cứu mô tả cắt ngang có so sánh trên 3 nhóm (mỗi nhóm 10 nạn nhân; với các giai đoạn sau chết tương ứng dưới 6 giờ, từ 6-24 giờ, trên 24-48 giờ).

Kết quả: Trên nhóm nạn nhân sau chết dưới 6 giờ, nhân tế bào da bắt đầu trương phồng, xuất hiện khoảng sáng quanh nhân. Trên cấu trúc mô da nhóm nạn nhân sau chết từ 6-24 giờ và trên 24-48 giờ, khoảng sáng quanh nhân, khoảng trống gian bào tăng dần; lớp sừng bị bong tróc và xuất hiện bóc tách nhú chân bì. Trên cấu trúc mô da nhóm nạn nhân sau chết từ trên 24-48 giờ, lớp sừng bong tróc mạnh, khoảng sáng quanh nhân và khoảng trống gian bào tăng mạnh so với nhóm có khoảng thời gian sau chết dưới 6 giờ và từ 6-24 giờ; nhú chân bì bóc tách ở nhiều vị trí.

Từ khóa: Khoảng thời gian sau chết, kính hiển vi điện tử truyền qua, pháp y, siêu cấu trúc, mô da.

ABSTRACT

Objectives: To evaluate the ultrastructural characteristics of postmortem skin changes in forensic examination.

Subjects and methods: Cross-sectional descriptive study with comparison on 3 groups (each group of 10 victims) with corresponding post-mortem stages under 6 hours, from 6-24 hours, over 24-48 hours).

Results: In the group of victims after death under 6 hours, the skin cell nuclei began to swell, and a clear space around the nucleus appeared. On the skin tissue structure of the group of victims after death from 6-24 hours and over 24-48 hours, the clear space around the nucleus and intercellular spaces gradually increased; the stratum corneum peeled off and the dermal papillae appeared to separate. On the skin tissue structure of the group of victims after death from over 24-48 hours, the stratum corneum peeled off strongly, the clear space around the nucleus and intercellular spaces increased sharply compared to the groups with post-mortem periods under 6 hours and from 6-24 hours; dermal papillae peeled off in multiple locations.

Keywords: Post mortem interval, TEM, forensic, ultrastructure, skin.

Chịu trách nhiệm nội dung: Nguyễn Tiến Thành, Email: thanhbsb89@gmail.com

Ngày nhận bài: 16/01/2024; mời phản biện khoa học: 01/2024; chấp nhận đăng: 16/02/2024.

¹Viện Pháp y Quân đội.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong giám định pháp y, việc tìm hiểu, đánh giá những biến đổi sau chết có ý nghĩa quan trọng trong nhận định thời gian tử vong hoặc khoảng thời gian sau chết (Post mortem interval - PMI) của nạn nhân. Các biến đổi sau chết theo thời gian gồm biến đổi sớm và biến đổi muộn. Các biến đổi sớm phát triển trong vòng 24 giờ đầu, gồm có xác lạnh, xác cứng, vết bầm tử thi, xác mất nước, hiện tượng tự tiêu của xác. Các biến đổi muộn là những biến đổi thường xuất hiện vào ngày thứ 2, thứ 3 sau chết,

như thối rữa, xác đét, xác hóa sáp, xác ướp trong môi trường tự nhiên, xác bị phá hủy do các vi sinh vật [1]. Nhận định PMI của nạn nhân (khoảng thời gian từ khi nạn nhân tử vong đến khi giám định) là một trong những mục tiêu hết sức quan trọng, phục vụ công tác điều tra. Để nhận định PMI, phải căn cứ vào nhiều yếu tố, như mức độ biểu hiện của hoen tử thi, mức độ mờ của giác mạc, sự biến đổi của các tạng, thức ăn trong dạ dày... Tuy nhiên, các căn cứ này còn những hạn chế nhất định để ước lượng, nhận định chính xác PMI. Thực tế giám định cho thấy, một số trường hợp không thể xác

định PMI của nạn nhân, gây khó khăn cho công tác điều tra và giám định.

