

© ДЕНИСЕНКО А.Г., ЯБЛОНСКИЙ М.Ф., 2013

ЗНАЧЕНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ КРИТЕРИЕВ ДАВНОСТИ НАСТУПЛЕНИЯ СМЕРТИ

ДЕНИСЕНКО А.Г., ЯБЛОНСКИЙ М.Ф.

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»,
кафедра судебной медицины

Резюме. С целью установления давности наступления смерти (ДНС) разработаны способы определения в динамике изменений метаболической активности нейтрофилов (спонтанный и индуцированный НСТ-тест), Т- и В-лимфоцитов, экспрессирующих молекулы CD3, CD4, CD8, CD22, CD25 эритроцитарных диагностикумов. Выявлены изменения НСТ-теста и количества Т- и В-лимфоцитов, экспрессирующих молекулы-маркеры CD3, CD4, CD8, CD22, CD25. У лиц, умерших от ишемической болезни сердца (ИБС), отравления этиловым алкоголем и прочих причин смерти, отмечено достоверное снижение показателей функциональной активности нейтрофилов к концу 2-х суток с момента наступления смерти. Установлено, что в посмертном периоде у лиц, умерших от механических травм и асфиксий в результате повешения, происходит изменение количества Т- и В-лимфоцитов, экспрессирующих молекулы CD3, CD4, CD8, CD22, CD25 с подавлением их активности до 65-78 часов после смерти.

Ключевые слова: давность наступления смерти, НСТ-тест, Т- и В-лимфоциты, экспрессия молекул CD3, CD4, CD8, CD22, CD25.

Abstract. To establish the remoteness of death (RD) methods of assessment of the dynamic changes of neutrophil metabolic activity (the spontaneous and induced NBT-test), T- and B-lymphocytes expressing CD3, CD4, CD8, CD22, CD25 molecules of erythrocytic diagnosticum sets were worked out. The changes of NBT-test and the amount of T- and B-lymphocytes expressing molecules-markers CD3, CD4, CD8, CD25, CD22 were found out. In persons who died of ischemic heart disease (IHD), poisoning with ethyl alcohol and other causes of death statistically significant decrease in neutrophil functional activity indices was determined by the end of 2 days from the moment of death. It was established that in the postmortem period in persons, who died of mechanical traumas and asphyxias as a result of hanging the quantity of T- and B-lymphocytes expressing CD3, CD4, CD8, CD22, CD25 molecules changed with the suppression of their activity up to 65-78 hours after death.

Key words: remoteness of death, NBT-test, T- and B-lymphocytes, expression of CD3, CD4, CD8, CD22, CD25 molecules.

Проблема диагностики давности наступления смерти (ДНС) разрабатывается на протяжении полутора столетий многими учёными мира. Одним из основных направлений в разработке

данной проблемы являются исследования посмертных явлений, протекающих в органах, тканях и жидкостях [1].

Полученные результаты указывали на необходимость более углубленного изучения этого объекта, в том числе на основе иммунологических методов исследования. Применялись иммунологические тесты, основанные на оценке свойств сохранения жизнеспособности лимфоцитов, участвующих в иммунном реагировании орга-

Адрес для корреспонденции: 210023, г. Витебск, пр-т Фрунзе, 27, УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», кафедра судебной медицины. Тел. моб.: +375 (29) 710-20-18 – Денисенко Александр Григорьевич.

низма на раздражитель – травму, болезнь, и использовании информации о времени воздействия раздражителя на организм. Исследователями установлено, что нейтрофилы достаточно быстро разрушаются в крови в посмертном периоде и при хранении крови в пробирках, в то время как лимфоциты крови сохраняются значительно более длительный срок [2].

В последние годы с целью решения вопроса о ДНС судебно-медицинская наука и практика пошла путём поиска новых направлений, связанных с использованием более объективных лабораторных методов исследований. Установлена возможность применения реакции бласттрансформации, розеткообразования Т- и В-лимфоцитов и количественного содержания иммуноглобулинов для определения ДНС, а также сроков пригодности трупной крови для диагностики ДНС при хранении её в различных условиях [3].

Сафиним Р.Я. [4] изучен количественный состав лейкоцитов, процент живых лейкоцитов, функциональная активность нейтрофилов в крови умерших лабораторных крыс в различные промежутки времени после наступления смерти. Автор нашёл, что с увеличением времени, прошедшего с момента наступления смерти, отмечается постепенное снижение общего числа лейкоцитов крови, изменение функциональной активности нейтрофильных лейкоцитов вплоть до полного их исчезновения в трупной крови к 72-м часам посмертного интервала времени. Однако автором не предложено обоснованных методов определения ДНС на основании динамики иммунологических параметров.

