

ВОЗМОЖНОСТИ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ ДЛЯ УСТАНОВЛЕНИЯ ПРИЖИЗНЕННОСТИ ТРАВМИРОВАНИЯ КОЖИ И МЫШЦ

В.В.Войченко, Г.А. Зарицкий, А.Ю. Петрошак, О.А. Гурина

Начальник ОКУ «Бюро судебно-медицинской экспертизы»

Днепропетровской областной государственной администрации

Национальная медицинская академия последипломного образования

им. П.Л. Шупика

Установление причинной связи между наступлением смерти и наличием травмы – было и остается одним из ключевых вопросов при проведении судебно-медицинской экспертизы трупа. Базовыми же аспектами для решения проблемы взаимосвязи травмы и смерти являются в первую очередь определение прижизненности повреждения и давности его образования. До сих пор дифференциация прижизненных и посмертных повреждений, а равно с ней, и установление давности травмирования не теряет свою актуальность в судебно-медицинской экспертизе. Физиологический ответ организма на наличие кожно-мышечной раны есть хорошо организованный биологический процесс классически состоящий из трех последовательных фаз - воспаление, пролиферация и дифференциация. Участие в каждой из условно обозначаемых фаз различных биологических веществ, вовлеченных в процесс заживления раны, с учетом их индивидуальной активности и сочетания («временные пересечения») дает возможность использовать в судебной медицине ответ организма на травму для определения прижизненности и давности травматизации. Уровень развития современных иммуногистохимических исследований, отображающих реакцию тканей на травму, предполагает установление маркеров, способных объективно дифференцировать прижизненные и посмертные повреждения. В свою очередь, последовательность включения биологически активных веществ в течение раневого процесса, в сочетании со степенью их иммуногистохимической активности позволяет судить и о давности формирования травмы. К сожалению методы, нашедшие на сегодняшний день широкое применение в отечественной патологичес-

кой анатомии, для судебной медицины имеют лишь познавательную ценность несмотря на их практическую перспективность.

В данном обзоре мы постараемся представить примеры наиболее изученных иммуногистохимических маркеров кожно-мышечных повреждений, пригодных для применения в судебно-медицинской диагностике раннего посттравматического периода - наиболее сложного в судебно-медицинской травматологии трупа.

1. Фибронектин представляет собой многофункциональный белок клеточной адгезии обнаруживаемый в крови и в различных тканях. В процессе заживления ран, фибронектин может поддерживать адгезию и динамику фибробластов, кератиноцитов и эндотелиальных клеток. Фибронектин, позиционируется, как наиболее чувствительный маркер для определения прижизненности травмы, с акцентом на то, что в некоторых случаях иммунопозитивные реакции фибронектина следуют уже через несколько минут после нанесения повреждения [1]. Поэтому в качестве маркеров, способных выявить ранний альтеративный ответ на травму, в первую очередь А. Fieguth, Н. Feldbrugge, Т. Gerich, W.J. Kleemann, Н.Д. Troger [2] рекомендуют использовать методики, связанные с оценкой иммуногистохимической активности фибронектина. Стабильное окрашивание иммуногистохимических препаратов поврежденной кожи и мышц наблюдается уже через 20 мин. с момента травмы продолжительностью до 30 суток. Причем, с увеличением продолжительности посттравматического периода наблюдается последовательное снижение иммуногистохимической реакции.

В фазе воспаления кожных ран, в ходе трансмиграции лейкоцитов, наблюдается взаимодействие между лейкоцитами и эндотелиальными клетками опосредованное молекулами адгезии (Р-селектин, Е-селектин, ICAM-1, VCAM-1).

2. Иммуногистохимические исследования с полуколичественной оценкой Р-селектина показали его высокую избирательность, как маркера прижизненной травматизации, начиная с 3 минут от формирования повреждения на протяжении первых семи часов.

3. Положительная реакция на Е-селектин начинается с 1 часа от момента травмы сохраняясь на протяжении 17 дней со значительным снижением иммуногистохимической активности через 12 часов после травматизации [3].

4. При травматическом воздействии в результате стимуляции цитокинами резко увеличивается экспрессия ICAM-1 (молекула

клеточной адгезии - «кластер дифференцировки 54») на цитоплазматической мембране. Сильное и умеренное положительное иммуногистохимическое окрашивание на ICAM-1 наблюдается через 1,5 часа после травматизации и не позднее 3,5 дней. По мнению J. Dressler, L. Bachmann, M. Kasper, J.G. Hauck, E. Muller [4] иногда может наблюдаться слабый положительный иммуногистохимический ответ в интактной коже, связанный со специфической реакцией на ICAM-1 кератиноцитов и эндотелиальных клеток кровеносных сосудов.