Da là một cơ quan chiếm phần lớn diện tích cơ thể, chịu sự tác động của sự biến đổi sau khi chết. Một số biến đổi sau chết trên đại thể mô da đã được sử dụng để xác định PMI, song những biến đổi siêu cấu trúc da chưa được quan tâm sử dụng làm căn cứ xác định. Trên thế giới, tác giả Mikhailov [2] đã nghiên cứu đặc điểm biến đổi siêu cấu trúc của mô da sau chết với các PMI khác nhau. Thực tế cho đến nay, tại Việt Nam chưa có những nghiên cứu mang tính hệ thống về mối tương quan giữa sự thay đổi hình thái siêu cấu trúc mô da người với PMI.

Từ thực tiễn trên, chúng tôi triển khai nghiên cứu này nhằm đánh giá đặc điểm siêu cấu trúc mô da biến đổi sau chết trong giám định pháp y.

2. ĐỐI TƯỢNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

30 trường hợp tử vong được giám định pháp y tại Trung tâm Pháp y Hà Nội, từ tháng 12/2022 đến tháng 3/2023. Nghiên cứu được tiến hành tại Viện 69, Bộ Tư lệnh Bảo vệ Lăng Chủ tịch Hồ Chí Minh, từ tháng 3-9/2023.

- Tiêu chuẩn lựa chọn: nạn nhân có hồ sơ giám định đầy đủ thông tin (có trưng cầu giám định pháp y; PMI được nhận định; thời gian tiến hành giám định; tuổi và giới tính nạn nhân); nạn nhân được giám định theo đúng trình tự và có kết luận giám định; quá trình giám định pháp y, các nạn nhân được bảo quản ở điều kiện tự nhiên, ngoài trời.

- Tiêu chuẩn loại trừ: các trường hợp có tổn thương bỏng; tử vong do đuối nước hoặc da ngâm trong nước; cơ thể nạn nhân có tổn thương da cấp tính và mạn tính tại vùng ngực; nạn nhân không có đủ thông tin phục vụ nghiên cứu; nạn nhân giám định pháp y không đúng quy trình.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Thiết kế nghiên cứu: mô tả cắt ngang, so sánh giữa các nhóm nghiên cứu.

- Chia đối tượng nghiên cứu thành 3 nhóm, mỗi nhóm 10 nạn nhân theo PMI đã xác định:

- + Nhóm 1: nạn nhân có dưới 6 giờ.
- + Nhóm 2: nạn nhân có PMI từ 6-24 giờ.
- + Nhóm 3: nạn nhân có PMI từ trên 24-48 giờ.

- Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu: tiến hành thu 30 mẫu da trên 30 nạn nhân. Các mẫu da lấy tại vùng ngực (tương ứng vị trí vết rạch đường trắng giữa trên nạn nhân trong quá trình giám định

pháp y), kích thước mỗi mẫu da khoảng 2x2 cm; bảo quản đúng quy trình kỹ thuật.

+ Nhuộm mẫu TEM: da sau khi lấy được cố định bệnh phẩm trong 24 giờ bằng dung dịch Glutaraldehyde 5%. Pha bệnh phẩm, chuyển, đúc, cắt mảnh bệnh phẩm theo quy trình nhuộm TEM tại Viện 69 và soi, chụp ảnh tiêu bản trên kính TEM 1400 (JEOL, Nhật Bản) để đánh giá tổn thương trên tiêu bản siêu cấu trúc.

+ Quy trình làm mẫu TEM:

- 1) Pha mẫu da thành các đoạn dài 5 mm.
- 2) Rửa mẫu bằng đệm cacodylat.
- 3) Cố định mẫu trong glutaraldehyde 2,5%.
- 4) Rửa mẫu bằng đệm cacodylat 0,1M.
- 5) Cố định mẫu bằng axit osmic 1%.
- 6) Rửa lại mẫu bằng đệm cacodylat 0,1M.

7) Khử nước các mẫu theo quy trình: cồn ethanol 50°, 2 lần x 15 phút/lần; cồn ethanol 70°, 2 lần x 15 phút/lần; cồn ethanol 80°, 2 lần x 15 phút/lần; cồn ethanol 90°, 2 lần x 15 phút/lần; cồn ethanol 95°, 2 lần x 15 phút/lần; cồn ethanol 100°, 2 lần x 15 phút/lần.

8) Khử cồn ethanol các mẫu theo quy trình: chuyển qua propylen oxide, 3 lần x 10 phút/lần; chuyển mẫu vào hỗn hợp propylen oxide + epon tỉ lệ 2/1 để trong 30 phút; chuyển mẫu vào hỗn hợp propylen oxide + epon tỉ lệ 1/1 để trong 1 giờ; chuyển mẫu vào hỗn hợp propylen oxide + epon tỉ lệ 1/2 để trong 1 giờ; chuyển mẫu vào epon trong 2 giờ.