Следует отметить, что в литературе отсутствуют сведения о взаимосвязи ДНС, показателей клеточного и гуморального иммунитета и уровня НСТ-теста.

Целью данного исследования явилось изучение уровня спонтанного и индуцированного НСТ-теста и количества Т- и В- лимфоцитов, экспрессирующих молекулы – маркеры CD3, CD4, CD8, CD25, CD22 в зависимости от ДНС.

Методы

Для определения метаболической активности нейтрофилов методом НСТ кровь обрабатывали по методике В.Н. Park et al. [5] в модификации М.Г. Шубича [6]. Выделены 2 группы клеток: 1-ая группа – нейтрофилы, не имеющие гранул формазана, 2-ая группа – с наличием в клетках гранул, занимающих различную площадь нейтрофила. Подсчитывали количество клеток, принадлежащих к каждой из двух групп на 200 сегментоядерных нейтрофилов. Спонтанную активность НСТ-теста выражали в процентах [6].

Изменение экспрессии CD22 В-лимфоцитами, CD3, CD4, CD8, CD25 Т-лимфоцитами определяли методом розеткообразования с помощью соответствующих эритроцитарных диагностикумов. Подсчитывали процент розеткообразующих лимфоцитов при обычной световой микроскопии, явно имевших не менее 3-х прикрепившихся эритроцитов к диагностикумам с анти-CD моноклональными антителами [7].

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Primer of Biostatistics. Так как распределение изучаемых величин отличалось от нормального, для описательного статистического анализа применяли показатель медианы, 25 и 75 процентиля. При сравнении достоверности различий между группами был использован U-критерий Манна-Уитни [8]. Статистически достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В настоящий момент вопрос о влиянии вида смерти на функциональную и метаболическую активность лейкоцитов для установления ДНС остается неизученным. В связи с этим нами апробированы методы исследования по определению в динамике функциональной и метаболической активности лейкоцитов 28 трупов людей, умерших от ИБС, отравления этиловым алкоголем (ОЭА), прочих причин

смерти (ППС) (механических асфиксий в результате повешения, геморрагического инсульта, множественных травм), а также у здоровых лиц (доноров).

В ходе проведенных исследований выявлено, что после наступления смерти человека происходит постепенное уменьшение процентного содержания нейтрофильных лейкоцитов трупной крови. Снижение процентного содержания показателей наблюдалось до интервала времени 27-31 час. Показатели функциональной активности лейкоцитов трупной крови, полученные при спонтанном и индуцированном НСТ-тесте в первые 2-6 часов после смерти, сравнивались с контрольной группой доноров. Показатели в остальных интервалах времени сравнивали с предыдущим интервалом (табл. 1).

Исследования показали, что в крови доноров процент содержания нейтрофильных лейкоцитов при проведении спонтанного НСТ-теста составил 8,9% [7,9;9,5], индуцированного – 54,2% [52,7;55,2].

Полученные данные выделены в три подгруппы в зависимости от причины смерти.

В группах умерших от ИБС (n=13) и отравления этиловым алкоголем (n=9) отмечено достоверное снижение показателей ($p<0,001$) спонтанного НСТ-теста на протяжении от 12-16 часов до 22-26 часов, а так же при ОЭА через 2-6 часов после наступления смерти (табл. 1). В остальных интервалах времени показатели активности нейтрофильных лейкоцитов были достоверно ниже. При ИБС данные показатели распределились следующим образом: через 7-11 часов – 7,1% [4,1;7,8]; 32-41 час – 0,9% [0,5;1,8] ($p<0,01$) и спустя 27-31 час после смерти – 1,8% [1,3;2,7] ($p<0,05$), а в интервалах времени от 12-16 часов до 22-26 часов – 4,2% [3,3;6,7]; 3,4% [3,1;3,7] и 2,4% [2,2;2,7] ($p<0,001$) соответственно. В группе умерших от отравления этиловым алкоголем НСТ снижался в следующих интервалах времени: через 7-11 часов – 4,1% [3,8;4,2] ($p<0,05$), от 12-16 часов – до 22-26