5. Иммуногистохимическая активность **VCAM-1** («вазкулярная молекула клеточной адгезии 1») — белка суперсемейства иммуноглобулинов, участвующего в адгезии лейкоцитов и эндотелиальных клеток - при сильном и умеренном свечении отображает прижизненность травмы кожи и мышц начиная с 3 часов после травмы до 3,5 суток после нее [5].

6. Иммуногистохимическая оценка состояния раны в отношении ее прижизненности и срока возникновения, путем анализа трансформирующих факторов роста **TGF- α** и **TGF- β 1**, свидетельствует о возможности дифференциации прижизненной травмы давностью от нескольких минут до 6 недель с максимальной достоверностью посттравматического интервала до 5 часов. Увеличение уровня TGF- α соответствует эпидермальному реактивному ответу для прижизненной травмы начиная с 10 мин после ранения при максимальных значениях в срок 30-60 мин. TGF- β 1 стабильно отражает посттравматический ответ соединительной ткани. При этом положительные иммуногистохимические показатели наблюдались S. Vieler, B. Madea [6] в резаных ранах уже через несколько минут после прижизненного травмирования с таким же как и для TGF- α пиком максимальной реакции в 30-60 мин.

7. Цитокины являются многофункциональными гликопротеинами, которые принимают активное участие в том числе и в локальном ответе на травму. Представителями этого семейства являются интерлейкины (IL) и фактор некроза опухоли (TNF).

Иммуногистохимическое отображение экспрессии интерлейкина-1-альфа (IL-1- α) в области кожных ран показало положительную реакцию на IL-1- α в ранах от 4 часов до 1 суток. С увеличением возраста раны реакция еще сохраняется, однако достоверность иммуногистохимической оценки экспрессии IL-1- α в отношении прижизненности травмы весьма низкая [7].

В работе Grellner W. [8] отмечено, что положительная иммуногистохимическая реакция на IL-1, IL-6 и TNF в области прижизненных

ран по сравнению с контрольными образцами наблюдалась в сроки 30-90 минут со времени травмирования.

8. Производные арахидоновой кислоты (AA) - медиаторы воспаления с хемотаксической активностью в раневом процессе объединены в группу лейкотриенов. Исследование активности лейкотриена B-4 (LTB4) показало, что наличие LTB4 в области раны является однозначным свидетельством прижизненности. L. He, J. Zhu [9] уточнили, что показатель прижизненности является информативным для дифференциации повреждения менее чем через полчаса после травматизации.

9. Возможности применения иммуногистохимического анализа уровня D-димера - специфического продукта распада фибрина связано в первую очередь с оценкой динамики коагуляционных процессов в области травматизации. Увеличение уровня D-димера в области прижизненных резаных ран наблюдается, по сравнению с контролем, в период, начиная менее чем с 30 минут от момента травматизации. Лабораторные исследования показали селективность данного метода к повреждениям, образовавшимся от действия острых предметов и отсутствие какого-либо статистического различия между контрольными образцами и участками ссадин и кровоподтеков [10].

10. Исследования, посвященные способности катепсина-D - внутриклеточной аспаргатной протеазы, показали возможность использования этого маркера для фиксации травматического ответа, который, по всей вероятности, связан с пепсиноподобным действием, вызывающим неспецифическую активацию других катепсинов тканей. Начиная с 5 минут после травмы, C. Herná ndez-Cueto, J.A. Lorente, I. Pedal et al [11] зафиксировали увеличение удельной активности катепсина в области повреждения более, чем в 5 раз по сравнению с контрольными образцами. Особо обратило на себя внимание избыточное влияние эндогенных факторов на активность катепсина-D в зоне травматизации.

В данном обзоре конечно же отображены не все перспективные маркеры прижизненности кожно-мышечных повреждений. Роль каждого из рассматриваемых факторов по мнению различных авторов может иметь положительный эффект с достаточной степенью достоверности. Другие же исследователи высказывают сомнение в возможностях метода, основываясь на результатах собственных наблюдений.

Перед тем как использовать хотя бы некоторые из перечисленных методов в практике судебно-медицинской экспертизы, результаты из

литературных источников должны быть подтверждены комплексным научно-практическим исследованием. По оценке Kondo T. [12] существует риск избыточной положительной реакции в посмертных ранах. Не меньший риск по нашему мнению связан и с ложноотрицательными иммуногистохимическими реакциями, обусловленными величиной посмертного интервала, температурной экспозицией трупа и т.д.

По мнению большинства авторов оптимальность отображения чувствительности и специфичности иммуногистохимических маркеров прижизненности кожно-мышечного травмирования основывается на объединении анализа нескольких групп маркеров с предшествующей тщательной проверкой на больших статистических группах с верифицированными прижизненными и посмертными повреждениями.

