

КУПРИЯНОВ

Дмитрий Дмитриевич

**ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
ПРИЖИЗНЕННОСТИ ПОВРЕЖДЕНИЙ МЯГКИХ ТКАНЕЙ
ТУПЫМИ ТВЕРДЫМИ ПРЕДМЕТАМИ**

3.3.5. Судебная медицина (медицинские науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России)

Научный руководитель:

ФЕДУЛОВА Мария Вадимовна

доктор медицинских наук, доцент

Официальные оппоненты:

Савченко Сергей Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой судебной медицины федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ягмуров Оразмурад Джумаевич – доктор медицинских наук, профессор, начальник Санкт-Петербургского государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Бюро судебно-медицинской экспертизы»

Ведущая организация: федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Защита состоится «___» _____ 2025 года в ___ часов на заседании диссертационного совета 21.1.057.01 (Д 208.070.01) на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 125284, г. Москва, ул. Поликарпова, д. 12/13.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте <http://rc-sme.ru> ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России.

Автореферат разослан «___» _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, доцент

Нагорнов Михаил Николаевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Проблема диагностики прижизненности и давности образования повреждений существует столько, сколько существует судебно-медицинская экспертиза. Установление экспертным путем прижизненности и давности, или как принято сейчас называть в западной литературе, тайминг повреждений, имеет четкую правовую проекцию, поскольку обеспечивает правоохранительные и правоприменительные органы информацией о времени образования повреждений, и, что не менее важно, закладывает основу их последующей правовой квалификации. Доказать прижизненность и установить давность образования повреждений, по сути, является одним из важнейших этапов производства судебно-медицинской экспертизы трупа, от качества выполнения которого зависит как правильность последующих выводов эксперта, так и последующая юридическая перспектива дела.

На важность и приоритетность разрешения вопроса прижизненности повреждений при расследовании преступлений против здоровья и жизни личности обращено особое внимание в национальном руководстве по судебной медицине [Болдарян А. А., Буромский И. В. и др., 2021].

Недостатками классического гистологического метода диагностики прижизненности и давности повреждений, основанного на исследовании перифокальных сосудистых и клеточных реакций, являются: недостаточный учет индивидуальных особенностей динамики перифокальных реакций; возможность посмертного воспроизведения отдельных реакций «сосудистого» типа вследствие переживаемости тканей. К настоящему времени признаки, которые достоверно свидетельствовали бы о прижизненности повреждений давностью до 30–40 минут и не воспроизводились бы в посмертных повреждениях, не установлены, а все исследования в этой области носят экспериментальный характер.

В литературе известны приблизительно два десятка ИГХ маркеров, которые были исследованы на предмет возможности диагностики прижизненности и давности повреждений ИГХ методами. Тем не менее, проблема достоверного определения прижизненности и давности повреждений, особенно на малых интервалах времени от причинения травмы до наступления смерти, не нашла уверенного научного и практического решения. Таким образом, тема настоящего диссертационного исследования является актуальной.

Степень разработанности темы исследования

В 2000 году С. Hernández-Cueto, проведя обзор выполненных к тому времени исследований, констатировал, что в диагностике прижизненности повреждений специалисты вынуждены опираться преимущественно на свой практический опыт классического гистологического исследования; вопрос установления прижизненности повреждений остается до конца не решенной проблемой судебной медицины. В заключение автор отметил, что для дальнейшего решения проблемы диагностики прижизненности необходима разработка и применение чувствительных и специфических маркеров посредством исследований в области гистохимии, энзимологии и биохимии [Hernández-Cueto С., 2000]. В 2011 году R.V. Dettmeyer обобщил результаты уже достаточно многочисленных работ по

иммуногистохимии, указав на их важность и перспективность разработки, в то же время отметив, что основным методом диагностики все еще остается классическая судебно-медицинская гистология [Dettmeyer R. В., 2011].

Научный интерес к проблеме современных методов диагностики прижизненности повреждений породил запрос на разработку соответствующих методов иммуногистохимической диагностики, который находит отражение, в том числе, в свежих работах отечественных исследователей (например, [Халиков А. А., Кузнецов К. О. и др., 2022]) и в многочисленных зарубежных исследованиях, которые продолжают проводиться в настоящее время. Известно об отдельных случаях применения в экспертной практике ИГХ диагностики прижизненности странгуляционной борозды по методу Богомолова Д.В. и соавт. [Богомолов Д. В., Збруева Ю. В. и др., 2016; Богомолов Д. В., Путинцев В. А. и др., 2017; Богомолов Д. В., Путинцев В. А. и др., 2018; Богомолов Д. В., Фетисов В. А. и др. 2018], а также прижизненности повреждений мягких тканей по методу Хромовой А.М. [Хромова А. М., 2002; Хромова А. М., Калинин Ю. П., 2003] с участием авторов.

Несмотря на большое количество исследований и наличие достаточно широкого спектра исследованных ИГХ маркеров, в настоящее время в судебно-медицинской практике отсутствуют какие-либо разработанные до стадии практического применения и рутинно используемые научно обоснованные методы иммуногистохимической диагностики прижизненности повреждений мягких тканей твердыми тупыми предметами.

Цель исследования

Установление целесообразности применения некоторых иммуногистохимических антител с определением оптимальных маркеров и разработка метода иммуногистохимической диагностики прижизненности повреждений мягких тканей тупыми твердыми предметами.

Задачи исследования

1. Выявить проблемы диагностики прижизненности повреждений мягких тканей ИГХ методом путем проведения анализа отечественной и зарубежной специальной литературы и определить наиболее перспективные ИГХ маркеры прижизненности повреждений мягких тканей, экспрессия которых проявляется в максимально короткое время после причинения повреждения.

2. В эксперименте оценить наличие, выраженность экспрессии намеченных ИГХ маркеров и связанных с ней явлений в гистологическом материале кожи с прижизненными, посмертными повреждениями и в контрольных интактных образцах.

3. Установить диагностическую значимость намеченных маркеров для судебно-медицинской диагностики прижизненности повреждений мягких тканей тупыми твердыми предметами.

4. Сформировать систему оценки экспрессии диагностически значимых маркеров, на ее основании провести статистическую обработку полученных результатов и разработать практический ИГХ метод.

Научная новизна исследования

В результате проведенного исследования впервые было доказано наличие достоверной экспрессии антигена TGF β 1 в кератиноцитах в области прижизненных

повреждений при отсутствии либо очень слабой экспрессии в образцах кожи с посмертными повреждениями и без повреждений, которые были получены от одного и того же субъекта и исследованы в сравнении. Данный феномен объяснен активацией латентного TGF β 1 в кератиноцитах медиаторами плазмы, появляющимися в зоне альтерации. На основании этого был сделан вывод о диагностической значимости TGF β 1 в качестве маркера прижизненности повреждений, полученных в результате тупой травмы, и разработана система полуколичественной оценки выраженности экспрессии маркера.

Впервые в аутопсийных образцах кожи с прижизненными и посмертно причиненными повреждениями от одних и тех же субъектов с помощью морфометрического метода доказано повышение плотности дермальных тучных клеток в зоне прижизненных повреждений; в то же время установлена роль феномена переживаемости тканей в аналогичной реакции тучных клеток в зоне посмертных повреждений и сформулированы препятствия к разработке соответствующего практического метода.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Разработан ИГХ метод с применением антител к TGF β 1 для определения прижизненности кровоизлияний в коже в области кровоподтеков ранней (до 30–40 минут) давности.

Установлена неэффективность использования для этой цели антител к P-селектину (CD62p), аквапорину-3 (AQP3), а также вычисления коэффициента дегрануляции дермальных тучных клеток в зоне повреждения. Определена необходимость дальнейшей теоретической проработки и экспериментальных исследований с высокомолекулярным белком HMGB1.

Экспериментально подтвержден факт повышения плотности дермальных тучных клеток в области прижизненных повреждений по сравнению с посмертными и материалом без повреждений, при этом доказана низкая результативность диагностики прижизненности механических повреждений кожи на основании оценки динамики плотности дермальных тучных клеток.

Методология и методы диссертационного исследования

Основу методологии исследования составили изучение отечественной и зарубежной литературы о современном состоянии ИГХ диагностики прижизненности повреждений и возникающих при этом проблемах, проведение сравнительного анализа и обобщение полученных результатов гистологического исследования аутопсийного материала, статистическая их обработка.

Диссертационное исследование выполнено на материале, представляющем собой фрагменты от 50 трупов лиц обоего пола в возрасте от 22 до 49 лет, скончавшихся на месте происшествия, поступивших в Бюро судмедэкспертизы (г. Москва). Реализация иммуногистохимического метода, микроскопическое изучение морфологических признаков, выявление закономерностей и создание метода определения прижизненности повреждений были осуществлены на базе отдела морфологической судебно-медицинской экспертизы ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России.

На первом этапе проводили информационный поиск и анализ данных, опубликованных в отечественной и иностранной литературе.