Таблица 1

**Процент НСТ-положительных лейкоцитов трупной крови
в зависимости от причины и давности наступления смерти**

Время после смерти	НСТ-спонтанный			НСТ-индуцированный		
	Ишемическая болезнь сердца, n=13	Прочие причины смерти, n=6	Отравления этиловым алкоголем, n=9	Ишемическая болезнь сердца, n=13	Прочие причины смерти, n=6	Отравления этиловым алкоголем, n=9
2-6	7,9(7,1-8,7)	8,3(4,4-8,5)	4,5(3,9-4,7)***	47(41-55)***	52(45-59)	41(36-44)***
7-11	7,1(4,1-7,8)**	7,6(4,3-8,0)	4,1(3,8-4,2)*	42(37-48)**	38(34-43)*	36,5(33-38)**
12-16	4,2(3,3-6,7)***	3,0(2,7-4,2)*	3,3(3,1-3,6)***	36(29-50)**	31(24-35)**	31(28-33)***
17-21	3,4(3,1-3,7)***	2,5(2,0-3,6)	2,5(2,2-2,8)***	31(22-47)*	26(20-33)	27(22-28)***
22-26	2,4(2,0-2,7)***	2,0(1,1-2,5)**	1,7(1,4-1,9)***	28 (24-31)**	23(14-29)	22(21-25)***
27-31	1,8(1,3-2,7)*	1,4(0,3-2,1)	1,4(1,2-1,8)**	23(18-27)***	22,5(20-24)	21(17-23)
32-41	0,9(0,5-1,8)**	1,0(0,3-2,0)	0,5(0,3-0,6)**	4(2-11)***	9(7-16)***	1,2(0,6-1,8)**
КГ (n=15)	8,9%(7,9-9,5)			54,2%(52,7-55,2)		

Примечание: * - $p<0,05$, ** - $p<0,01$, *** - $p<0,001$, отсутствие звездочки $p>0,05$ -различия не достоверно; КГ – контрольная группа.

часов – 3,3% [3,1;3,6]; 2,5% [2,2;2,8]; 1,7% [1,4;1,9] ($p<0,001$) и от 27-31 часа до 32-41 часа после смерти – 1,4% [1,2;1,8]; 0,5% [0,3;0,6] ($p<0,01$) соответственно.

При сравнении между собой двух групп умерших от ИБС и ОЭА отмечено, что показатели спонтанного НСТ-теста у лиц, умерших от ИБС, были достоверно ниже в интервалах времени от 2-6 часов до 27-31 часа. Достоверность различий между группами составила $3,78\pm 2,0\%$. Из полученных данных видно, что наличие алкогольной интоксикации в крови трупов подавляет активность нейтрофильных лейкоцитов при спонтанном НСТ-тесте в указанных промежутках времени.

Для определения функциональной активности Т- и В-лимфоцитов исследовалась в динамике кровь умерших ($n=10$) от прочих причин: механических травм (черепно-мозговых травм, падениях с высоты) и механических асфиксий в результате повешения. Интервал времени с 7 до 16 часов сравнивали с контрольной группой доноров, а остальные показатели Т-лимфоцитов сравнивали с результатами предыдущих интервалов ДНС.

Достоверное снижение показателей лимфоцитов ($p<0,001$), экспрессирующих молекулу CD3, отмечалось после смерти в интервалах времени от 7-16 часов 52% до 51-64 часа 29% [48,55; 43,50; 35,43; 31,39; 24,33]. Менее достоверное снижение показателя ($p<0,05$) получено в промежутке времени от 65 до 78 часов 23% [21;28] (табл. 2).

Количество CD4 (Т-хелперов) также достоверно снижалось в интервалах времени: 17-26 часов 30,5% [25;35] ($p<0,001$), 27-36 часов 28% [22;30] ($p<0,05$), 37-50 часов 23,5% [20;27] ($p<0,01$), 51-64 часов 18% [17;20] ($p<0,001$) и через 65-78 часов после наступления смерти 14% [12;16] ($p<0,001$).

Статистически значимое снижение CD8 (маркера цитотоксических лимфоцитов) определялось в интервалах времени от 7-16 часов 18% до 27-36 часов 12%, через 51-64 часов 7,5% [17,19;12,17;11,14;5,9] ($p<0,001$), через 37-50 часов 11% и 65-78 часов 4,5% [8,12;2,5] ($p<0,01$) после наступления смерти.

Снижение экспрессии рецептора на Т-лимфоцитах к ИЛ-2 (CD25) отмечалось в интервалах времени: от 7-16 часов 15,5% до 17-26 часов 13%, через 51-64 часов 5%

Таблица 2

Показатели Т- и В-лимфоцитов, экспрессирующих молекулы CD3, CD4, CD8, CD25, CD22 (в %) у лиц ($n=10$), умерших от прочих причин смерти (механических травм и асфиксий в результате повешения)

