

ПЕРСПЕКТИВЫ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

© Е.И. Суркова, 2014
УДК 340.6

Е.И. Суркова

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДАВНОСТИ МЕХАНИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

ООО «Микротесты в биологии, медицине и ветеринарии» (генеральный директор – М.И. Елагина)

В статье приведены основные иммуногистохимические маркёры для определения сроков давности механических повреждений. Маркёры подразделены на две группы: маркёры ран давностью несколько минут-часов (TGFβ1, TGFα, фибронектин, IL1β, IL6, TNFα, ICAM-1, VCAM-1, E- и L-селектины) и маркёры ран давностью несколько дней (тенасцин, коллагены III, V, VI, I, p53). Использование иммуногистохимического метода в судебной медицине позволяет более точно подходить к вопросам дифференциации травматических повреждений в зависимости от сроков их давности.

Ключевые слова: иммуногистохимический анализ, давность повреждения, маркёр давности повреждения.

WOUND AGE ESTIMATION BY IMMUNOHISTOCHEMICAL METHOD

E.I. Surkova

The article presents main immunohistochemical markers for estimation of wound age. Markers are divided into two groups: markers of wound age estimated in minutes-hours (TGFβ1, TGFα, fibronectin, IL1β, IL6, TNFα, ICAM-1, VCAM-1, E- and L-selectins) and markers of wound age estimated in days (tenascin, collagen III, V, VI, I, p53). Using immunohistochemical method in forensic medicine allows more accurate approach to the differentiation of traumatic injuries, depending on the wound age.

Key words: immunohistochemical analysis, wound age, marker of wound age.

Введение:

Как известно, в судебной медицине крайне важным является не только выявление прижизненности нанесения механического повреждения, но и определение сроков давности формирования повреждения. Под давностью раны подразумевают интервал времени между нанесением повреждения и наступлением смерти [10]. Давность раны определяют по выраженности процессов регенерации, но чем короче посттравматический интервал, тем сложнее определить временной показатель давности повреждения [9]. Несмотря на этапность развития изменений в очаге повреждения, определение давности повреждений по характеру клеточных реакций вызывает у гистологов большие затруднения. Однако использование иммуногистохимического (ИГХ) метода в судебной медицине позволяет более точно определить возраст повреждения. ИГХ маркёры различного возраста раны были определены, исходя из знаний о течении воспалительного процесса в ране и длительности каждой фазы по времени. Раневой процесс включает три фазы: фаза воспаления, фаза регенерации или пролиферации, фаза реорганизации рубца и эпителизации. Непосредственно в первые часы после ранения наблюдается период сосудистых изменений: изменение проницаемости сосудов с последующей экссудацией, миграция лейкоцитов и других клеточных элементов, фагоцитоз некротизированных тканей, набухание

коллагена и синтез основного вещества. С 6-го дня после травмы начинают развиваться восстановительные регенеративные процессы, с 15-го дня образуется уже рубец [4]. Различные клеточные популяции, приходящие в рану, экспрессируют или секретируют различные молекулы, на основании знаний о которых и был составлен список ИГХ маркёров для определения давности ран от несколько минут до нескольких дней.

Список ИГХ маркёров может несколько отличаться для различных типов ран. Это связано с особенностями течения процесса регенерации при различных повреждениях. Большинство ран, причинённых острыми предметами, регенерируют первичным натяжением, тогда как раны от действия тупых орудий и огнестрельного оружия заживают преимущественно вторичным натяжением. Однако, сведений об ИГХ маркёрах давности ран, нанесённых тупым предметом, значительно меньше, чем данных об ИГХ маркёрах возраста колото-резаных ран, что не позволяет составить полный список ИГХ маркёров для определения давности ран, нанесённых тупым предметом.

