

А.В.Кізь

Харківське обласне бюро судово-медичної експертизи

Ключові слова: судово-медична експертиза, захиттєві та посмертні ушкодження, шкіра, м'яз, клітини-продуценти ІЛ-1 β .

Надійшла: 06.01.2013

Прийнята: 20.02.2013

УДК 340.6:616-091.1/8:616-008.853

ДОСЛІДЖЕННЯ ПОСМЕРТНОЇ ДИНАМІКИ АКТИВНОСТІ КЛІТИН-ПРОДУЦЕНТІВ ІНТЕРЛЕЙКІНУ (ІЛ-1 β) ЯК МАРКЕРІВ ВИКОРИСТАННЯ ГІСТОХІМІЧНИХ ЕКСПРЕС-МЕТОДІВ ПРИ СУДОВО-МЕДИЧНІЙ ЕКСПЕРТИЗИ ТРУПІВ

Резюме. Для визначення можливостей та умов біохімічної активності у шкірі та м'язах як маркера захиттєвих та посмертних травм при проведенні експериментальних якісних макростіхімічних експрес-реакцій виникла необхідність використання контрольного лабораторного методу. Для цього було використано порівняння наявності та кількості імунних клітин, що здатні експресувати рецептори до ІЛ-1 β (клітин-продуцентів інтерлейкіну) при захиттєвих та посмертних ушкодженнях в залеженості від температурного режиму у різні проміжки часу. Експериментальні дослідження проведені на щурах лінії Wistar. Травматичні зміни викликали дозованими ударами у стегно наркотизованих щурів із використанням спеціального пристрою, ішемічні – перев'язуванням судин. Імунні клітини диференціювали за допомогою моноклональних антитіл до клітин-продуцентів ІЛ-1 β фірми «Serotec». Була проведена оцінка імуногістохімічних ознак при захиттєвій та постмортальній тупій травмі від моменту травматизації з експозицією зразків м'яких тканин 30 хв, 1 год, 2 год, 4 год та 6 год при температурних режимах +18 $^{\circ}$ C, +37 $^{\circ}$ C, -10 $^{\circ}$ C. Проведений аналіз показників відносного об'єму ІЛ-1 β , як у дермі, так і у м'язі дозволило встановити статистично значимі порівняльні показники ($p < 0,001$) між посмертними та захиттєвими ушкодженнями м'яких тканин у ранньому постмортальному періоді. Наявність стабільної імуногістохімічної картини при низьких температурах та зберігання популяції клітин-продуцентів ІЛ-1 β в зонах ушкодження при кімнатній температурі свідчить про можливість використання імуногістохімічних експрес-методів у судово-медичній експертизі трупів при встановленні прижиттєвого або посмертного характеру ушкоджень через достатньо великий проміжок часу з моменту настання смерті.

Морфологія. – 2013. – Т. VII, № 1. – С. 39-43.

© А.В.Кізь, 2013

Kiz A.V. The study of postmortem activity of cells-producers of interleukin (IL-1 β) as a marker histochemical use of rapid methods for forensic medical examination of corpses.

Summary. For definition of possibilities and conditions of biochemical activity in a skin and muscles as a marker of intravital and posthumous traumas, at carrying out experimental qualitative macrohistochemical reactions there was a necessity of use of a control laboratory method. Comparison of presence and quantity of immune cells which are capable to express receptors to IL-1 β (to cells-producers of interleukin) at intravital and posthumous damages depending on a temperature mode in various time terms has been for this purpose used. Experimental researches have been made on rats of line Wistar. Traumatic changes were invoked by the dosed impacts in a femur narcotized animals with use of the special device. Immune cells was differentiated with the help of monoclonal antibodies to cells-producers of IL-1 β . The assessment immunohistochemical signs for intravital and postmortem of blunt trauma from the traumatization moment with the subsequent exposition of samples of soft fabrics throughout 30 minutes, has been made 1 h, 2 h, 4 h and 6 h at temperature modes +18 $^{\circ}$ C, +37 $^{\circ}$ C, -10 $^{\circ}$ C. The carried out analysis of indexes of relative volume IL-1 β , both in a derma, and in muscles has allowed to position statistically significant relative indexes ($p < 0,001$) between posthumous and intravital damages of soft fabrics in early postmortem period. Presence stable immunohistochemical patterns at low temperatures and conservation of population of cells-producers of IL-1 β in regions of damages at ambient temperature testifies to use possibility immunohistochemical quick tests in a forensic medical examination of corpses for establishment of intravital or posthumous character of damages through enough wide interval of time which has passed from the moment of approach of death.

