

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«РОССИЙСКИЙ ЦЕНТР СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ»

На правах рукописи

Куприянов Дмитрий Дмитриевич

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

3.3.5. Судебная медицина (медицинские науки)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

Федулова Мария Вадимовна

доктор медицинских наук, доцент

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ДИАГНОСТИКИ ПРИЖИЗНЕННОСТИ МЕХАНИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	15
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	44
2.1. Материал исследования и его объем	44
2.2. Методы исследования	46
2.2.1. Гистологическое исследование образцов, окрашенных гематоксилином и эозином, толуидиновым синим / азуром-II и эозином.....	46
2.2.2. Иммуногистохимическое исследование.....	47
2.2.3. Морфометрическое исследование	50
2.2.4. Статистическое исследование	51
ГЛАВА 3. ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ С АНТИТЕЛАМИ К TGFβ1, CD62P, AQP3 И HMGB1	54
3.1. Предварительная оценка прижизненности повреждений кожи в срезах, окрашенных гематоксилином и эозином	54
3.2. Характеристика иммуногистохимической реакции TGFβ1	57
3.2.1. Результаты оценки и научное обоснование экспрессии TGFβ1 в исследуемых образцах	57
3.2.2. Метод определения прижизненности повреждений кожи с помощью антител к TGFβ1	64
3.3. Характеристика иммуногистохимической реакции Р-селектина (CD62p)..	65
3.4. Характеристика иммуногистохимической реакции аквапорина-3 (AQP3) .	68
3.5. Характеристика иммуногистохимической реакции HMGB1	74
ГЛАВА 4. ХАРАКТЕРИСТИКА ДИНАМИКИ ПЛОТНОСТИ И ДЕГРАДУЛЯЦИИ ДЕРМАЛЬНЫХ ТУЧНЫХ КЛЕТОК	80
4.1. Оценка деградации тучных клеток в области повреждений кожи	80
4.2. Характеристика динамики плотности дермальных тучных клеток в исследованных образцах кожи	82

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	90
Перспективы дальнейшей разработки темы	94
ВЫВОДЫ.....	96
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	98
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	100
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА	119

ВВЕДЕНИЕ

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 [30].

Классический гистологический метод диагностики прижизненности и давности повреждений, основанный на исследовании перифокальных сосудистых и клеточных реакций, повсеместно применяется в экспертных учреждениях в качестве традиционного, он прост, не требует дополнительного оборудования и расходных материалов помимо базового оснащения гистологической лаборатории, проверен десятилетиями экспертной работы. Однако, при наличии ряда преимуществ, свойственных классической гистологии, указанный метод имеет существенные недостатки. Во-первых, он недостаточно учитывает индивидуальные особенности динамики перифокальных реакций, на что обращали внимание многие исследователи, прилагавшие усилия к уточнению метода. Во-вторых, применению метода мешает явление переживаемости тканей, при котором

отдельные учитываемые в нем реакции «сосудистого» типа могут быть воспроизведены и после наступления смерти; кроме этого, реакция такого типа может возникать в ответ на иные патологические состояния, являющиеся фоновыми на момент повреждения. При этом следует отметить, что, если вопрос индивидуальных различий в скорости развития перифокальных реакций разработан уже достаточно подробно и вносит все меньше негативного влияния в точность оценки давности, то с определением прижизненности дело обстоит гораздо хуже: с учетом переживаемости тканей, повреждение может считаться достоверно прижизненным, если в его перифокальной зоне выявляются клеточные реакции, что соответствует давности причинения более 30 минут. Признаки, которые достоверно свидетельствовали бы о прижизненности повреждений с меньшей давностью и не воспроизводились бы в посмертных повреждениях, пока не установлены, а все исследования в этой области носят экспериментальный характер.