На втором этапе при судебно-медицинских исследованиях трупов проводили взятие материала из области кровоподтеков для гистологического и ИГХ исследований, а также получение образцов с посмертными повреждениями и контрольных (интактных).

На третьем этапе проводили микроскопическое исследование с применением традиционных гистологических и ИГХ методов, в части случаев – с полноформатным сканированием микропрепаратов.

На четвертом этапе выполняли статистическую обработку результатов микроскопического исследования, в части случаев – компьютерную обработку с проведением морфометрического исследования полноформатных сканов, анализировали полученные результаты.

На пятом этапе формировали метод иммуногистохимической диагностики прижизненности повреждений мягких тканей тупыми твердыми предметами.

Методы диссертационного исследования были одобрены решением Комитета по этике ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России (протокол № 6 от 27.09.2022 г.).

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Выявлена специфичная экспрессия TGF β 1 в образцах кожи, прижизненно поврежденной тупыми твердыми предметами, по сравнению с контрольными образцами неповрежденной и посмертно поврежденной кожи; предложена гипотеза двунаправленной активации TGF β 1 в структурах поврежденной кожи.

2. Предложен иммуногистохимический метод с использованием антитела к TGF β 1, позволяющий достоверно диагностировать прижизненность повреждений кожи тупыми твердыми предметами до развития воспалительно-репаративных реакций.

3. Доказана неэффективность Р-селектина (CD62p), аквапорина-3 (AQP3), а также дегрануляции дермальных тучных клеток как маркеров прижизненности повреждений тупыми твердыми предметами ранней (до 30–40 минут) давности; на данном этапе исследований установлена неубедительность выявленных различий в локализации и выраженности экспрессии в коже HMGB1 для использования указанного маркера в целях определения прижизненности.

4. Доказано с помощью морфометрического метода повышение плотности дермальных тучных клеток в образцах кожи с прижизненными повреждениями по сравнению с образцами с посмертными повреждениями и без таковых; статистически обоснована нецелесообразность разработки каких-либо основанных на этом диагностических методов.

Связь работы с научными программами, планами, темами

Диссертационная работа выполнялась в соответствии с научно-исследовательской программой ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России и планом государственного задания на 2021–2023 годы на осуществление научных исследований и разработок на тему прикладного научного исследования «Судебно-медицинская диагностика механической травмы мягких тканей и головного мозга (ДАП) современными морфологическими методами».

Тема диссертации утверждена на заседании Ученого совета ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России (протокол № 5 от 28 сентября 2022 года).

Обоснованность и степень достоверности полученных результатов

Достоверность и объективность полученных результатов, обоснованность выводов научной работы подтверждены достаточным объемом исследованного материала, адекватностью использованных информативных традиционных и современных морфологических методов исследования.

Разработанные практические рекомендации научно обоснованы полученными результатами исследования.

Первичная документация и материалы статистической обработки проверены и признаны достоверными, подлинными и соответствующими содержанию диссертационной работы (акт проверки первичной документации от 12 марта 2025 года).

Апробация результатов диссертации

Диссертационная работа апробирована и рекомендована к защите на заседании расширенной научной конференции ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России (протокол № 1 от 07 апреля 2025 года).

Обсуждение основных положений диссертации

Основные положения диссертационной работы представлены на заседаниях Ученого совета ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России (2022–2024), на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Вехи истории Российского центра судебно-медицинской экспертизы. К 90-летию со дня образования» (Москва, 2021), IX Всероссийском съезде судебных медиков с международным участием «Судебно-медицинская наука и экспертная практика: задачи, пути совершенствования на современном этапе» (Москва, 2023), Всероссийском междисциплинарном конгрессе по непрерывному профессиональному медицинскому образованию работников здравоохранения «ЗОНТ: здоровье, образование, наука, технологии» (Москва, Красногорск, 2023), Всероссийской научно-практической конференции «Современные проблемы судебно-медицинской гистологии» (Санкт-Петербург, 2024).

Внедрение результатов исследования

Разработанный методологический подход к оценке прижизненности механических повреждений мягких тканей тупыми твердыми предметами ранней давности причинения и положения иммуногистохимической методики диагностики прижизненности с применением антител к TGFβ1 внедрены в практическую работу врачей – судебно-медицинских экспертов ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России, ГБУЗ г. Москвы «Бюро судебно-медицинской экспертизы Департамента здравоохранения города Москвы», ГБУЗ ОТ «Кузбасское клиническое бюро судебно-медицинской экспертизы».

Результаты научного исследования используются в обучении студентов, клинических ординаторов и аспирантов профильной дисциплины, а также в рамках последипломного образования на семинарах и курсах повышения квалификации врачей по специальности «Судебно-медицинская экспертиза» в ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России, на кафедрах судебной медицины ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования», ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им.

Н.И. Пирогова», судебной медицины, правоведения ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет».

Разработанный метод иммуногистохимического установления прижизненности повреждений кожи тупыми твердыми предметами опубликован в Методических рекомендациях ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России. Основные положения диссертационного исследования использованы в учебном пособии для врачей судебно-медицинских экспертов «Иммуногистохимическое исследование в судебно-медицинской гистологии», выпущенном в ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России в 2022 г. при соавторстве диссертанта.

Личный вклад автора

Автором разработаны концепция, план и дизайн научного исследования, осуществлены поиск и изучение научной литературы по теме исследования; выполнена вырезка гистологического материала для микроскопического исследования; проведены микроскопическое исследование всего объема материала с применением рутинных гистологических и ИГХ методов окрашивания, полноформатное сканирование микропрепаратов, компьютерная обработка сканов с морфометрическим исследованием, статистическая обработка результатов с использованием программы StatPlus 8.0.3.; проведена интерпретация и анализ на основе статистического анализа и обобщения полученных результатов.

Автором подготовлены рукописи всех публикаций по теме диссертации; разработаны (при соавторстве научного руководителя) и оформлены для направления в печать методические рекомендации по ИГХ диагностике прижизненности повреждений кожи тупыми твердыми предметами с применением антител к TGFβ1.

Общедолевой вклад автора в выполнение работы составил 95%.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Область диссертационного исследования соответствует паспорту научной специальности 3.3.5. Судебная медицина (медицинские науки), а именно пункту 4 – «Исследование повреждений, механизмов их возникновения, определение давности, изменчивости и прижизненности, методов исследования и критериев судебно-медицинской оценки, а также идентификации орудия травмы по морфологическим признакам повреждения, в том числе с использованием метода математического моделирования. Разработка методов визуализации повреждений для целей следственной и судебной практики».

Публикации по теме исследования

Основные результаты диссертации опубликованы в 11 научных публикациях, из которых 4 – в издании, рекомендованном ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, индексируемом в базах данных PubMed и Scopus (журнал «Судебно-медицинская экспертиза»).

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, четырех глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка используемой литературы, включающего 167 источников, в том числе 45 отечественных и 122 иностранных, списка иллюстративного материала. Работа изложена на 121

странице машинописного текста. Диссертация иллюстрирована 7 таблицами и 23 рисунками, в том числе: 17 микрофотоиллюстрациями, 6 схемами и диаграммами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

В качестве материала для диссертационного исследования в серийном эксперименте по применению ИГХ метода для диагностики прижизненности были использованы образцы кожи из области перифокальной зоны прижизненных и посмертно причиненных повреждений, полученных в результате травмы тупыми твердыми предметами (исключая повреждения в проекции трупных пятен). Материал был получен при секционном судебно-медицинском исследовании в Бюро судмедэкспертизы 40 трупов лиц (24 мужчин и 16 женщин) с достоверно известным возрастом от 22 до 49 лет, с механическими повреждениями, образовавшимися вследствие падения с большой высоты, дорожно-транспортной или рельсовой травмы в г. Москве и обусловившими наступление смерти в течение ближайших минут после травмы, что было во всех случаях подтверждено характером и объемом повреждений (массивные разрушения головного мозга, разрывы крупных артериальных сосудов). В экспериментальный материал не включали образцы от трупов с установленным наличием в органах и средах алкоголя и/или наркотических и психотропных веществ.

Контрольные образцы кожи без повреждений и экспериментальные посмертные повреждения (полученные путем удара бойком секционного молотка) от тех же трупов получали из областей тела, симметричных прижизненным повреждениям.

Фрагменты кожи (всего 120) изымали в 1-е сутки постмортального периода при отсутствии аутолитических и гнилостных процессов, размером около 2x1 см (по поверхности кожи) на глубину не более 0,5 см. Объекты разделили на три группы: образцы с прижизненными повреждениями (группа 1), контрольная группа без повреждений (группа 2), контрольная группа с посмертными повреждениями (группа 3).

Со всех указанных объектов было изготовлено 435 срезов, из них 120 – окрашенных гематоксилином и эозином, 315 – с помощью ИГХ метода (Таблица 1).