Key words: forensic medical examination, intravital and posthumous damages, skin, muscle, cells-producers of IL-1 β .

Вступ

У ході проведення експериментальних досліджень по використанню методів імуногістохі-

мічної експрес-діагностики для судово-медичної експертизи трупів виникло питання про вплив зовнішньої температури та часу, що пройшов з

моменту настання смерті на активність прояву післятравматичних процесів.

Лейкоцити, що з'являються в осередку травми, виділяють безліч прямих цитотоксичних факторів і медіаторів, що дозволяє процесу запалення самопідтримуватися і розширюватися поза осередком ураження шляхом звільнення вільних радикалів і запальних цитокінів – інтерлейкіну-1, інтерлейкіну-6, туморнекротизуючого фактора, факторів адгезії тромбоцитів (IL-1, IL-1b, TNF α , PAF відповідно). Цитокіни є важливими медіаторами на тканинному рівні, які зумовлюють міжклітинні й матрично-клітинні взаємовідношення. Дослідження останніх років фокусуються на ролі цитокінів як медіаторів запалення в пошкодженій тканині. Одним з найбільш важливих цитокінів цього плану є інтерлейкін IL-1 (Grellner W., 2002; Vaccì S. et al., 2006), який було нами вибрано у якості маркера активності післятравматичних імуногістохімічних процесів.

Мета полягає у спробі визначення можливості та умов зберігання постмортальної біохімічної активності у шкірі та м'язах як маркера зажиттєвих та посмертних травм для паралельного проведення експериментальних якісних макростохімічних експрес-реакцій.

Матеріали та методи

Експериментальна частина досліджень проведена на щурах лінії Wistar – савцях масою 250-300 г. Травматичні зміни викликали дозованими ударами у стегно наркотизованих щурів із використанням спеціального пристрою, ішемічні – перев'язуванням судин.

Усі тварини було поділено на 2 групи: 1 – з відтворенням експериментальної тупої травми (n=96); 2 – з відтворенням механічної ішемії стегна (n=96). Кожна група поділена на підгрупи: 1a – з відтворенням експериментальної зажиттєвої тупої травми (n=48); 1б – з відтворенням експериментальної постмортальної тупої травми

(n=48); 2a – з відтворенням зажиттєвої механічної ішемії стегна (n=48); 2б – з відтворенням постмортальної механічної ішемії стегна (n=48). Кожна підгрупа поділена на внутрішні підгрупи відтворення ушкодження залежно від часу та температури експозиції.

Імуногістохімічне дослідження проводили на парафінових зрізах, товщиною 5-6 мкм непрямым методом Кунса за методикою Brosnan (Лилли Р., 1969). Імунні клітини диференціювали за допомогою моноклональних антитіл (МКА) до клітин-продуцентів IL-1 β («Serotec»).

Відносні об'єми загальних клонів імунних клітин визначали за допомогою сітки Автанділова в люмінесцентному мікроскопі. Кількість клітин-продуцентів IL-1 β та фібронектину підраховували у полі зору при збільшенні $\times 400$.

Результати та їх обговорення

При визначенні імуногістохімічних ознак при постмортальній тупій травмі з миттєвим ушкодженням м'яких тканин після виведення тварин з експерименту з витриманням зразків м'яких тканин при експозиції із дотриманням $t=18^{\circ}\text{C}$ на початковій стадії експерименту різко знижується кількість клітин-продуцентів IL-1 β , прогресивне зменшення цих клітин триває на протязі 1 і 2 години експерименту, до 4 години виявляється дуже слабе світіння, а до 6 години в препаратах немає клітин, здатних експресувати рецептори до IL-1 β . При витриманні у $t=37^{\circ}\text{C}$ в дермі імунні клітини втрачають здатність експресувати рецептори до IL-1 β вже до 1 години експерименту, що швидше ніж при $t=18^{\circ}\text{C}$. Перебування м'яких тканин у середовищі із $t=-10^{\circ}\text{C}$ визначає те, що імунні клітини шкіри та м'язів довше, ніж при кімнатній і тим більш ніж при високій температурі, зберігають здатність експресувати рецептори до IL-1 β , втрачаючи її лише до 6 години (табл. 1).