Литература

1. Betz P. *Neue Methoden zur histologischen Altersbestimmung menschlicher Hautwunden* / P. Betz. - Schmidt-Ro`mhild, Lu`beck, 1996. -
2. *The time-dependent expression of fibronectin, MRP8, MRP14 and defensin in surgically treated human skin wounds* / A. Fieguth, H. Feldbrugge, T. Gerich [et al.] // *Forensic Sci. Int.* - 2003. - Vol. 131. - P. 156-161.
3. *Enhanced expression of selectins in human skin wounds* / J. Dressler, L. Bachmann, R. Koch, E. Muller // *Int. J. Legal Med.* - 1999. - Vol. 112. - P. 39-44.
4. *Time dependence of the expression of ICAM-1 (CD 54) in human skin wounds* / J. Dressler, L. Bachmann, M. Kasper [et al.] // *Int. J. Legal Med.* - 1997. - Vol. 110. - P. 299-304.
5. *Expression of adhesion molecules in skin wounds: diagnostic value in legal medicine* / J. Dressler, L. Bachmann, P. Strejc [et al.] // *Forensic Sci. Int.* - 2000. - Vol. 113. - P. 173-176.
6. *Vieler S. Transforming growth factors (TGF- α and TGF- β 1) in the determination of vitality and wound age: immunohistochemical study on human skin wounds* / S. Vieler, B. Madea. // *Forensic Science International.* - 2005. - Vol. 153, Is. 2. - P. 174-180.
7. *Kondo T. Immunohistochemical and morphometrical study on the temporal expression of interleukin-1 α (IL-1 α) in human skin wounds for forensic wound age determination* / T. Kondo, T. Ohshima, W. Eisenmenger // *Int. J. Legal Med.* - 1990. - Vol. 112. - P. 249-252.
8. *Grellner W. Time-dependent immunohistochemical detection of proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α) in human skin wounds* / W. Grellner // *Forensic Sci. Int.* - 2002. - Vol. 130. - P. 90-96.
9. *He L. Distinguishing antemortem from postmortem injuries by LTB4 quantification* / L. He, J. Zhu // *Forensic Sci. Int.* - 1996. - Vol. 81. - P. 11-16.

10. *Diagnostic ability of D-dimer in the establishment of the vitality of wounds* / C. Herna`ndez-Cueto, D.N. Vieira, E. Girela [et al.] // *Forensic Sci. Int.* - 1995. - Vol. 76. - P. 141-149.

11. *Cathepsin D as a vitality marker in human skin wounds* / C. Herna`ndez-Cueto, J.A. Lorente, I. Pedal [et al.] // *Int. J. Legal Med.* - 1993. - Vol. 106. - P. 145-147.

12. *Kondo T. Timing of skin wounds* / T. Kondo // *Legal Medicine.* - 2007. - Vol. 9. - P. 109-114.

Резюме

Войченко В.В., Зарицкий Г.А., Петрошак А.Ю., Гурина О.А. *Возможности иммуногистохимических методов исследования для установления прижизненности травмирования кожи и мышц.*

В статье проведен анализ литературных данных в отношении возможностей применения иммуногистохимических методов исследования для определения прижизненности травмы, образовавшейся в сроки ближайшие к наступлению смерти. Обращено внимание на необходимость комплексного исследования нескольких иммуногистохимических маркеров с целью повышения достоверности получаемого результата. Рекомендовано проведение дополнительных исследований в отношении каждого из маркеров, во избежание получения ложных результатов при проведении судебно-медицинских экспертиз.

Ключевые слова: судебно-медицинская экспертиза, иммуногистохимические методы, травма, труп, прижизненность.

Резюме

Войченко В.В., Зарицкий Г.А., Петрошак О.Ю., Гурина О.О. *Можливості імуногістохімічних методів дослідження для встановлення життєвості травми шкіри й м'язів.*

У статті проведено аналіз літературних даних відносно можливостей застосування імуногістохімічних методів дослідження для визначення життєвості травми, що утворилася в терміни найближчі до настання смерті. Звернено увагу на необхідність комплексного дослідження декількох імуногістохімічних маркерів з метою підвищення вірогідності результату, який отримано. Рекомендоване проведення додаткових досліджень у відношенні кожного з маркерів, щоб уникнути одержання хибних результатів при проведенні судово-медичних експертиз.

Ключові слова: судово-медична експертиза, імуногістохімічні методи, травма, труп, життєвість.

Summary

Vojchenko V. V., Zaritsky G.A., Petroshak A.Y., Gurina O. A. *Possibilities immunohistochemical methods of research for an establishment intravital formation of injury skin and muscles.*

In article the analysis of the literary data concerning application possibilities immunohistochemical methods of research for definition of vitality a trauma formed in terms proximate to approach of death is carried out. The attention to necessity complex research several of immunohistochemical markers for the purpose of increase of reliability of received result is paid. Carrying out of additional researches concerning each of markers, in order to avoid reception of false results at carrying out of forensic medical examinations is recommended.

Key words: forensic medical examination, immunohistochemical techniques, trauma, the corpse, intravital.

Рецензент: д.мед.н., проф. В.Д. Мишалов