В таблице 1 приведён обобщённый список ИГХ маркёров для определения давности ран в несколько минут-часов, составленный на основании исследования колото-резаных ран. Первый маркёр – трансформирующий фактор роста бета 1 (TGFβ1), его источником в ране служат тромбоциты. TGFβ1 служит хемоаттрактантом для

Таблица 1

Обобщенный список ИГХ маркёров давности кожных ран несколько минут-часов [10]

Название ИГХ маркёра	Ранняя детекция	Основная детекция
TGF- β 1	Несколько мин	30-60 мин
TGF α	Около 10 мин	30-60 мин
Фибронектин	Около 10-20 мин	>4 ч
IL-1 β	15 мин	30-60 мин
IL-6	20 мин	60-90 мин
TNF- α	15 мин	60-90 мин
ICAM-1 (CD54)	50 мин	>2 ч
VCAM-1 (CD106)	30 мин	>1,5 ч
E-селектин	30 мин	>1-1,5 ч
L-селектин	30 мин	>1,5 ч

клеток воспаления (в основном, моноцитов) и фибробластов [5]. Существует значительная разница в окрашивании нормальной кожи и колотой раны возрастом несколько минут. В норме TGF β 1 выявляется в дерме, тогда как при повреждении кожи этот фактор начинает уже с первых минут выявляться в эпидермисе, в основном за счёт инфильтрации тромбоцитами. Пик окрашивания на TGF β 1 наблюдается через 30-60 минут после повреждения. Было показано, что этот фактор не выявляется при рельсовой смертельной травме, которая характеризуется значительно меньшим временем до наступления смерти. Трансформирующий фактор роста альфа (TGF α) также может служить ИГХ маркёром ран давностью несколько минут. Этот маркёр слабо экспрессируется в нормальной коже, однако его экспрессия сильно возрастает в ранах, возраст которых составляет больше 10 минут. TGF α выполняет функцию стимуляции и регуляции ангиогенеза в процессе заживления ран [1]. Оба фактора, особенно TGF β 1, выявляются и в ранах давностью несколько дней и недель, но такие случаи не составляют труда дифференцировать в связи с наличием развитой грануляционной ткани в месте повреждения [11]. Следующими маркёрами являются провоспалительные цитокины – фактор некроза опухоли альфа (TNF α), интерлейкин 1 бета (IL1 β) и интерлейкин 6 (IL6). Эти маркёры слабо экспрессированы (IL1 β и TNF α) или отсутствуют (IL6) в нормальной коже, однако в процессе развития воспаления источником этих цитокинов становятся различные типы клеток (макрофаги, эндотелиальные клетки, кератиноциты). Увеличение эпидермальной экспрессии IL1 β и IL6 начинается после 15-20 минут после повреждения, для TNF α аналогичный показатель составляет 15 минут. Пик окрашивания для IL1 β достигается через 30-60 минут после повреждения и продолжается до 90 минут, когда выявляется более 50% окрашенных кератиноцитов базального, шиповатого и затем зернистого слоя эпидермиса [4, 9]. При этом был выявлен наиболее широкий паттерн окрашивания эпидермиса и дермы для TNF α по сравнению с IL1 β и IL6 [9]. Фибронектин также может служить полезным маркёром для определения давности механических повреждений, он начинает выявляться в ранах давностью несколько минут [3]. Кроме того, было показано, что фибронектин экспрессируется с одинаковым временным показателем как в случае колото-резаных ран, так и в случае ран, нанесённых тупым предметом [13]. E- и L- селектины начинают выявляться иммуногистохимически через 30 минут после повреждения. В отличие от L-селектина, E-селектин не присутствует в нормальной коже, поэтому является более подходящим маркёром для определения давности ран [7]. Молекула клеточной адгезии ICAM-1 может в небольшом количестве присутствовать в нормальной коже (эндотелиальные клетки, кератиноциты, активированные лейкоциты), однако значительное

Таблица 2

Обобщенный список ИГХ маркёров давности кожных ран несколько дней [4, 10]

Название ИГХ маркёра	Ранняя детекция	Основная детекция
Тенасцин	2-3 дня	От 5 дней
Коллаген III	2-3 дня	От 6 дней
Коллаген V	3 дня	От 6 до 7 дней
Коллаген VI	3 дня	От 6 до 7 дней
p53	3 дня	8 дней
Коллаген I	4-6 дней	С 7 дней
Полное окрашивание базального слоя на кератин 5	13 дней	От 23 дней
Маркёры миофибробластов		
Ламинин	Около 1,5 дней	
HSPG	Около 1,5 дней	
Коллаген IV	4 дня	
Гладкомышечный актин	5 дней	
Маркёры макрофагов		
RM 3/1	7 дней	
25 F 9	11 дней	
G 16/1	12 дней	
Маркёры эпителиальной базальной мембраны		
Фрагменты (ламнина, HSPG, коллагена IV и VII)	4 дня	От 13 дней

увеличение экспрессии наблюдается через 2 часа после повреждения [6]. Другой иммуноглобулин с адгезионной функцией – VCAM – не выявляется в нормальной коже [14], однако значительно представлен в ранах давностью более 1,5 ч [8].