Кроме этого, в рамках диссертационного исследования был проведен пилотный эксперимент с оценкой дегрануляции тучных клеток. Для этой цели дополнительно использовали материал от 10 других трупов лиц с аналогичными половыми и возрастными характеристиками. У 6 трупов имелись прижизненные механические повреждения, причиненные тупыми твердыми предметами, у 3 трупов – странгуляционные борозды, образовавшиеся при повешении, 1 труп не имел прижизненных повреждений.

У 9 вышеупомянутых трупов с прижизненными повреждениями контрольные образцы получали из симметричных областей тела.

Таблица 1 – Количество исследованного материала в серийном эксперименте

Окраска/антитело	Количество объектов (срезов)			
	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Всего
Гематоксилин и эозин	40	40	40	120
TGFβ1	29	29	29	87
CD62P (P-селектин)	12	12	12	36
AQP3	12	12	12	36
HMGB1	12	12	12	36
Триптаза	40	40	40	120
Итого	145	145	145	435

На коже передней брюшной стенки 1 трупа без прижизненных повреждений нанесли последовательно 5 экспериментальных резаных повреждений (по одному через 3, 6, 9, 12 и 15 ч после наступления смерти).

Таким образом, от 10 трупов в пилотном эксперименте всего были получены 46 объектов (срезов), половина которых была окрашена гематоксилином и эозином, половина – толуидиновым синим / азуром-II и эозином.

Дополнительно, нами было проведено исследование экспертного материала прижизненной странгуляционной борозды и посмертной ссадины (всего 2 объекта) от 1 трупа с применением ИГХ антител к AQP3.

Общее количество исследованных объектов, таким образом, составило 483.

Были применены: классическое гистологическое исследование (основной метод – окраска гематоксилином и эозином, дополнительный метод – окраска толуидиновым синим / азуром-II и эозином в целях выявления дегрануляции тучных клеток; иммуногистохимическое исследование; морфометрическое исследование; статистическое исследование.

Фрагменты кожи немедленно помещали в 10%-ный нейтральный забуференный формалин на 1–2 суток, после чего проводили дорезку материала, доводя размеры образцов до 1,5–2 см длиной, 0,4–0,5 см шириной (по коже), толщиной не более 0,5 см. Далее осуществляли дегидратацию в изопропиловом спирте с применением системы для обработки тканевых образцов по стандартной технологии. С парафиновых блоков изготовили 166 срезов, из них 143 окрасили гематоксилином и эозином, 23 – толуидиновым синим / азуром-II и эозином для детекции тучных клеток.

Микроскопическое исследование в светлом поле проводили на микроскопе Leica DM2500 (окуляры 10х/23мм, объективы 5х, 10х, 20х, 40х, 63х) в проходящем свете. В каждом срезе, окрашенном гематоксилином и эозином, оценивали: состояние эпидермиса и дермы; наличие, выраженность и состав кровоизлияния; состояние сосудов, в том числе по периферии кровоизлияния; наличие и

выраженность отека окружающей ткани. В каждом срезе, окрашенном толуилиновым синим, оценивали наличие тучных клеток и коэффициент их дегрануляции.

Для проведения иммуногистохимического исследования использовали системы визуализации Novolink Polymer Detection Systems и Ventana ultraView Universal DAB Detection Kit, антитела для научных целей: Anti-TGF beta 1 antibody TB21 (ab190503, Abcam); Anti-CD62P antibody (ab118522, Abcam); Recombinant Anti-Aquaporin 3 antibody (ab215853, Abcam); HMGB1 Rabbit mAb (A19529, ABClonal), антитела для диагностических целей Mast Cell Tryptase (10D11, Bond). К антителам для научных целей предварительно подбирали протокол окрашивания с использованием соответствующего контроля: для антител к TGF β 1 – образцы последа и протоковой карциномы молочной железы, для антител к CD62p – фрагмент миндалина (согласно рекомендациям изготовителя), для антител к AQP3 и HMGB1 – образцы неповрежденной кожи.

При микроскопическом исследовании исследовали: выраженность экспрессии TGF β 1 в кератиноцитах эпидермиса на всем его протяжении в препарате, а также в подлежащей дерме, во всех группах образцов; выраженность экспрессии CD62p в эндотелии мелких сосудов дермы на всем ее протяжении в препарате, во всех группах образцов; выраженность экспрессии AQP3 в кератиноцитах эпидермиса на всем его протяжении в препарате, во всех группах образцов; выраженность ядерной и цитоплазматической (по отдельности) экспрессии HMGB1 в кератиноцитах эпидермиса на всем его протяжении в препарате, во всех группах образцов; плотность дермальных тучных клеток, маркированных ИГХ антителами к триптазе.

С помощью морфометрического метода рассчитывали коэффициент дегрануляции и оценивали плотность дермальных тучных клеток, окрашенных ИГХ методом с антителом к триптазе.

Коэффициент дегрануляции подсчитывали путем расчета отношения числа дегранулировавших дермальных тучных клеток к общему числу дермальных тучных клеток в полях зрения большого увеличения (400x) микроскопа, расположенных в 2 ряда последовательно вдоль дермо-эпидермальной границы на всем протяжении препарата, выражали в процентах.

Оценку плотности дермальных тучных клеток, маркированных ИГХ окраской с антителами к триптазе, на первом этапе эксперимента проводили путем визуального подсчета в полях зрения среднего увеличения (200x) микроскопа, расположенных в дерме на всем протяжении препарата вдоль дермо-эпидермальной границы. При окуляре 10x с линейным полем зрения 22мм и объективе 20x площадь 1 поля зрения составила ~0,95 мм².

На втором этапе эксперимента с микропрепаратов, окрашенных ИГХ методом антителами к триптазе тучных клеток, изготовили цифровые изображения – полноформатные сканы (120) в формате .svs на сканере гистологических препаратов Leica Aperio CS2.

Оценку плотности дермальных тучных клеток в сканах проводили с использованием свободно распространяемой программы для анализа изображений цифровой патологии QuPath 0.5.1-x64, выбирая на сканированном изображении

участок микропрепарата на всю толщу дермы (от базального слоя эпидермиса до подкожной клетчатки) общей площадью около 2 мм². Статистическую обработку результатов исследования экспрессии TGFβ1 и динамики плотности дермальных тучных клеток (на 2-м этапе соответствующего эксперимента) проводили с использованием программ Statistica 10.0.1011 и StatPlus 8.0.3.

Для проверки нормальности распределения значений в полученных выборках нами выбран критерий Шапиро-Уилка, как наиболее эффективный критерий проверки гипотезы о принадлежности выборки нормальному закону распределения. Согласно полученным результатам, все выборки значений являлись непараметрическими.

С учетом типа данных (действительный), закона их распределения (не Гауссово), объема выборок (по 29 наблюдений для TGFβ1, по 40 наблюдений для плотности тучных клеток), связи между группами (взаимозависимая) и количества групп (3), был выбран критерий Фридмана, который используется для определения наличия статистически значимой разницы между средними значениями трех или более групп, в которых одни и те же объекты обнаруживаются в разных условиях.

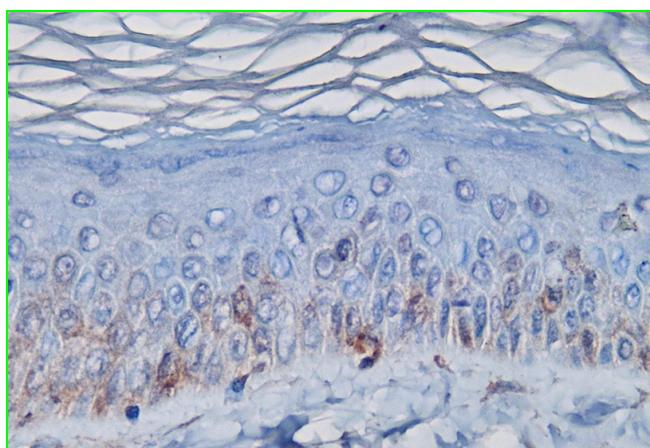
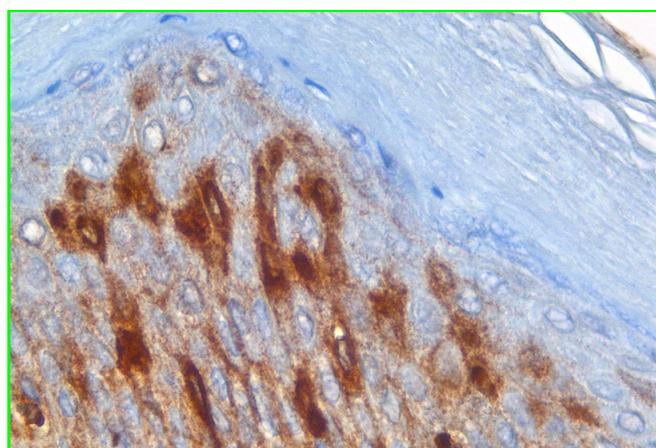
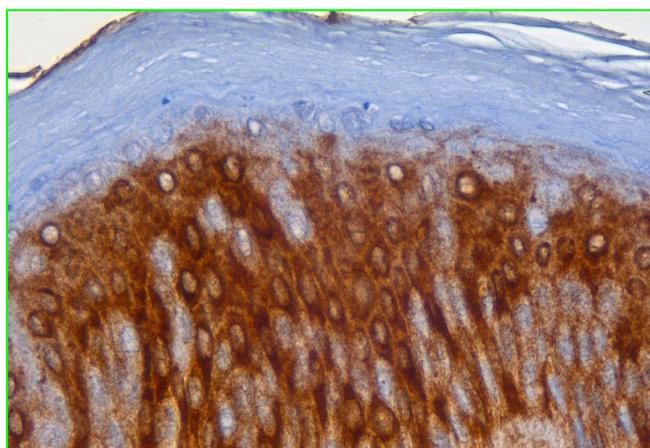
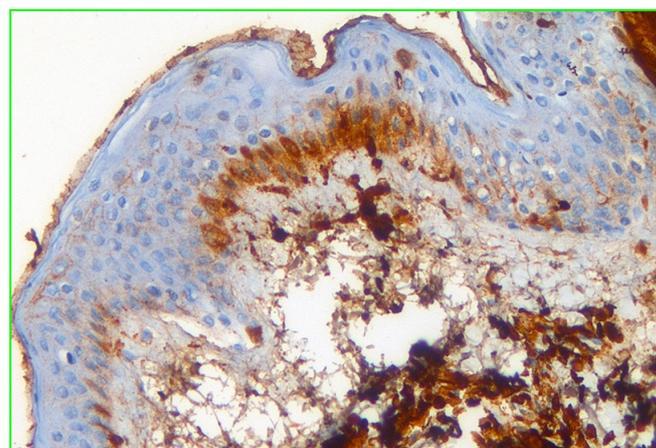
Результаты собственных исследований и их обсуждение