9) Đúc mẫu bằng chất đúc epoxy, mỗi block có thể đúc nhiều đoạn ngắn trong cùng một mẫu để quan sát tốt hơn khi soi mẫu, để ủ ấm 35°C trong 24 giờ, sau đó 45°C trong 24 giờ và 60°C trong 24 giờ.

10) Cắt tiêu bản siêu mỏng, nhuộm tăng tương phản bằng uranyl acetat 1% và chì citrat 1%.

11) Soi và chụp ảnh tiêu bản trên kính TEM 1400 (JEOL, Nhật Bản).

- Đọc kết quả: tất cả tiêu bản được chuyên gia về siêu cấu trúc của Khoa Hình thái học, Viện 69 thực hiện và phân tích kết quả.

- Phương pháp đánh giá định lượng:

+ Lựa chọn ngẫu nhiên tiêu bản để soi, chụp ảnh.

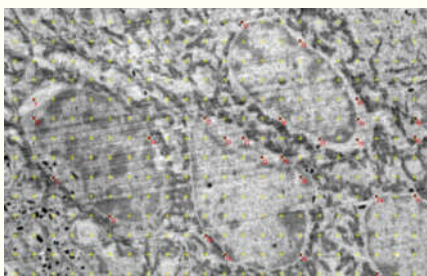
+ Khi soi tiêu bản, lựa chọn ngẫu nhiên vùng chụp ảnh (các ảnh được chụp ở cùng độ phóng đại x 1.000).

+ Dùng phần mềm ImageJ (Viện Y học quốc gia Hoa Kỳ) mở ảnh chụp tiêu bản.

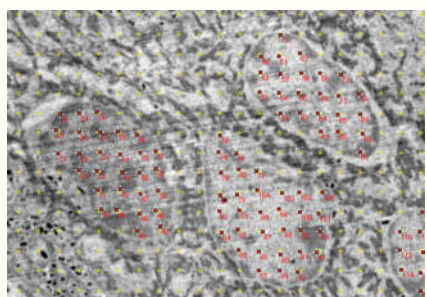
+ Chọn chế độ đặt lưới chuẩn ngẫu nhiên lên tiêu bản (hình a, b).

+ Tỷ lệ P_p được tính bằng tổng điểm của lưới chuẩn rơi vào vị trí khoảng sáng quanh nhân (a)/ tổng điểm rơi vào vị trí nhân tế bào (b).

Tỷ lệ diện tích khoảng sáng quanh nhân/ diện tích nhân (a/b) chính bằng tỷ lệ P_p theo Avtandilov (1990) [3] và Muhlfeld (2010) [4].



(a) Mẫu số 5. TEM*2000: tổng điểm rơi vào vị trí khoảng sáng quanh nhân.



(b) Mẫu số 5. TEM*2000: tổng điểm rơi vào vị trí nhân tế bào.

- Xử lý số liệu: bằng phần mềm SPSS 20.0. Dùng test Fisher để đánh các chỉ tiêu bán định lượng, test Manna - Whitney để đánh giá các chỉ tiêu định lượng tỷ lệ diện tích khoảng sáng quanh nhân/nhân. Giá trị so sánh khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

Bảng 1. Đặc điểm nhân tế bào

Trương phòng nhân	Đối tượng nghiên cứu		
	Nhóm 1	Nhóm 2	Nhóm 3
Ít	8 (80,0%)	2 (20,0%)	0
Trung bình	2 (20,0%)	2 (20,0%)	1 (10,0%)
Nhiều	0	6 (60,0%)	9 (90,0%)
Cộng	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)

Kết quả nghiên cứu cho thấy, nhân tế bào da biến đổi tỷ lệ thuận với PMI. Ở nhóm 1, nhân tế bào da bắt đầu trương phồng, hình thành khoảng sáng

quanh nhân. Ở nhóm 2 và nhóm 3, nhân tế bào da tiếp tục trương phồng mạnh, tăng dần tỷ lệ thuận với thời gian sau chết.