Таблиця 1

Імуногістохімічна характеристика дерми й поперечносмугастої мускулатури тварин внаслідок постмортальної тупої травми

Групи спостереження	Відносний об'єм клітин-продуцентів IL-1 β					
	$t=18^{\circ}\text{C}$		$t=37^{\circ}\text{C}$		$t=-10^{\circ}\text{C}$	
	дерма	м'яз	дерма	м'яз	дерма	м'яз
Інтактні тканини	2,5 \pm 0,1	1,4 \pm 0,2	2,5 \pm 0,1	1,4 \pm 0,2	2,5 \pm 0,1	1,4 \pm 0,2
0 хв	0,8 \pm 0,04	0,7 \pm 0,02*	0,6 \pm 0,02**	0,5 \pm 0,01**	0,55 \pm 0,02*	0,45 \pm 0,07*
30 хв	0,5 \pm 0,01*	0,5 \pm 0,03*	0,2 \pm 0,02**	0,3 \pm 0,01**	0,45 \pm 0,03*	0,35 \pm 0,04*
1 год	0,3 \pm 0,02*	0,2 \pm 0,01*	сліди	сліди	0,40 \pm 0,01*	0,30 \pm 0,02*
2 год	0,2 \pm 0,01*	0,1 \pm 0,03*	сліди	сліди	0,36 \pm 0,02*	0,27 \pm 0,05*
4 год	сліди	сліди	сліди	сліди	0,30 \pm 0,01*	0,20 \pm 0,04*
6 год	немає	немає	немає	немає	сліди	сліди

Примітки: * - $p < 0,001$ порівняно з інтактними тканинами; ** - $p < 0,05$ порівняно з інтактними тваринами.

При зажиттєвому ушкодженні м'яких тканин внаслідок тупої травми (табл. 2) у тварин

при $t=18^{\circ}\text{C}$ в зоні травми як в шкірі, так і в м'язі різко зменшена кількість клітин-продуцентів

прозапального цитокіну – ІЛ-1 β . Запальна реакція у вигляді збільшення кількості імунних клітин в зоні рани, у тому числі клітин, що експресують рецептори до ІЛ-1 β , починає явно наростати через 1 годину після нанесення зажиттєвого ушкодження м'яких тканин внаслідок тупої травми в експерименті і максимально виражена через 6 годин. При витримуванні зразків тканин при низькій температурі (t=-10°C) в зоні травми

як в шкірі, так і в м'язі різко зменшена кількість клітин-продуцентів ІЛ-1 β . Вміст клітин-продуцентів ІЛ-1 β в дермі і м'язі дещо збільшується через 30 хвилин після виведення тварин з експерименту, а потім до кінця експерименту залишався стабільним. Отже, низькі температури стабілізують морфологічні реакції, які повільно протікають в організмі, в тому числі і в структурних компонентах фокусу травми.

Таблиця 2

Імуногістохімічна характеристика дерми й поперечносмугастої мускулатури при зажиттєвому ушкодженні внаслідок тупої травми

Групи спостереження	Відносний об'єм клітин-продуцентів ІЛ-1 β					
	t=18°C		t=37°C		t=-10°C	
	дерма	м'яз	дерма	м'яз	дерма	м'яз
Інтактні тканини	2,5±0,1	1,4±0,2	2,5±0,1	1,4±0,2	2,5±0,1	1,4±0,2
0 хв	0,5±0,02*	0,3±0,03*	0,5±0,01*	0,3±0,01*	0,6±0,02*	0,4±0,02*
30 хв	0,6±0,04*	0,4±0,02*	0,6±0,04*	0,4±0,02*	0,8±0,03*	0,6±0,01*
1 год	1,0±0,1*	0,5±0,05*	0,9±0,09*	0,7±0,02*	0,7±0,03*	0,5±0,01*
2 год	1,5±0,3*	0,7±0,04*	1,0±0,08*	0,9±0,03*	0,8±0,02*	0,6±0,02*
4 год	1,7±0,1*	1,1±0,1	0,6±0,05*	0,5±0,07*	0,7±0,04*	0,6±0,03*
6 год	2,8±0,4	1,7±0,3	0,5±0,02*	0,6±0,038	0,7±0,03*	0,5±0,03*

Примітка: * - p<0,001 порівняно з інтактними тканинами.