В гистологических микропрепаратах кожи из области прижизненных повреждений (группа 1) во всех 40 случаях в дерме и подкожной жировой клетчатке выявлялись очаговые кровоизлияния, локализовавшиеся в основном на их границе, состоящие из неизмененных, преимущественно плотно расположенных эритроцитов, единичных клеток белой крови, без перифокальной клеточной реакции; при этом эпидермис был без видимых изменений, а в дерме и подкожной клетчатке были обнаружены отек, очаговый спазм мелких артерий, полнокровие, дистония и паретическое расширение мелких вен. В половине исследованных микропрепаратов из области посмертных повреждений (группа 3) было отмечено наличие слабо выраженных рыхлых мелкоочаговых кровоизлияний в дерме, состоящих из неизмененных эритроцитов, без перифокальной реакции, а в некоторых случаях были обнаружены признаки спазма отдельных мелких артерий, полнокровие и дистония мелких вен. Кожа в препаратах без повреждений (группа 2) была без видимых изменений. Таким образом, как видно уже из данного исследования, ряд морфологических признаков, считающихся критериями прижизненности (сосудистые реакции), в некоторых случаях встречается и в посмертных повреждениях, полученных в период жизнеспособности тканей, что подтверждает недостаточную информативность классического метода для установления прижизненности повреждений раннего срока давности.

Выраженность экспрессии TGFβ1 в исследуемом материале варьировала от слабой мелкоочаговой в базальном слое эпидермиса до диффузной выраженной во всей толще эпидермального пласта с распространением на подлежащую дерму, поэтому для последующей унификации и статистической обработки результатов мы разработали и использовали полуколичественную шкалу оценки экспрессии TGFβ1 в эпидермисе (Таблица 2, Рисунки 1–4).

Таблица 2 – Оценка экспрессии TGF β 1 в эпидермисе

Оценка	Наблюдаемая экспрессия
0	Экспрессия отсутствует
1 балл	Слабая мелкоочаговая экспрессия в кератиноцитах (преимущественно в базальном слое)
2 балла	Умеренно выраженная очаговая и мелкоочаговая экспрессия в кератиноцитах
3 балла	Выраженная очагово-диффузная экспрессия в кератиноцитах
4 балла	Экспрессия в подлежащей дерме (при наличии любой положительной экспрессии в кератиноцитах!)

Рисунок 1 – Экспрессия TGF β 1 в эпидермисе 1 балл. ИГХ с антителами к TGF β 1. Ув. 400Рисунок 2 – Экспрессия TGF β 1 в эпидермисе 2 балла. ИГХ с антителами к TGF β 1. Ув. 400Рисунок 3 – Экспрессия TGF β 1 в эпидермисе 3 балла. ИГХ с антителами к TGF β 1. Ув. 400Рисунок 4 – Экспрессия TGF β 1 в эпидермисе 4 балла. ИГХ с антителами к TGF β 1. Ув. 200

Во всех экспериментальных образцах прижизненных повреждений (группа 1) выявлена цитоплазматическая экспрессия TGF β 1 в кератиноцитах (2–3 балла), имевшая распространенность от крупноочаговой до диффузной; дополнительно в 8 образцах выявлена отчетливая дермальная экспрессия (внутренний негативный контроль – не окрашивавшиеся структуры придатков кожи). В контрольных образцах кожи – как без повреждений (группа 2), так и с посмертными повреждениями (группа 3) – экспрессия TGF β 1 в кератиноцитах или не отмечалась, или была очень слабой и локализовалась лишь в некоторых клетках базального слоя (0–1 балл). Дермальная экспрессия в образцах 2 и 3 групп не наблюдалась ни в одном случае. Во всех случаях экспрессия TGF β 1 в образцах 1 группы была более выраженной, чем в соответствующих образцах 2 и 3 групп. Результаты обобщены в Таблице 3.

Таблица 3 – Результаты исследования экспрессии TGF β 1

Балл	Прижизненные, группа 1, n=29	Контроль, группа 2, n=29	Посмертные, группа 3, n=29
0	-	27	17
1 балл	-	2	12
2 балла	11	-	-
3 балла	9	-	-
4 балла	9	-	-

Результаты статистической обработки с применением критерия Фридмана показали наличие достоверных различий между экспрессией TGF β 1 во всех трех группах ($p < 10^{-5}$, Рисунок 5).

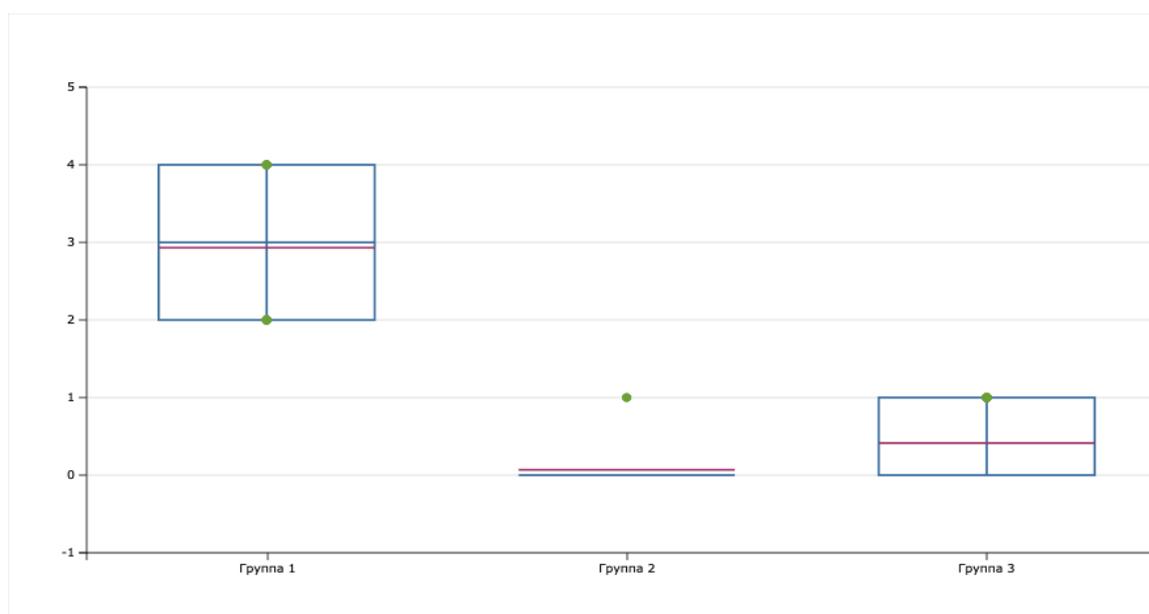


Рисунок 5 – Экспрессия TGF β 1 в образцах 1, 2, 3 групп, баллы, n=29, $p < 10^{-5}$

TGF β – семейство из 5 пептидных факторов, из которых в организме млекопитающих присутствуют TGF β 1–3; в свою очередь, из них TGF β 1 является превалирующим. Первично синтез TGF β 1 осуществляется преимущественно тромбоцитами, макрофагами и моноцитами, лимфоцитами, фибробластами, эпителиальными клетками и дендритными клетками кожи. Неактивная форма TGF β 1, связанная с белками LAP (латентно-ассоциированный белок) и LTBR (латентный белок, связывающий TGF), хранится в гранулах тромбоцитов или на поверхности клеток. В крови TGF β 1 встречается в неактивной форме с периодом полураспада 90 минут, в то время как период полураспада активной формы достигает всего нескольких минут. Таким образом, LAP и LTBR «маскируют» эпитопы TGF β 1, и его активная форма практически не обнаруживается в крови и тканях (независимо от метода детекции).