Показатель	КГ ($n=15$)	Время наступления смерти, часы					
		7-16	17-26	27-36	37-50	51-64	65-78
CD3	58,1(55,0-59,1)	52,0(48,0-55,0)***	46,0(43,0-50,0)***	42,0(35,0-43,0)***	36,0(31,0-39,0)***	29,0(24,0-33,0)***	23,0(21,0-28,0)*
CD4	42(40,3-53,5)	36,0(31,0-38,0)***	30,5(25,0-35,0)***	28,0(22,0-30,0)*	24,0(20,0-27,0)**	18,0(17,0-20,0)***	14,0(12,0-16,0)***
CD8	22,6(21,5-24,0)	18,0(17,0-19)***	15(12,0-17,0)***	12,0(11,0-14,0)***	11,0(8,0-12,0)**	7,5(5,0-9,0)***	4,0(2,0-5,0)**
CD25	17(15,9-18,1)	15,5(13,0-17,0)***	13,0(10,0-14,0)***	10,0(9,0-12,0)**	8,0(6,0-11,0)**	5,0(3,0-7,0)***	3,0(2,0-5,0)*
CD22	19,4(18,3-20,3)	15,0(13,0-16,0)***	12,0 (10,0-14,0)**	10,0 (8,0-12,0)***	8,0(6,0-9,0)**	4,5(4,0-5,0)***	2,5 (2,0-3,0)***

Примечание: * - $p<0,05$, ** - $p<0,01$, *** - $p<0,001$; КГ – контрольная группа.

[13,17;10,14;3,7] ($p<0,001$), спустя 27-36 часов 10%, 37-50 часов 8% [9,12;6,11] ($p<0,01$), и через 65-78 часов после наступления смерти 3% [2;5] ($p<0,05$).

Снижение экспрессии рецептора CD22 на В-лимфоцитах отмечалось в интервалах времени: 7-16 часов 15% [13;16], 27-36 часов 10% [8;12], 51-64 часа 4,5% [4;5], 65-78 часов 2,5% [2;3] ($p<0,001$), 17-26 часов 12% [10;14], и спустя 37-50 часов после наступления смерти 8% [6;9] ($p<0,01$).

Заключение

Характеристика показателей системы иммунитета позволяет оценить ДНС. В течение первых 6-ти часов после смерти от ишемической болезни сердца, отравления этиловым алкоголем и прочих причин смерти отмечается повышение уровня внутриклеточного кислородзависимого метаболизма. Полная утрата функциональной активности нейтрофилов происходила к окончанию вторых суток с момента наступления смерти.

2. В группе умерших от прочих причин смерти количество Т- и В-лимфоцитов, экспрессирующих молекулы CD3, CD4, CD8, CD22, CD25, достоверно снижается во всех интервалах времени (до 65-78 часов).

3. Определение CD-рецепторов на лимфоцитах при помощи стандартного эритроцитарного диагностикума с моноклональными антителами позволяет определять ДНС по содержанию соответствующих клеток в стандартных условиях. Методики по определению CD-антигенов,

функциональной активности лейкоцитов (спонтанный и индуцированный НСТ-тест) могут быть использованы в лаборатории судебно-медицинской экспертизы.

Литература

1. Мельников, Ю.Л. Судебно-медицинское определение времени наступления смерти / Ю.Л. Мельников, В.В. Жаров. – М.: Медицина. – 1978. – 168 с.
2. Казарновская, М.Л. Репродукция лимфоцитов трупной крови. Судебно-медицинские и биологические аспекты / М.Л. Казарновская. – Кишинев: Штиинца, 1983. – 104 с.
3. Костылев, В.И. Зависимость иммунных показателей крови умерших от заболеваний в динамике раннего посмертного периода / В.И. Костылев // *Вопр. теории и практики суд.-мед. экспертизы.* – 1999. – С. 76–77.
4. Сафин, Р.Я. Применение иммунологических методов исследования трупной крови для определения давности наступления смерти / Р.Я. Сафин // *Естествознание и гуманизм: сб. науч. тр. / под ред. Н.Н. Ильинских.* – Томск, 2006. – Т. 3, № 2. – С. 94–95.
5. Park, B.H. Infection and nitroblue-tetrazolium reduction by neutrophils / B.H. Park, S.M. Fikrig, E.M. Smithwick // *A diagnostic acid.* – *Lancet* 2. – 1968. – P. 532–534.
6. Шубич, М.Г. НСТ-тест у детей в норме и при гнойно-бактериальных инфекциях / М.Г. Шубич // *Лаб. дело.* – 1978. – № 9. – С. 515–518.
7. Новиков, Д.К. Методы определения Т- и В-лимфоцитов диагностикумами на основании моноклональных антител / Д.К. Новиков, П.Д. Новиков, В.Я. Янченко // *Иммунология, аллергология, инфектология.* – 2000. – № 2. – С. 31–33.
8. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М.: Медиа Сфера. – 2006. – 312 с.

Поступила 24.06.2013 г.

Принята в печать 05.09.2013 г.

Сведения об авторах:

Денисенко А.Г. – к.м.н., ассистент кафедры судебной медицины УО «ВГМУ»;

Яблонский М.Ф. – д.м.н., профессор, зав. кафедрой судебной медицины УО «ВГМУ».