В настоящее время большую актуальность в патологоанатомических и судебно-медицинских научных исследованиях приобрели иммуногистохимические (далее ИГХ) методы, с помощью которых можно исследовать на молекулярном уровне весь комплекс реакций, происходящих в организме в ответ на воздействие повреждающего фактора. При разработке ИГХ методов диагностики прижизненности и давности повреждений, поиске новых маркеров, пригодных для этой цели, исследователи руководствуются знаниями о происходящих в поврежденной ткани химических процессах межклеточного взаимодействия, обуславливающих развитие воспалительно-репаративной реакции и в конечном счете направленных на заживление повреждения. Выбор того или иного антигена для изучения в качестве потенциального маркера определяется его источником, а также временем после причинения травмы, в течение которого данный антиген начинает обнаруживаться в поврежденной ткани. Присутствие либо отсутствие того или иного маркера должно являться одним из результатов реакции организма на воздействие патологического агента, не иметь место при нормальном состоянии и в посмертных повреждениях; интервал времени

его обнаружения, по возможности, должен быть узким и неизменным. Наибольший интерес представляют маркеры, обнаружение которых возможно уже с первых минут существования повреждения, и которые таким образом могут указывать на прижизненность травмы.

К настоящему времени 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. Какие-либо рекомендации по ИГХ диагностике прижизненности в экспертной практике отсутствуют, за редкими исключениями, касающимися отдельных видов повреждений, например, огнестрельной травмы и strangulationной асфиксии [6]. Таким образом, тема настоящего диссертационного исследования является актуальной.

Степень разработанности темы исследования

В 2000 году С. Hernandez-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 [95].

В 2011 году в классическом учебнике судебной гистопатологии R.V. Dettmeyer привел историко-литературный обзор исследований в области диагностики прижизненности и давности повреждений. Автор 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 [73].

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, [29]) 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. [6, 21, 23, 32], а также прижизненности повреждений мягких тканей по методу Хромовой А.М. [42, 43] с участием авторов методов.

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 повседневно 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

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

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 Р-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 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, их статистическая 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.

Для достижения поставленной цели и реализации задач научного исследования 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 исследования, 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 TGFβ1 в образцах кожи, прижизненно поврежденной тупыми твердыми предметами, по сравнению с контрольными образцами неповрежденной и посмертно поврежденной кожи; предложена гипотеза двунаправленной активации TGFβ1 в структурах поврежденной кожи.

2. Предложен иммуногистохимический метод с использованием антитела к TGFβ1, 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 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 работы

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 иммуногистохимического метода диагностики прижизненности с применением антител к TGF β 1 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 [38]. 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 традиционных 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 работы

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.

Глава 1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ДИАГНОСТИКИ ПРИЖИЗНЕННОСТИ МЕХАНИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Более 120 лет назад значимость вопросов прижизненности повреждений для судебного разбирательства отразил в диссертации И.П. Шишкин [45]. В труде под названием «Травматические кровоподтеки прижизненные и посмертные» автор приводит результаты микроскопического исследования прижизненных и экспериментально причиненных посмертных кровоподтеков. Наибольшее использованное автором увеличение микроскопа составляло 21 крат. Сделанные выводы представляют исторический интерес: автор предлагает различать прижизненные кровоподтеки по размеру и инфильтрирующему характеру кровоизлияний, а также по развитию прижизненных реакций, имея в виду лейкоцитарную: часть лейкоцитов автором, как он пишет, «застигнута в момент пролезания сквозь стенку сосуда». Также указано, что различение кровоподтеков, нанесенных незадолго до смерти, или спустя малое время после ее наступления, представляет значительную трудность. Руководителем диссертанта был знаменитый академик Н.П. Ивановский, а цензором (оппонентом) – приват-доцент Д.П. Косоротов, впоследствии проводивший исследование трупа Г.Е. Распутина.

Методика диагностики прижизненности и давности повреждений, именуемая сейчас классической и базирующаяся на исследовании сосудистых и клеточных приспособительных реакций, известна уже в течение нескольких десятилетий. В известном руководстве 1980 года В.Г. Наumenко и Н.А. Митяевой [20] первая глава целиком посвящена прижизненным реакциям, к которым авторы относят изменения кровообращения (гиперемию, ишемию, изменения реологии, кровоизлияния), лимфообращения, распределительный тканевой лейкоцитоз, воспаление и стресс-реакцию. Описывая морфологию повреждений, в главе, посвященной механической травме, авторы приводят принятую к тому времени в науке хронологию развития воспалительного процесса в перифокальной зоне кровоизлияний: в первые минуты – гиперемия и спазм сосудов на отдалении, к 30–40 минутам – появление лейкоцитов в сосудах, к 1 часу – небольшое количество

лейкоцитов периваскулярно, к 6 часу – нарастание интенсивности лейкоцитоза и так далее.