Высвобождение TGF β 1 из неактивного комплекса происходит во время его протеолиза под влиянием различных факторов, в частности пламина и тромбина, преимущественно при повреждении экстрацеллюлярного матрикса. [Khalil N., 1999; Kajdaniuk D., Marek B. et al. 2013]. В первые минуты после образования кожной раны наблюдается высвобождение TGF β 1 в ране из дегранулирующих тромбоцитов; кроме того, имеются данные о том, что большие запасы латентного TGF β 1 локализуются в перичеллюлярном матриксе и могут быть активированы протеолизом. Активированный TGF β 1 является хемоаттрактантом для нейтрофилов и макрофагов, обеспечивая их продвижение к повреждению, а также пролиферацию фибробластов; эти клетки, в свою очередь, также активизируют латентный TGF β 1, содержащийся в них самих и в кератиноцитах, при этом синтез латентного TGF β 1 продолжается и таким образом обеспечивает бесперебойное поступление этого белка в зону повреждения [Kim W. J., 2000; Werner S., Grose R., 2003; Diegelmann R. F., Evans M. C., 2004; Martin P., Leibovich S. J., 2005; Werner S., Krieg T. et al., 2007].

В нашей работе были исследованы не кожные раны, а область кровоподтеков, где высвобождение данного цитокина из тромбоцитов было не на первом плане, а латентный TGF β 1 активировался сразу в кератиноцитах (ранняя фаза реакции), по-видимому, вследствие действия медиаторов, поступающих из плазмы в зоне кровоизлияния и альтерации. Такими медиаторами могут являться сывороточные протеиназы, например, пламин, образующийся из пламиногена, который может катализировать высвобождение TGF β 1 из комплекса; в свою очередь активированный TGF β 1 вызывает активацию пламина, и таким образом процесс закольцовывается [Voas S. E. M., Carvalho J. et al., 2018]. В свою очередь, появление экспрессии TGF β 1 в дерме в наших экспериментах скорее всего обусловлено высвобождением его из тромбоцитов, находящихся в кровоизлиянии, и визуализируется по истечении некоторого времени от причинения повреждения, представляя собой позднюю фазу реакции. Таким образом, полученные нами статистически достоверные результаты исследования экспрессии TGF β 1 являются научно обоснованными комплексом накопленных в литературе сведений о локализации, роли и механизме действия TGF β 1 при патологических и травматических процессах (Рисунок 6).

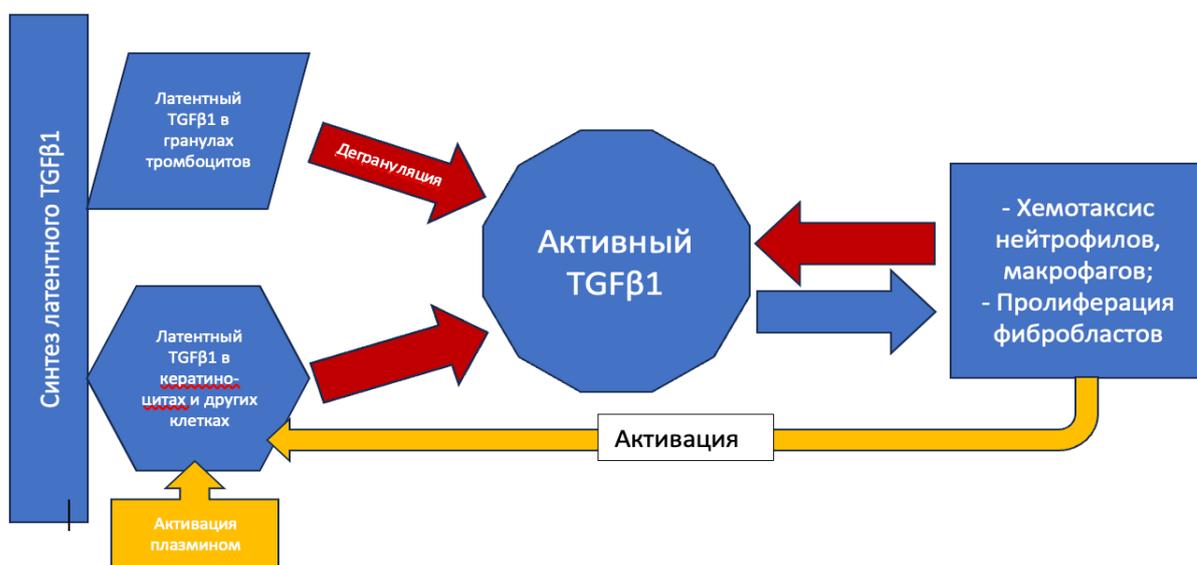


Рисунок 6 – Схема двойного пути активации TGFβ1

На основании приведенных выше результатов ИГХ исследования для практических целей нами была разработана методика ИГХ диагностики прижизненности повреждений кожи тупыми твердыми предметами. Исследование эпидермиса и дермы на всем протяжении микропрепаратов из области повреждений и контрольных образцов, окрашенных антителами к TGFβ1, проводят в светлом поле, при этом для оценки экспрессии используют полуколичественную шкалу (см. Таблицу 2). Заключение о прижизненности исследованного повреждения может быть сделано: в категорической форме, если в коже с повреждением отмечена положительная (1 балл и выше) экспрессия TGFβ1 при отсутствии (0) экспрессии в контрольном образце; в вероятностной форме, если в обоих образцах отмечена положительная (1 балл и выше) экспрессия TGFβ1, но в коже с повреждением отмечена более высокая экспрессия, чем в контрольном образце.

Предлагаемая методика может позволить достоверно диагностировать прижизненность механических повреждений кожи до развития стадии экссудации воспалительно-репаративного процесса.

Результаты, полученные при ИГХ исследовании экспериментального материала с использованием антител к Р-селектину (CD62p), оказались незакономерными и нестабильными. В большинстве образцов кожи как из области прижизненных, так и из области посмертных повреждений, а также в контрольных неповрежденных образцах была выявлена мембранная экспрессия CD62p в эндотелии мелких сосудов, не обнаружившая существенной разницы между группами материала. Полученные нами противоречивые результаты согласуются с приведенными в обзоре литературы данными ряда авторов о ненадежности Р-селектина в качестве маркера прижизненности повреждений. Возможно, они

объясняются переживаемостью структур кожи с учетом расположения эндотелиоцитов в непосредственном контакте с кровью, то есть с белками, находящимися в плазме. Данные белки, по-видимому, сохраняют свою активность после наступления смерти и проявляют ее при раннем посмертном причинении повреждения.

При применении ИГХ метода с антителами к аквапорину-3 (AQP3) в большинстве экспериментальных (группа 1) образцов кожи была выявлена мембранная экспрессия AQP3 в кератиноцитах, преимущественно – более слабая по сравнению с образцами с посмертно причиненными повреждениями (группа 3) и контрольным материалом интактной кожи (группа 2), в единичных случаях – аналогичная по выраженности.

Полученные нами результаты противоречат данным большинства зарубежных авторов, согласно которым экспрессия AQP3 в кератиноцитах усиливалась в области прижизненно причиненных повреждений: странгуляционных борозд, ожогов и повреждений твердыми тупыми предметами.

В то же время, поскольку мы, в целях ограничения давности повреждений, использовали материал от трупов с заведомо смертельной тяжелой сочетанной травмой, то наши результаты коррелируют с мнением J. Prangenberg и соавт., согласно которому, в случаях обширной сочетанной травмы наблюдается общая увеличенная выраженность экспрессии AQP3, не имеющая достоверных различий в поврежденной и макроскопически неповрежденной коже, что делает исследование экспрессии AQP3 недостоверным в случаях обширных травм [Prangenberg J., Doberentz, E. et al., 2021].

При проведении ИГХ исследования с антителами к HMGB1 в образцах кожи всех трех групп была выявлена яркая ядерная экспрессия HMGB1 в кератиноцитах, интенсивность которой мы приняли за максимум для оценки цитоплазматической экспрессии (3 балла).

Цитоплазматическую экспрессию наблюдали в 9 из 12 экспериментальных (группа 1) образцов, при этом в 1 случае она соответствовала ядерной экспрессии (3 балла), в 3 случаях была несколько слабее ядерной экспрессии (мы обозначили ее как умеренно выраженную, 2 балла), в 5 случаях – слабой, иногда проявлявшейся едва заметным коричневым оттенком хромогена DAB на фоне серо-голубоватого фона неокрашенной хромогеном ткани (1 балл).