При витримуванні зразків у t=37°C на початку експерименту кількість клітин-продуцентів ІЛ-1 β в шкірі і поперечносмугованих м'язах в зоні тупої травми повністю відповідає такій при t=18°C, але через 1 годину відбувається їх збільшення на протязі до 2 години експерименту, а потім їх кількість різко зменшується як в дермі, так і в шкірі (рис. 1).

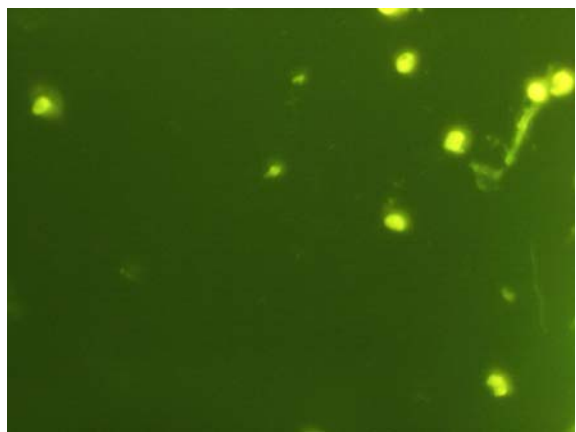


Рис.1. Нечисленні клітини-продуценти ІЛ-1 β в інтерстиції м'язової тканини через 4 години після нанесення зажиттєвого ушкодження м'яких тканин внаслідок тупої травми в експерименті на тлі високої температури (t=37°C). Прямий метод Кунса з МКА до ІЛ-1 β . ×400.

При постмортальній механічній ішемії з миттєвим ушкодженням м'яких тканин після

виведення тварин з експерименту з витримуванням зразків м'яких тканин при t=18°C через 30 хвилин після виведення тварин з експерименту поступово знижується в шкірі і м'язах вміст клітин-продуцентів ІЛ-1 β (рис. 2).

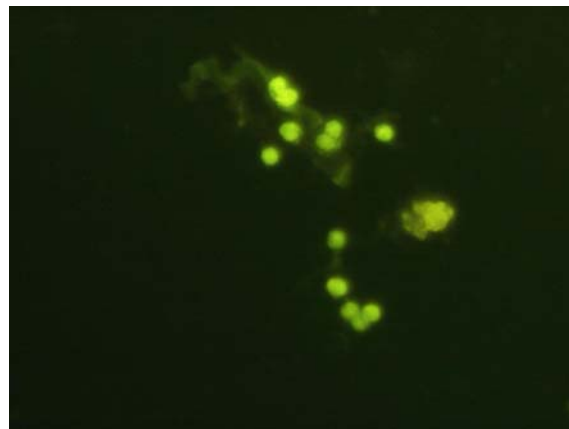


Рис. 2. Клітини, що експресують рецептори до ІЛ-1 β в дермі при постмортальній механічній ішемії на початку експерименту (t=18°C). Прямий метод Кунса з МКА до ІЛ-1 β . ×200.

До 4 годин експерименту практично не залишається клітин, здатних експресувати рецептори до ІЛ-1 β , як в шкірі, так і в м'язах. Витримування зразків м'яких тканин при t=37°C протягом 1 години відповідає морфологічній картині шкіри і поперечно-смугастих м'язів в групі інтакт-

них тварин. При зберіганні зразків зони механічного ішемічного пошкодження при високій температурі відбувається зникнення клітин-продуцентів ІЛ-1β у тканинах вже через 2 години після виведення тварин з експерименту. Витримання зразків м'яких тканин при t=-10°C затримує розвиток посмертних аутолітичних змін

як в шкірі, так і в поперечно-смугастих м'язах, про що свідчить збереження окремими клітинами здатності експресувати рецептори до ІЛ-1β в групі тварин з відтворенням постмортальної механічної ішемії через 6 годин після виведення тварин з експерименту.