Bảng 2. Đánh giá sự khác nhau theo chỉ tiêu bong tróc lớp sừng

Chỉ tiêu lớp sừng	Đối tượng nghiên cứu		
	Nhóm 1	Nhóm 2	Nhóm 3
Bong tróc	4 (40,0%)	6 (60%)	10 (100%)
Không bong tróc	6 (60,0%)	4 (40%)	0 (0%)
Tổng	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)

Nghiên cứu cho thấy, sự biến đổi lớp sừng diễn ra nhiều nhất ở nạn nhân nhóm 3 (100%), tiếp đến nhóm 2 (60,0%) và nhóm 1 (40,0%). Lớp sừng là lớp ngoài cùng của biểu bì da, là những tế bào đã biến thành những lá sừng mỏng, không nhân, trong bào tương có chứa nhiều chất keratin. Chiều dày của lớp sừng phụ thuộc từng vùng của cơ thể. Lớp sừng bảo đảm tính không thấm nước và ngăn cản sự bốc hơi nước qua da. Sự tiếp xúc của lớp sừng với các tác nhân bên ngoài là tương đối sớm. Sự biến đổi lớp sừng diễn ra mạnh hơn khi PMI tăng lên. Sự biến đổi của lớp sừng, sự bóc tách ở những giai đoạn sớm của PMI là một tiêu chí quan trọng để nhận định sớm ở cấp độ siêu cấu trúc.

Bảng 3. Đánh giá sự khác nhau theo chỉ tiêu tăng khoảng sáng gian bào

Tăng khoảng sáng gian bào	Đối tượng nghiên cứu		
	Nhóm 1	Nhóm 2	Nhóm 3
Có	4 (40,0%)	6 (60,0%)	10 (100%)
Không	6 (60,0%)	4 (40,0%)	0
Cộng	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)

Khoảng sáng gian bào tăng nhiều nhất ở nhóm 3 - nạn nhân có PMI trên 24-48 giờ (100%), ít nhất ở nhóm 1 - nạn nhân có PMI dưới 6 giờ (40,0%). Khoảng trống gian bào là một trong những biến đổi sớm của tế bào sau khi chết. Khoảng sáng gian bào là khoảng trống giữa các tế bào. Bình thường, khoảng trống này thường nhỏ do các tế bào liên kết chặt chẽ với nhau và do sự kết dính bởi chất pectin. Nhưng cũng có khi biến đổi lớn hơn các tế bào xung quanh, trở thành khoang kín rất lớn gọi là khoang trống. Khoang trống có thể chứa khí hoặc những chất khác. Sau khi chết, quá trình tự hủy sẽ làm biến đổi thành phần các chất trong tế bào và mô; đồng thời, thay đổi tính thấm và làm tổn thương các màng, trong đó có màng sinh học. Ngoài ra, một vài cơ chế khác cũng làm tăng khoảng trống gian bào, mà sự thay đổi này có thể phát hiện ngay trên kính hiển vi quang học. Sử dụng kính hiển vi

điện tử giúp tăng khả năng quan sát và tính toán thể tích khoảng trống gian bào, từ đó, giúp đánh giá tình trạng cũng như theo dõi các biến đổi mô, tế bào sau chết.

Bảng 4. Đánh giá sự khác nhau theo chỉ tiêu tăng khoảng sáng quanh nhân

Tăng khoảng sáng quanh nhân	Đối tượng nghiên cứu		
	Nhóm 1	Nhóm 2	Nhóm 3
Có	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
Không	0	0	0
Cộng	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)

Kết quả nghiên cứu thấy có tăng khoảng sáng quanh nhân ở tất cả các nhóm nghiên cứu.

Bảng 5. Đánh giá sự khác nhau theo chỉ tiêu bóc tách nhú chân bì

Bong tróc nhú chân bì	Đối tượng nghiên cứu		
	Nhóm 1	Nhóm 2	Nhóm 3
Có	0	4 (40,0%)	6 (60,0%)
Không	10 (100%)	6 (60,0%)	4 (40,0%)
Cộng	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)

Kết quả nghiên cứu thấy, sự bóc tách biểu bì và chân bì nhiều nhất ở nhóm 3 - nạn nhân có PMI trên 24-48 giờ (60,0%), tiếp đến là nhóm 2 - nạn nhân có PMI từ 6-24 giờ (40,0%). Riêng nhóm 1 - nạn nhân có PMI dưới 6 giờ chưa xuất hiện hiện tượng bóc tách nhú chân bì. Sự bóc tách nhú chân bì trên mô da ở cấp độ siêu cấu trúc giai đoạn từ 6-24 giờ có thể coi là một tiêu chí sớm của sự biến đổi sau chết.