Приведенная схема оценки давности повреждений впоследствии неоднократно уточнялась, в нее вносились новые признаки, пересматривались отметки времени, но сущность остается неизменной по настоящее время: в основу оценки прижизненности и давности повреждений положено время возникновения перифокальных сосудистых и клеточных реакций, общих в случаях повреждения и воспаления ткани.

Задолго до выхода руководства В.Г. Наumenко и Н.А. Митяевой, в 1969 году И.В. Крыжановская [13] предложила гистохимический метод определения нуклеиновых кислот и полисахаридов в поврежденных тканях, которым предполагала уточнить схему определения давности повреждений, основанную на клеточных реакциях. Метод не прижился, в практику внедрен не был, и В.Г. Наumenко о нем не упоминает.

В 1984 году Д.Д. Зербино и Л.Л. Лукасевич [7] предложили несколько методов дифференцированной окраски фибрина разной давности образования, ныне известных как окраска по Зербино или окраска «ОКГ» («оранжевый, красный, голубой») и ряд ее модификаций. Метод оказался успешным и широко применяется в гистологической практике, дополняя и уточняя оценку давности повреждений по клеточным реакциям.

В 1985 году А.Ф. Кулик по результатам проведенных исследований предложил метод гистохимического определения КФ, ЩФ, АТФазы, СДГ, ДНК, РНК в краях ран, в сочетании с морфометрией перифокального распределения лейкоцитов для уточнения давности повреждений [14]. Не останавливаясь подробно на сути метода (он не нашел практического применения), отметим, что важным аспектом работы А.Ф. Кулика явилось подтверждение зависимости скорости развития клеточных реакций от локализации повреждений: в экспериментах разница между временем возникновения одних и тех же реакций в различных областях тела достигала 6–12 часов.

В 1996 году Д.В. Сундуков и М.Н. Ларина изучали динамику сосудистых реакций в поврежденных внутренних органах [33].

Попытку уточнения методики диагностики давности повреждений путем оценки динамики развития отека по слоям кожи и количественной оценки выраженности лейкоцитарной реакции (подсчет лейкоцитов в полях зрения) в 2002 году предприняла С.В. Хасанянова [41]. Сведения о практическом применении этого метода нам не встречались.

В 2003 г. во втором издании руководства для врачей «Судебно-медицинская гистология» А.В. Пермякова, В.И. Витера и Н.И. Неволлина [25] практически точно воспроизведена схема диагностики давности повреждений по клеточным реакциям из книги В.Г. Науменко и Н.А. Митяевой [20]. Несмотря на уже имеющиеся к тому времени разработки на тему индивидуальных особенностей реактивности, никаких сведений в руководстве об этом не приводится.

В 2005 году З.М. Лунева и соавт. описали влияние алкогольной интоксикации и обильной кровопотери, которые, по полученным ими результатам в несколько раз затормаживали развитие перифокальных клеточных реакций; также авторы отметили различие в скорости развития клеточных реакций в зависимости от локализации повреждений по областям тела [18].

В 2006 году вышел и в 2010 г. был повторно издан «Атлас по судебно-медицинской экспертизе» под редакцией Ю.И. Пиголкина и И.Н. Богомоловой [2]. Он стал в своем роде знаменательной попыткой перейти в изложении материала на западные принципы «forensic pathology» – судебной патологии, представив в одном издании комплексный макро-морфологический и патогистологический подход к изучению повреждений и насильственной смерти вообще. Атлас представляет собой несомненную ценность для судебно-медицинских экспертов, позволяя систематизировать знания танатологов и обобщить понимание методов макро- и микроскопической диагностики. В атласе представлены классическая схема оценки перифокальных сосудистых и клеточных реакций, а также метод определения давности фибрина по Зербино. К сожалению, вопросы переживаемости тканей и связанных с нею трудностей диагностики

прижизненности, а также учета индивидуальной реактивности в атласе отражения не нашли.

М.И. Лаптева в 2007 году на диссертационном материале [17] показала важность учета индивидуальных особенностей при оценке перифокальных реакций. В ее работе гистологическим и морфометрическим методом оценивались перифокальные реакции, включая, помимо клеточных, изменения мышечных волокон, стромы, сосудов микроциркуляторного русла. У лиц с признаками хронической экзогенной интоксикации, а также анамнестически асоциальных, было достоверно установлено замедление воспалительно-репаративной реакции в мягких тканях в ответ на повреждение.