Таблиця 3

Імуногістохімічна характеристика дерми й поперечносмугастої мускулатури тварин внаслідок постмортальної механічної ішемії

Групи спостереження	Відносний об'єм клітин-продуцентів ІЛ-1β					
	t=18°C		t=37°C		t=-10°C	
	дерма	м'яз	дерма	м'яз	дерма	м'яз
Інтактні тканини	2,5±0,1	1,4±0,2	2,5±0,1	1,4±0,2	2,5±0,1	1,4±0,2
0 хв	2,3± 0,06	1,4±0,09	2,4± 0,02	1,3±0,05	2,45± 0,06	1,35±0,07
30 хв	2,08±0,02*	1,2±0,03*	1,0 ±0,01*	0,7±0,043*	2,2 ±0,02*	1,2±0,03*
1 год	1,63±0,03*	0,93±0,08	0,3±0,03*	0,23±0,01	2,0±0,04*	1,0±0,02
2 год	0,80±0,05*	0,4±0,02*	сліди	сліди	1,8±0,05*	0,8±0,06
4 год	сліди	сліди	сліди	сліди	1,5±0,02*	0,7±0,01
6 год	сліди	сліди	сліди	сліди	1,2±0,02*	0,5±0,01

Примітка: * - p<0,001 порівняно з інтактними тканинами.

Таблиця 4

Імуногістохімічна характеристика дерми й поперечносмугастої мускулатури при зажиттєвому ушкодженні внаслідок механічної ішемії

Групи спостереження	Відносний об'єм клітин-продуцентів ІЛ-1β					
	t=18°C		t=37°C		t=-10°C	
	дерма	м'яз	дерма	м'яз	дерма	м'яз
Інтактні тканини	2,5±0,1	1,4±0,2	2,5±0,1	1,4±0,2	2,5±0,1	1,4±0,2
0 хв	2,5± 0,02	1,3±0,08	2,4± 0,08	1,3±0,06	2,4± 0,03	1,4±0,06
30 хв	2,8±0,03*	1,6±0,01*	2,0±0,02*	1,0±0,03*	2,6±0,01*	1,5±0,02*
1 год	2,3±0,02*	1,3±0,04	1,5±0,01*	0,7±0,01	2,2±0,05*	1,2±0,05
2 год	2,0±0,03*	1,1±0,04*	1,0±0,02*	0,5±0,03*	2,1±0,05*	1,2±0,04*
4 год	1,4±0,01*	1,0±0,02*	сліди	сліди	2,2±0,06*	1,3±0,03*
6 год	сліди	сліди	сліди	сліди	2,0±0,08*	1,4±0,05*

Примітка: * - p<0,001 порівняно з інтактними тканинами.

При зажиттєвій механічній ішемії м'яких тканин внаслідок миттєвого виведення тварин з експерименту після ушкодження, з утриманням зразків м'яких тканин при t=18°C вміст клітин-продуцентів ІЛ-1β через 1 годину після нанесення ушкодження поступово знижується в шкірі і м'язах. До 6 години експерименту практично не залишається клітин, здатних експресувати рецептори до ІЛ-1β, як в шкірі, так і в м'язах (рис. 3).

Через 30 хвилин після нанесення травми у зразках м'яких тканин, що зберігалися при t=37°C, збільшується популяція клітин-продуцентів ІЛ-1β як в шкірі, так і в поперечно-смугастій мускулатурі. Потім через 1 годину кількість цих клітин знижується, тим не менш, при низькій температурі здатність імунних клітин експресу-

вати рецептори до ІЛ-1β, як в шкірі, так і в м'язах зберігається до кінця експерименту. При зажиттєвій механічній ішемії м'яких тканин з витриманням зразків м'яких тканин при t=-10°C протягом 1 години імуногістохімічна характеристика шкіри і поперечно-смугастої мускулатури відповідає такої при збереженні зразків ушкодженої тканини при кімнатній температурі. Через 1 годину до 6 годин після нанесення ушкодження й виведення тварин з експерименту імуногістохімічна динаміка практично відсутня.