В образцах с посмертно причиненными повреждениями (группа 3) слабая цитоплазматическая экспрессия (1 балл) была выявлена в 4 случаях из 12. В контрольных образцах неповрежденной кожи слабая цитоплазматическая экспрессия (1 балл) была выявлена в 3 случаях, умеренно выраженная (2 балла) – в 1 случае из 12 (Таблица 4).

HMGB1 - высокомолекулярный белок, в нормальных условиях локализующийся в ядре, где он взаимодействует с ДНК, способствуя её структурной организации [Scaffidi P., Misteli T. et al., 2002; Чихиржина, Е. В., Поляничко А. М. и др., 2020].

В экспериментальных работах судебно-медицинского направления была исследована возможность использования HMGB1 для оценки давности наступления смерти. Согласно полученным результатам, цитоплазматическая экспрессия посмертно высвобожденного из ядра HMGB1 имеет наиболее высокие

значения в интервале от 12 до 36 часов после наступления смерти; уровень HMGB1 в сыворотке крови возрастал на протяжении первых 2 суток после наступления смерти, далее его динамика была различной в зависимости от температурных условий, в которых находился труп; отмечены колебания локальной ИГХ экспрессии HMGB1 в различных структурах кожи на протяжении первых суток постмортального периода [Kikuchi K., Kawahara K. I. et al., 2010; Ahmed Alaa El-Din E., Mohamed Ahmed S., 2021; De-Giorgio F., Bergamin E. et al., 2024].

Таблица 4 – Результаты исследования цитоплазматической экспрессии HMGB1

Экспрессия	Прижизненные, группа 1, n=12	Контроль, группа 2, n=12	Посмертные, группа 3, n=12
Положит. 3 балла	1	0	0
Положит. 2 балла	3	1	0
Положит. 1 балл	5	3	4
Отрицат.	3	8	8

Тем не менее, несмотря на установленное влияние множества системных факторов на реакции HMGB1, в 2021 году S. Deacu и соавт. провели эксперимент, по результатам которого цитоплазматическая экспрессия HMGB1 в кератиноцитах отмечена в большей части прижизненно причиненных повреждений кожи и в меньшей части контрольных образцов, а также была более выраженной в прижизненных повреждениях [Deacu S., Neculai-Cândea L. et al., 2021]. Именно данная работа своими многообещающими итогами побудила нас к включению HMGB1 в собственный эксперимент ради создания метода определения прижизненности.

Полученные нами результаты оказались неоднозначными. С одной стороны, мы установили цитоплазматическую экспрессию HMGB1 в кератиноцитах в большей части образцов прижизненно поврежденной кожи – 9 из 12 – по сравнению с контрольными (посмертно поврежденными и интактными, по 4 из 12 в каждой группе) образцами, и выраженность экспрессии в них также была большей (Таблица 4); в этой части наши результаты коррелировали с теми, которые получили S. Deacu и соавт.

При этом, при индивидуальном сопоставлении результатов в образцах трех групп по каждому субъекту было установлено, что гипотетически ожидаемый и пригодный для практической трактовки результат (наличие цитоплазматической экспрессии в прижизненно поврежденной коже при отсутствии или более слабой экспрессии в неповрежденном и посмертно поврежденном образце) получен нами в 6 случаях из 12; таким образом, эффективность метода составила лишь 50%.

Поскольку причиной смерти всех субъектов, материал которых мы использовали, были насильственные факторы, а получение материала происходило в процессе повседневной деятельности судебно-медицинского морга, следует

полагать наиболее вероятным, что на полученные нами результаты повлияли изученные в литературе причины реакций HMGB1: системные «стрессовые» воздействия, связанные с танатогенезом, и колебания при неизбежном аутолизе.

На данном этапе мы не предлагаем каких-либо собственных утверждений относительно возможности применения ИГХ исследования HMGB1 для практических целей диагностики прижизненности повреждений. Результаты анализа литературных данных и результатов собственных экспериментов приводят нас к мысли о том, что исследования HMGB1 и иных представителей группы молекулярных паттернов DAMP могут быть перспективными для судебной медицины, однако нуждаются в глубокой теоретической проработке для детального выяснения механизмов активации указанных веществ.

Исследование дегрануляции дермальных тучных клеток показало, что в 6 случаях механической травмы клеток она колебалась в пределах 52–100% в образцах прижизненных повреждений и 45–82% – в контрольных образцах без повреждений. В микропрепаратах от трупа с последовательно причиненными посмертными повреждениями коэффициент дегрануляции тучных клеток снижался по мере удлинения постмортального интервала и составил 79%, 63%, 55%, 28%, 21% для повреждений, причиненных соответственно через 3ч, 6ч, 9ч, 12ч, 15ч после наступления смерти. В 2 из 3 случаев механической асфиксии (при повешении) установлена 100-процентная дегрануляция дермальных тучных клеток в образцах прижизненных странгуляционных борозд и контрольных неповрежденных образцах; в 1 случае дегрануляция в прижизненном образце составила 100%, в контрольном – 41%. Полученные результаты коррелируют с известными данными о том, что реакция тучных клеток на многие раздражители общего характера (гипоксия, кровопотеря, стрессовая ситуация) носит системный характер, вплоть до полилокальной 100%-ной дегрануляции [Арташян О. С., 2006], что подтверждает гипотезу о возможности иммунонезависимой активации тучных клеток посредством нервной регуляции [Benyon R. C., 1989].

Получив весьма разнонаправленное распределение значений коэффициента дегрануляции тучных клеток в прижизненно поврежденных и контрольных образцах кожи, мы можем утверждать, что метод оценки дегрануляции не должен применяться для диагностики прижизненности повреждений. Более того, нам удалось воспроизвести в эксперименте посмертную дегрануляцию тучных клеток вплоть до 15 часов после наступления смерти, что соответствует общеизвестным данным о переживаемости некоторых структур кожи и дополнительно свидетельствует о невозможности применения оценки дегрануляции в целях диагностики прижизненности механических повреждений.

При исследовании динамики плотности дермальных тучных клеток на 1-м этапе эксперимента при ручном подсчете у 29 трупов выявлено значительное колебание исходной плотности в препаратах неповрежденной кожи у различных субъектов (индивидуальные различия), значения плотности при этом составили от 3 до 11 клеток/мм². В материале с прижизненными и посмертно причиненными повреждениями плотность тучных клеток колебалась относительно контрольного значения в сторону как увеличения, так и уменьшения, и составила от 2 до 18

клеток/мм², не продемонстрировав на данном этапе каких-либо статистически значимых закономерностей.

При исследовании с помощью компьютерной обработки полноформатных сканов микропрепаратов на расширенном объеме материала были получены значения, принципиально отличающиеся от ранее обнаруженных. В контрольных образцах без повреждений (группа 2) были выявлены значительные колебания у разных субъектов (индивидуальные различия), как и ранее при ручном подсчете клеток; значения составили от 12,2 до 120,3 клеток/мм² (среднее 61,0, SD [стандартное отклонение] =33,1). В то же время, в образцах с прижизненными повреждениями (группа 1) значения составили от 37,1 до 178,1 клеток/мм² (среднее 78,7, SD=34,5), а в образцах с посмертно причиненными повреждениями (группа 3) – от 28,2 до 121,0 клеток/мм² (среднее 51,2, SD=21,7). При статистической обработке полученных результатов с применением непараметрического критерия Фридмана установлено, что различия между группами 1 и 2, 1 и 3, 2 и 3 достоверны ($p < 10^{-5}$, Рисунок 7).

Полученные нами результаты, таким образом свидетельствующие о том, что плотность расположения дермальных тучных клеток в прижизненно поврежденной коже выше по сравнению как с неповрежденной кожей, так и с посмертно поврежденной, коррелируют с выводами А. Bonelli и соавт. [Bonelli A., Vacci S. et al., 2003]; однако, хотя обнаруженные нами закономерности аналогичны, порядок значений плотности дермальных тучных клеток в нашем исследовании и в работе А. Bonelli и соавт. существенно отличается: в наших подсчетах плотность колебалась в диапазоне от 12 до 178 клеток/мм², в то время как А. Bonelli и соавт. сообщали о средних значениях 4-11 клеток/мм². В то же время, полученные нами значения плотности дермальных тучных клеток по масштабу близки к приведенным в исследованиях иных авторов [Janssens A.S., Heide R. et al., 2005; Петров В. В., Васильева О.В. и др., 2013].

В результате следующего этапа анализа – сопоставления полученных результатов индивидуально по каждому субъекту – было установлено, что плотность тучных клеток в образцах с прижизненными повреждениями выше, чем в контрольных, в 32 случаях (80%). В образцах с посмертно причиненными повреждениями плотность тучных клеток оказалась выше, чем в контрольных, в 20 случаях (50%), однако на меньшую величину, чем с прижизненными, что, возможно, могло быть обусловлено индивидуальной неравномерностью распределения тучных клеток в местах получения образцов, а также упомянутым выше феноменом переживаемости тканей.