В таблице 2 приведён обобщённый список ИГХ маркёров для определения давности ран в несколько дней, составленный на основании исследования колото-резаных ран. Положительное окрашивание на тенасцин и коллаген III указывают на давность повреждения не менее 2-3 дней, тогда как позитивный результат при использовании антител к коллагену V и VI – на возраст раны 3 дня. p53 начинает выявляться в фибробластах на 3 день после повреждения и его экспрессия достигает максимума на 8 день [12]. Коллаген I выявляется как ассоциированный с фибробластами продукт в ранах давностью более 4 дней. Фибробласты, положительно окрашенные на ламинин и гепаран сульфат протеогликан (HSPG), выявляются в повреждениях возрастом 1,5 дня и более, а коллаген IV – позитивные фибробласты – в ранах 4-х дневной давности. Гладкомышечный актин начинает экспрессироваться в фибробластах после достижения раной возраста 5 дней. Фрагменты базальной мембраны, позитивные по ламинину, HSPG, коллагену IV и VII, указывают на возраст раны 4 дня и более. После чего такие фрагменты отсутствуют вплоть до срока раны 13 дней [2].

Обсуждение:

ИГХ анализ является полезным инструментом для более точного, по сравнению с другими методиками, определения давности различных видов ран. Наиболее полезным при проведении ИГХ анализа определения давности ран может считаться параметр ранней детекции маркёра, т.е. минимальный возраст раны. Кроме того, рекомендуется учитывать для определения давности раны только результаты положительного окрашивания, негативный результат окрашивания не может считаться достаточным для определения возраста раны.

При проведении ИГХ исследования, с целью определения давности повреждения, следует использовать контрольные образцы неповрежденной кожи для сравнения показателей анализа и определения базового уровня экспрессии маркёров. Кроме того, как и при проведении любого ИГХ анализа, исследование должно включать внутренние негативный и позитивный контроли окрашивания. В качестве негативного контроля первичные

антитела заменяют неиммунной сывороткой аналогичной концентрации. В качестве положительного контроля используют ткань, заведомо содержащую исследуемый

антиген. Использование внутренних контролей позволяет добиться эффективного окрашивания путём подбора разведений и условий.

Литература:

1. **Bennett N.T., Schultz G.S.** Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am. J. Surg.* 1993; 165: 728-737.
2. **Betz P.** Immunohistochemical parameters for the age estimation of human skin wounds. A review. *Am J Forensic Med Pathol.* 1995; 16(3): 203-209.
3. **Betz P., Nerlich A., Wilske J., Tübel J., Wiest I., Penning R., Eisenmenger W.** Immunohistochemical localization of fibronectin as a tool for the age determination of human skin wounds. *Int J Legal Med.* 1992; 105(1): 21-26.
4. **Cecchi R.** Estimating wound age: looking into the future. *Int J Legal Med.* 2010; 124(6): 523-536.
5. **Diegelmann R.F., Evans M.C.** Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience.* 2004; 9: 283-289.
6. **Dressler J., Bachmann L., Kasper M., Hauck J.G., Müller E.** Time dependence of the expression of ICAM-1 (CD 54) in human skin wounds. *Int J Legal Med.* 1997; 110(6): 299-304.
7. **Dressler J., Bachmann L., Koch R., Müller E.** Enhanced expression of selectins in human skin wounds. *Int J Legal Med.* 1999 (1); 112(1): 39-44.
8. **Dressler J., Bachmann L., Koch R., Müller E.** Estimation of wound age and VCAM-1 in human skin. *Int J Legal Med.* 1999 (2); 112(3): 159-162.
9. **Grellner W.** Time-dependent immunohistochemical detection of proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α) in human wounds. *Forensic Science International.* 2002; 130: 90-96.
10. **Grellner W., Madea B.** Demands on scientific studies: vitality of wounds and wound age estimation. *Forensic Science International.* 2007; 165: 150-154.
11. **Grellner W., Vieler S., Madea B.** Transforming growth factors (TGF- α and TGF- β 1) in the determination of vitality and wound age: immunohistochemical study on human skin wounds. *Forensic Science International.* 2005; 153: 174-180.
12. **Hausmann R., Nerlich A., Betz P.** The time-related expression of p53 protein in human skin wounds--a quantitative immunohistochemical analysis. *Int J Legal Med.* 1998; 111(4): 169-172.
13. **Van de Goot F.R., Korkmaz H.I., Fronczek J., Witte B.I., Visser R., Ulrich M.M., Begieneman M.P., Rozendaal L., Krijnen P.A., Niessen H.W.** A new method to determine wound age in early vital skin injuries: A probability scoring system using expression levels of fibronectin, CD62p and Factor VIII in wound hemorrhage. *Forensic Sci Int.* 2014; 244C: 128-135.
14. **Van Der Laan N., de Leij L.F., ten Duis H.J.** Immunohistopathological appearance of three different types of injury in human skin. *Inflamm Res.* 2001; 50(7): 350-356.