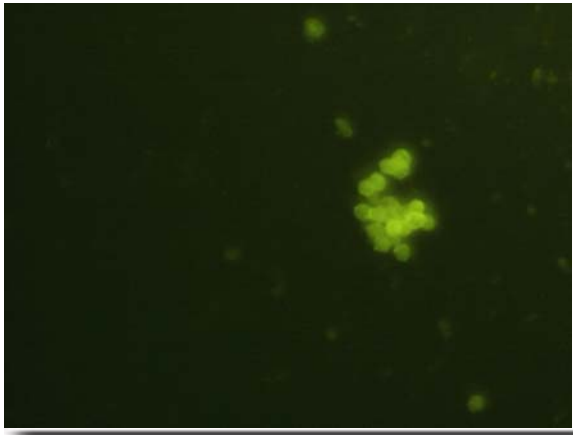


Рис. 3. Скупчення клітин-продуцентів IL-1 β в дермі при життєвій механічній ішемії м'яких тканин внаслідок миттєвого виведення тварин з експерименту після ушкодження з витриманням зразків м'яких тканин при $t=18^{\circ}\text{C}$ протягом 1 години. Прямий метод Кунса з МКА до IL-1 β . $\times 200$.

Підсумок

Проведений аналіз показників відносного об'єму IL-1 β як у дермі, так і у м'язі дозволив встановити статистично значимі порівняльні показники ($p < 0,001$) між посмертними та життєвими ушкодженнями м'яких тканин у ранньому постмортальному періоді. Наявність стабільної імуногістохімічної картини при низьких температурах та зберігання популяції клітин-продуцентів IL-1 β в зонах ушкодження при кімнатній температурі свідчить про можливість використання імуногістохімічних методів у судово-медичній експертизі трупів при встановленні прижиттєвого або посмертного характеру ушкоджень через достатньо великий проміжок часу з моменту настання смерті.

Перспективи подальших досліджень полягають у вивченні інших маркерів життєвих та посмертних травм.

Літературні джерела

Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия / Лилли Р. [пер. с англ.]. – М. : Изд-во иностр. лит-ры, 1969. – 348с.

Early increase in TNF-alpha-containing mast cells in skin lesions / S. Bacci, P. Romagnoli, G. A. Norelli [et al.] // Int. J. Legal Med. – 2006. – Vol.

120, №3. – P. 138–142.

Grellner W. Time-dependent immunohistochemical detection of proinflammatory cytokines (IL-1beta, IL-6, TNF-alpha) in human skin wounds / W. Grellner // Forensic Sci. Int. – 2002. – Vol. 130, № 2/3. – P. 90-96.

Кизь А.В. Исследование посмертной динамики активности клеток-продуцентов интерлейкина (IL-1 β) как маркеров использования гистохимических экспресс-методов при судебно-медицинской экспертизе трупов.

Резюме. Для определения возможностей и условий биохимической активности в коже и мышцах как маркера прижизненных и посмертных травм при проведении экспериментальных качественных макрогистохимических экспресс-реакций возникла необходимость использования контрольного лабораторного метода. Для этого было использовано сравнение наличия и количества иммунных клеток, которые способны экспрессировать рецепторы к IL-1 β (клеткам-продуцентам интерлейкина) при прижизненных и посмертных повреждениях в зависимости от температурного режима в различные промежутки времени. Экспериментальные исследования были проведены на крысах линии Wistar. Травматические изменения вызвались дозированными ударами в бедро наркотизированных животных с использованием специального устройства, ишемические – перевязкой сосудов. Иммунные клетки дифференцировали с помощью моноклональных антител к клеткам-продуцентам IL-1 β фирмы «Serotec». Была проведена оценка иммуногистохимических признаков для прижизненной и постмортальной тупой травмы от момента травмирования с последующей экспозицией образцов мягких тканей на протяжении 30 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч и 6 ч при температурных режимах $+18^{\circ}\text{C}$, $+37^{\circ}\text{C}$, -10°C . Проведенный анализ показателей относительного объема IL-1 β как в дерме, так и в мышцах позволил установить статистически значимые сравнительные показатели ($p < 0,001$) между посмертными и прижизненными повреждениями мягких тканей в раннем постмортальном периоде. Наличие стабильной иммуногистохимической картины при низких температурах и сохранение популяции клеток-продуцентов IL-1 β в зонах повреждения при комнатной температуре свидетельствует о возможности использования иммуногистохимических экспресс-методов в судебно-медицинской экспертизе трупов при установлении прижизненного или посмертного характера повреждений через достаточно большой промежуток времени, прошедший с момента наступления смерти.

Ключевые слова: судебно-медицинская экспертиза, прижизненные и посмертные повреждения, кожа, мышца, клетки-продуценты IL-1 β .