По каждому из 40 случаев мы исследовали величину превышения (положительной разницы) значений плотности тучных клеток в прижизненных и посмертно причиненных повреждениях относительно неповрежденной кожи (далее – прирост плотности), которая, являясь производной от непосредственных экспериментальных данных, имела меньший разброс и показывала более отчетливые различия распределения в группах прижизненных и посмертно причиненных повреждений (рисунок 8).

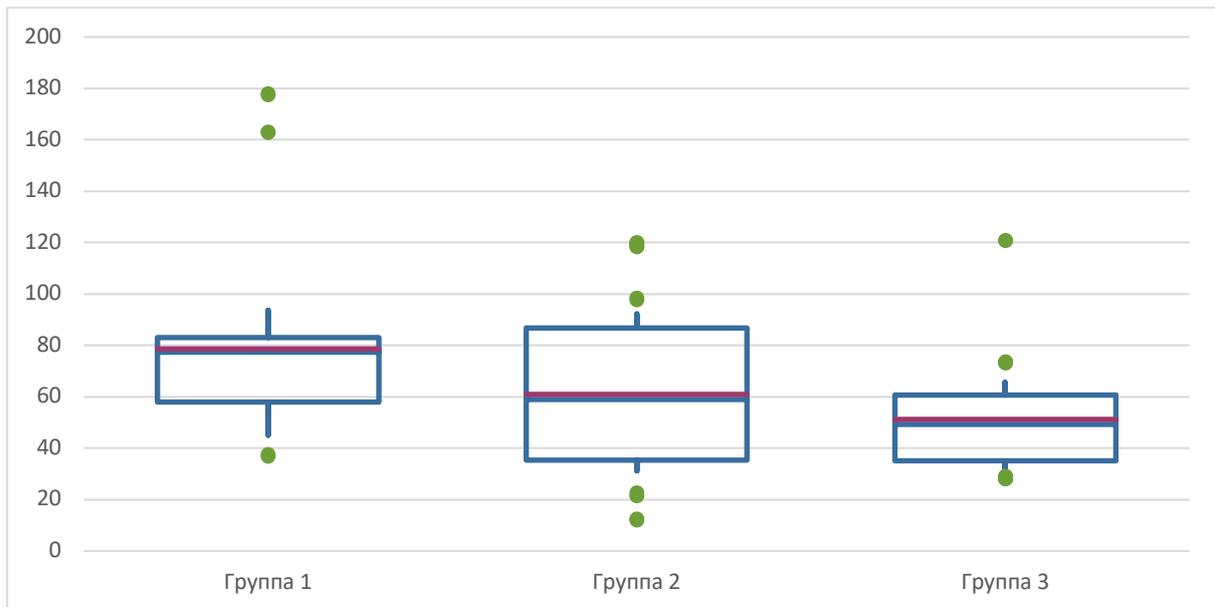


Рисунок 7 – Плотность дермальных тучных клеток в образцах 1, 2, 3 групп, клеток/мм², n=40, p<10⁻⁵

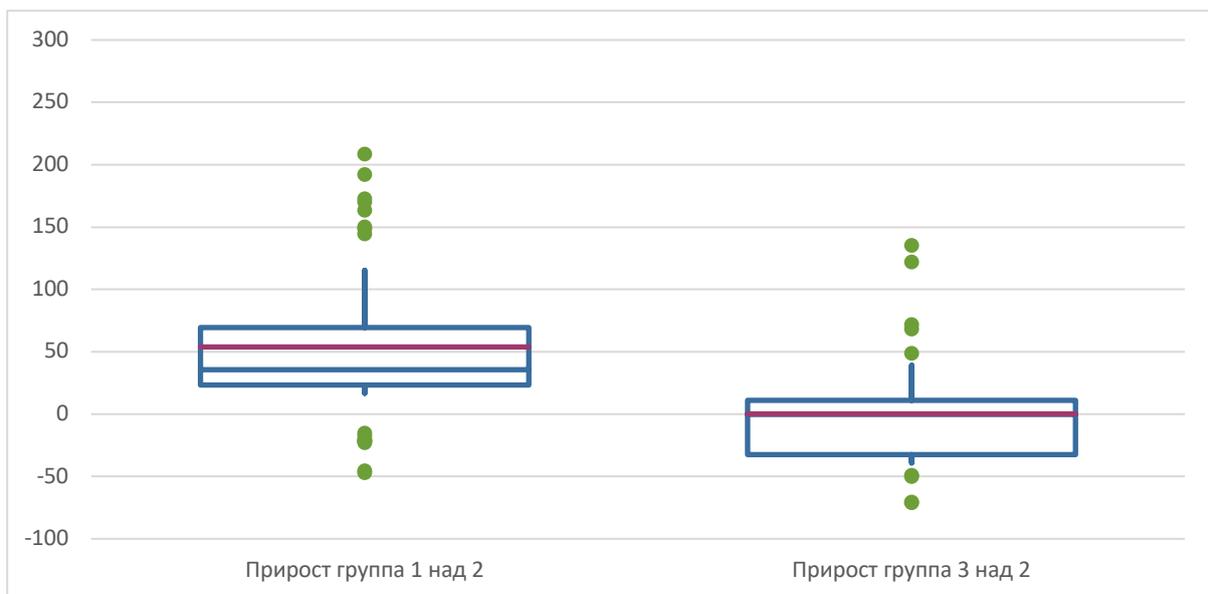


Рисунок 8 – Прирост плотности тучных клеток в образцах 1 и 3 групп над 2 группой, %, n=40, p<10⁻⁵

Далее мы предприняли попытку выяснить, изменяется ли соотношение прижизненных и посмертно причиненных повреждений (в пользу первых) по мере возрастания порога «отсечки» минимального прироста плотности. Таким образом мы устанавливали вероятность правильного обнаружения прижизненного повреждения, рассчитанную как доля прижизненно поврежденных экспериментальных образцов с данной или большей величиной прироста от общего количества прижизненно и посмертно поврежденных экспериментальных образцов с такой же величиной прироста.

Согласно полученным нами данным, прирост плотности до 10% наблюдался в повреждениях, среди которых 69% были прижизненными и 31% – посмертными, то есть вероятность правильной диагностики прижизненного повреждения при приросте до 10% составила всего лишь ~2 к 1. В свою очередь, прирост плотности от 10% до 140% наблюдался в повреждениях, среди которых 76–83% были прижизненными и соответствующая доля – посмертными, доля прижизненных повреждений по мере увеличения прироста не возрастала; таким образом, вероятность правильной диагностики прижизненного повреждения при приросте плотности 10–140% составила ~3 к 1. Лишь повышение порога прироста до 140% отсекло все посмертные повреждения, и вероятность правильной диагностики прижизненного повреждения стала 100%-ной, однако такой прирост отмечался лишь в 1/5 части исследуемых случаев.

Таким образом, мы полагаем, что нам удалось подтвердить факт повышения плотности дермальных тучных клеток в области прижизненных повреждений; однако, наблюдение указанного явления также в посмертных повреждениях (хотя и в меньшей степени) становится существенным, возможно, непреодолимым препятствием на пути разработки соответствующего практического метода.

ВЫВОДЫ

1. В результате анализа специальной литературы, посвященной ИГХ диагностике прижизненности повреждений мягких тканей, выявлено, что до сих пор не найдены надежные маркеры ранних прижизненных реакций, а основной проблемой является феномен переживаемости тканей, который осложняет интерпретацию результатов ИГХ исследований; по имеющимся данным, маркеры TGF β 1, CD62p, AQP3 и HMGB1 реагируют в области повреждений в течение первых 30 минут от их причинения, поэтому являются перспективными в плане диагностики прижизненности; кроме этих маркеров, для данной цели актуально проведение морфометрического исследования дегрануляции и колебаний плотности дермальных тучных клеток.

2. Согласно результатам экспериментальных исследований, была выявлена отчетливая экспрессия TGF β 1 в структурах кожи с прижизненными повреждениями по сравнению с контрольными образцами неповрежденной и посмертно поврежденной кожи, различия были статистически достоверными; определено, что в области повреждения белок TGF β 1 появляется не только вследствие его высвобождения из тромбоцитов, но и путем активации латентного TGF β 1 в кератиноцитах с помощью плазменных медиаторов.

3. В образцах с прижизненными повреждениями и контрольных образцах не было выявлено достоверных различий в экспрессии P-селектина (CD62p) и аквапорина-3 (AQP3); различия в выраженности цитоплазматической экспрессии HMGB1 не имели убедительного характера. Коэффициент дегрануляции дермальных тучных клеток в прижизненно поврежденной коже был сопоставим с таковым в контрольных образцах. Статистически достоверное повышение плотности дермальных тучных клеток в образцах кожи с прижизненными повреждениями по сравнению с образцами кожи с посмертными повреждениями не является настолько значительным, чтобы иметь возможность использовать его

в основе метода диагностики прижизненности повреждений. На основании данных результатов разработана соответствующая методика ИГХ диагностики прижизненности повреждений тупыми твердыми предметами признана нецелесообразной.