Bảng 6. Định lượng tỉ lệ khoảng sáng quanh nhân/nhân

Mẫu	Nhóm 1	Mẫu	Nhóm 2	Mẫu	Nhóm 3
1	4,52	11	2,28	21	5,38
2	6,04	12	9,40	22	3,98
3	7,46	13	1,06	23	5,64
4	1,84	14	6,06	24	15,04
5	7,40	15	6,18	25	18,48
6	4,54	16	2,32	26	5,40
7	6,02	17	9,42	27	4,00
8	7,50	18	1,10	28	5,62
9	1,88	19	6,10	29	15,06
10	7,44	20	6,20	30	18,50
TB	5,46	TB	5,01	TB	9,71
<i>TB: trung bình</i>					

Vùng sáng quanh nhân (hay khoảng sáng quanh nhân) là một trong những biến đổi sớm và đặc trưng nhất của tự hủy sau chết. Nó liên quan

mật thiết đến cơ chế biến đổi tự hủy sau chết tới các thành phần của tế bào đó (nhân và bào tương). Biến đổi hình thái chất nhân (theo thứ tự thời gian), gồm chất nhân tập trung vùng rìa nhân, trương phồng nhân (tăng kích thước), nhân đông vón, nhân vỡ, nhân tan. Từ kết quả bảng 4 cho thấy, sự hình thành khoảng sáng quanh nhân xuất hiện ở tất cả các mẫu nghiên cứu. Nghiên cứu của Mikhailov cho thấy sự hình thành khoảng sáng quanh nhân xuất hiện ở những giai đoạn rất sớm của biến đổi tế bào. Để so sánh tỉ lệ diện tích khoảng sáng quanh nhân/nhân giữa các nhóm nghiên cứu, chúng tôi tiến hành định lượng tỉ lệ diện tích khoảng sáng quanh nhân/nhân để xem xét quá trình biến đổi có tỉ lệ tương quan với các khoảng thời gian nghiên cứu. Từ kết quả bảng 6, chúng tôi không thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm. Nhưng trung bình về tỉ lệ giữa các nhóm thì nhóm 3 chiếm tỉ lệ cao nhất. Sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê có thể do cỡ mẫu chưa đủ đại diện cho quần thể, hoặc có sự khác biệt giữa các cá thể nghiên cứu. Vì vậy, chúng tôi sẽ xem xét việc tăng cỡ mẫu ở các nghiên cứu tiếp theo.

4. KẾT LUẬN

Mức độ biến đổi siêu cấu trúc của tế bào thượng bì mô da tăng dần theo các PMI. Giai đoạn PMI dưới 6 giờ, nhân tế bào bị trương phồng, xuất hiện bong tróc lớp sừng, hình thành khoảng sáng quanh nhân. Giai đoạn PMI từ 6-24 giờ, lớp sừng bị bong tróc nhiều hơn, sự tăng dần của khoảng sáng quanh nhân và khoảng trống gian bào, xuất hiện bóc tách nhú chân bì. Giai đoạn PMI trên 24-48 giờ, lớp sừng bong tróc mạnh, khoảng sáng quanh nhân và khoảng trống gian bào tăng mạnh so với khoảng thời gian PMI dưới 6 giờ và từ 6-24 giờ; bóc tách nhú chân bì ở nhiều vị trí.

Nghiên cứu này có ý nghĩa bổ sung các tiêu chí khách quan đánh giá PMI bên cạnh những phương pháp đánh giá PMI theo kinh điển trên đại thể, như đánh giá hoen tử thi, nhiệt độ cơ thể, co cứng tử thi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Vũ Ngọc Thụ (1992), *Y học tư pháp*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
2. Mikhailov (1979), “Структура и Функция Эпидемиса”, *Медицина, Москва*, pp: 220.
3. Avtandilov G.G (1990), “Медицинская морфометрия”, *Москва Медицина, Москва*, ISBN 5-225-00753-8, pp: 382.
4. Mühlfeld C, Nyengaard J.R, Mayhew T.M (2010), “A review of state-of-the-art stereology for better quantitative 3D morphology in cardiac research”, *Cardiovasc Pathol*, 2010; 19(2): 65-82. □