© В.И. Витер, С.В. Чирков, А.В. Литвинов, 2014
УДК 616.831.4-005.1.099:612.398.1

В.И. Витер¹, С.В. Чирков², А.В. Литвинов³

О ВОЗМОЖНОСТИ ДИАГНОСТИКИ ЛОКАЛЬНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ МЯГКИХ ТКАНЕЙ СТЕНОК РОТОВОЙ ПОЛОСТИ У ЖИВЫХ ЛИЦ ТЕРМОМЕТРИЧЕСКИМ СПОСОБОМ

¹Кафедра судебной медицины (зав. кафедрой – проф. В.И. Витер)

ГБОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия» МЗ РФ;

²ГКУЗ ХМАО-Югры «Бюро судебно-медицинской экспертизы» (нач. бюро – С.В. Чирков);

³ГКУ «Курганское областное бюро судебно-медицинской экспертизы» (нач. бюро – А.В. Литвинов)

Статья посвящена вопросам диагностики давности механической травмы у живых лиц. В качестве проявлений бывшего травматического воздействия на тело пострадавшего человека изучены кровоизлияния, локализующиеся под слизистой оболочкой мягких тканей, составляющих стенки ротовой полости. Изученные повреждения располагались на слизистой губ, десен и поверхности щек. Представлены данные исследования 106 живых лиц, проходивших экспертизу в ГКУЗ ХМАО-Югры «Бюро судебно-медицинской экспертизы» в период с 2008 по 2014 гг. Установлено, что средневзвешенная относительная температура повреждения уменьшается по мере увеличения длительности посттравматического периода по закону, наиболее достоверно описываемому полиномиальным трендом третьей степени. Разработано математическое выражение, позволяющее произвести расчет давности механического воздействия.

Ключевые слова: давность травмы, слизистая оболочка ротовой полости, кровоизлияние, температура, инфракрасная термометрия.

ABOUT POSSIBILITY OF DIAGNOSTICS OF LOCAL DAMAGES OF SOFT FABRICS OF WALLS OF A MOUTH AT ALIVE PERSONS IN THE THERMOMETRIC WAY

V.I. Viter, S.V. Chirkov, A.V. Litvinov

Article is devoted questions of diagnostics of prescription of a mechanical trauma at live persons. As displays of the former traumatic influence on a body of the suffered person the hemorrhages localised under a mucous membrane of soft fabrics, making mouth walls are studied. The studied damages settled down on mucous lips, gums and a surface of cheeks. The researches of 106 live persons presented, passing examination in «The forensic medical examination Bureau», Khanty-Mansiysk, Russia, during the period with 2008 for 2014. Established, that the average relative temperature of damage decreases in process of increase in duration of the posttraumatic period under the law most authentically described by polynomial trend of the third degree. The mathematical expression developed, allowing settling an invoice prescription of the mechanical influence.

Key words: prescription of a trauma, a mouth mucous membrane, a hemorrhage, temperature, infrared thermometry.

Локальным повреждениям мягких тканей тела человека всегда уделялось пристальное внимание судебно-ме-

дицинских экспертов, поскольку на основе особенностей морфологических характеристик этих повреждений реша-