4. На основании результатов собственных экспериментальных исследований дана характеристика всем намеченным иммуногистохимическим маркерам со временем проявления в первые минуты после причинения повреждения, известным из литературы; сформирована система оценки экспрессии и разработан практический метод ИГХ диагностики прижизненности механических повреждений кожи ранней (до 30–40 минут) давности с помощью антител к TGFβ1 с использованием для оценки экспрессии полуколичественной шкалы.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Метод ИГХ диагностики прижизненности механических повреждений кожи с использованием антител к TGFβ1, разработанный нами на основе проведенных экспериментов, опубликован в соответствующих методических рекомендациях.

Показанием к применению метода является проведение судебно-гистологической экспертизы (исследования) образцов кожи с повреждениями тупыми твердыми предметами (кровоподтеки) малой давности (до развития воспалительно-репаративных реакций).

Абсолютными противопоказаниями к применению метода являются аутолитические, гнилостные, термические и иные искажающие гистологическую структуру изменения кожи, а также отсутствие возможности получения контрольных образцов и соблюдения сроков фиксации материала для проведения ИГХ исследования (не более 48 часов после изъятия).

Относительным противопоказанием является обнаружение воспалительной перифокальной реакции (начиная со стадии краевого стояния лейкоцитов и лейкодиapedеза), когда подтверждение прижизненности повреждений ИГХ методами не требуется. Также не требуется ИГХ подтверждение прижизненности в случаях смерти от повреждений в условиях очевидности.

Материал кожи с повреждением и контрольный образец кожи из симметричной (или близкой к таковой) области изымают и фиксируют по общепринятой методике, с соблюдением требований к размерам кусочков при фиксации и вырезке.

Проводят общепринятую гистологическую обработку материала с окраской гематоксилином и эозином; исследуют полученные микропрепараты, устанавливают показания и противопоказания к применению метода.

Проводят окрашивание микропрепаратов ИГХ методом с моноклональными антителами к TGFβ1, используя в качестве внешнего положительного контроля окраски образцы инвазивной протоковой карциномы молочной железы.

Исследуют полученные микропрепараты; оценку экспрессии TGFβ1 в эпидермисе и дерме в образцах прижизненно поврежденной и интактной (контроль) кожи проводят с использованием разработанной нами полуколичественной системы. В каждом микропрепарате предварительно исследуют образец внешнего положительного контроля окраски.

Заключение о прижизненности исследованного повреждения может быть сделано:

- в категорической форме, если в коже с повреждением отмечена положительная (1 балл и выше) экспрессия TGF β 1 при отсутствии (0) экспрессии в контрольном образце;

- в вероятностной форме, если в обоих образцах отмечена положительная (1 балл и выше) экспрессия TGF β 1, но в коже с повреждением отмечена более высокая экспрессия, чем в контрольном образце.

В случае наличия дермальной экспрессии при отсутствии положительной окраски эпидермиса результат полагают не подлежащим учету.

В случае, когда экспрессия TGF β 1 в контрольном неповрежденном образце кожи равна или выше, чем в коже из области повреждения, дать заключение о прижизненности повреждения по результатам ИГХ исследования не представляется возможным.

Сомнительные или недостоверные результаты ИГХ исследований возможны при длительном хранении гистологического материала (фиксированный архив кусочков, парафиновые блоки); для предупреждения этого необходимо начинать гистологическое исследование со срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, и по степени выраженности аутолитических изменений определить пригодность материала для постановки ИГХ реакций.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

В дальнейшем научном поиске методов диагностики прижизненности механических повреждений, придерживаясь пути «каскада» патофизиологических реакций, приводящих к активации TGF β 1 и проявлению его экспрессии в кератиноцитах поврежденной кожи, мы видим возможные перспективы исследования в изучении возможности ИГХ и других методов детекции медиаторов, вызывающих активацию TGF β 1 (плазмينا и др.), а также разработки основанных на этом диагностических методов. Также перспективным может оказаться теоретический и экспериментальный поиск иных ИГХ маркеров прижизненности, в том числе среди паттернов DAMP («сигналов опасности»).

Помимо этого, развивающиеся в настоящее время технологии мультиплексной визуализации иммуногистохимического исследования и картирования ландшафта тканевого микроокружения могли бы позволить выявить пространственные закономерности организации клеток и внеклеточного матрикса, а также изучить особенности морфо- и иммуногенеза в зоне интереса.

Следует отметить, что в экспериментальных исследованиях, посвященных гистологической и иммуногистохимической диагностике прижизненности механических повреждений, необходимо использовать в качестве контроля материал с посмертными повреждениями, причиненными тому же субъекту, от которого получены образцы с прижизненными повреждениями. Такой забор материала предоставит расширенные возможности для анализа экспериментальных результатов путем не только обобщенного, но и индивидуального сравнения в различных группах повреждений и контроле.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Федулова, М. В. Достоверность иммуногистохимической оценки прижизненности и давности повреждений: анализ и перспективы исследований / М. В. Федулова, **Д. Д. Куприянов** // Судебно-медицинская экспертиза. — 2020. — Т. 63, № 2. — С. 52–57.
2. Федулова, М. В. Результаты экспериментального применения антител к TGFβ1 для иммуногистохимической оценки прижизненности повреждений / М. В. Федулова, **Д. Д. Куприянов** // Судебно-медицинская экспертиза. — 2023. — Т. 66, № 5. — С. 43–46.
3. **Куприянов, Д. Д.** Выявление некоторых маркеров ранней фазы воспалительно-репаративного процесса при механических повреждениях кожи / Д. Д. Куприянов, М. В. Федулова // Судебно-медицинская экспертиза. — 2024. — Т. 67, № 2. — С. 17–19.
4. **Куприянов, Д. Д.** Исследование плотности дермальных тучных клеток в аспекте диагностики прижизненности механических повреждений кожи. / Д. Д. Куприянов, М. В. Федулова // Судебно-медицинская экспертиза. — 2024. — Т. 67, № 6. — С. 25–29.
5. Федулова, М. В. Аспекты определения прижизненности повреждений мягких тканей иммуногистохимическим методом / М. В. Федулова, **Д. Д. Куприянов** // Актуальные вопросы судебной медицины и права : сборник научно-практических статей, посвященный 70-летию организации Республиканского бюро судебно-медицинской экспертизы МЗ РТ. Том Выпуск 11. – Казань : Государственное автономное учреждение здравоохранения "Республиканское бюро судебно-медицинской экспертизы министерства здравоохранения Республики Татарстан", 2020. – С. 108–113.
6. Федулова, М. В. Перспективы иммуногистохимического метода диагностики прижизненности повреждений мягких тканей / М. В. Федулова, **Д. Д. Куприянов** // Вехи истории Российского центра судебно-медицинской экспертизы. К 90-летию со дня образования : Труды Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Москва, 21–22 октября 2021 года / Под общей редакцией И.Ю. Макарова. Том 1. – Москва: ООО фирма "Юлис", 2021. – С. 507–515.
7. Федулова, М. В. Дегрануляция дермальных тучных клеток в аспекте морфологической диагностики прижизненности повреждений / М. В. Федулова, **Д. Д. Куприянов** // Судебная медицина: вопросы, проблемы, экспертная практика : Материалы научно-практической конференции, посвященной 30-летию Межрегиональной общественной организации "Судебные медики Сибири", Петропавловск-Камчатский, 07–08 сентября 2023 года. Том Выпуск 9. — Томск: Общество с ограниченной ответственностью "СТТ", 2023. — С. 113–118.
8. **Куприянов, Д. Д.** Эффективность некоторых иммуногистохимических методов диагностики прижизненности повреждений мягких тканей в эксперименте / Д. Д. Куприянов, М. В. Федулова // Судебно-медицинская наука и экспертная практика: задачи, пути совершенствования на современном этапе : Труды IX Всероссийского съезда судебных медиков с международным участием, Москва, 22–24 ноября 2023 года. – Череповец: ИП Мочалов С.В., 2023. – С. 335–340.

9. Федулова М. В. Выявление некоторых маркеров ранней фазы воспалительно-репаративного процесса в механических повреждениях кожи / М. В. Федулова, Д. Д. Куприянов // ЗОНТ: здоровье, образование, наука, технологии. Всероссийский междисциплинарный конгресс по непрерывному профессиональному медицинскому образованию работников здравоохранения (Москва. Красногорск. 12–15 декабря 2023): сборник материалов конференции / ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России. — Москва: РМАНПО, 2023.— 173 с.

10. Федулова, М. В. Применение антител к TGF β 1 для иммуногистохимического установления прижизненности повреждений кожи тупыми твердыми предметами : Методические рекомендации / М. В. Федулова, Д. Д. Куприянов. — Москва : «РЦСМЭ» Минздрава России, 2024. — 16 с.

11. Федулова, М. В. Состояние и перспективы судебно-гистологической диагностики прижизненности и ранней давности повреждений мягких тканей / М. В. Федулова, Д. Д. Куприянов // Современные проблемы судебно-медицинской гистологии. Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. 25–26 сентября 2024 года, Санкт-Петербург.