Е.А. Киреева установила, что перифокальная реакция мягких тканей в области переломов ребер развивается быстрее, чем при повреждениях других локализаций, также подчеркнув своей работой важность изучения особенностей динамики перифокальных реакций в зависимости от различных факторов [12].

В методическом письме, посвященном вопросу определения прижизненности и давности повреждений, И.А. Фролова и соавт. указывают на то, что наличие сосудистой реакции является сомнительным признаком прижизненности повреждений, а ее отсутствие не дает права утверждать о посмертности причинения. В целом же, авторы считают, что гистологическое определение прижизненности и давности может носить лишь предположительный характер [39].

Экспериментальная работа О.Ю. Берг и соавт. в 2008 году оказалась достаточно провокационной по отношению к устоявшемуся представлению о прижизненных перифокальных клеточных реакциях. Авторы описали лейкодиапедез в тканях, экспериментально поврежденных спустя 4–6 часов после наступления смерти, причем, по описанию, лейкоцитарная реакция при этом нарастала с течением времени после причинения повреждения, вплоть до «более или менее густых скоплений» в зоне кровоизлияний к 40 часам после причинения повреждений. Авторы сделали вывод о необходимости гистологического

исследования нескольких зон поврежденных тканей для более точного ответа на вопрос о прижизненности и давности повреждений [3].

Отнюдь не бесспорные результаты еще одного эксперимента были опубликованы в 2009 году В.Д. Исаковым и соавт., которые отметили, что гистологически в областях повреждений, причиненных в течение суток после наступления смерти, обнаруживались кровоизлияния с перифокальным отеком и даже «скоплениями лейкоцитов на фоне эритроцитарных масс» и «лейкостазам в прилегающих тканях». Непонятно, что скрывалось за таким описанием, но сделанные авторами выводы о возможности посмертного образования кровоизлияний и необходимости дальнейшего углубленного изучения прижизненных реакций следует признать вполне справедливыми [10].

Отойдя от хронологии, сразу скажем, что спустя 10 лет Е.А. Бихерт и соавт. своими исследованиями опровергли точку зрения О.Ю. Берг и В.Д. Исакова, не найдя в экспериментальных посмертных повреждениях каких-либо проявлений хемотаксиса лейкоцитов [4].

В.В. Остробородов и соавт. на 16 исследованных случаях смерти лиц, длительно находившихся в положении лежа на спине в реанимационном отделении стационара, показали отчетливое замедление перифокальных реакций поврежденных мягких тканей в областях, испытывавших давление вследствие положения тела (теменно-затылочная область, область лопаток, крестца, ягодичная область) [24].

Методические рекомендации, выпущенные в 2010 году в ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Министерства здравоохранения Российской Федерации Д.В. Богомоловым и соавт. явились первым методическим документом по вопросу диагностики давности повреждений, в котором была отражена проблема индивидуальных различий в динамике воспалительно-репаративных реакций и существующая субъективность их оценки. Авторы указывают на обязательность оценки реактивности, исходя, как минимум, из анамнестических данных (возраст, социальное положение, условия жизни, наличие заболеваний и т.п.), локализации и обстоятельств возникновения повреждений.

Авторами составлена хронологическая таблица с детальной характеристикой признаков для определения давности повреждений, учитывающая возможность их типичного, раннего и позднего времени появления, представлен методический подход к оценке реактивности и трактовке результатов гистологического исследования [31].

А.А. Халиков и соавт. в 2011 году провели исторический обзор не относящихся к гистологии методов (биофизических и биохимических), предлагавшихся для диагностики прижизненности и давности повреждений, сделав вывод об отсутствии четкой программы дальнейших исследований и разработки перспективных методов оценки [40].

В «Руководстве по судебной медицине», вышедшем в 2012 году под редакцией В.Н. Крюкова и И.В. Буромского [28], вопросы судебно-медицинской гистологии освещены очень кратко; проблеме диагностики давности повреждений уделено мало внимания, авторы ограничились сокращенным изложением классического метода оценки перифокальных реакций применительно к ранам.

В 2018 году в масштабном исследовании Т.А. Карпенко (111 случаев, 600 срезов) был применен комплексный подход к диагностике давности повреждений, включавший как оценку перифокальных реакций, так и определение давности фибрина по Зербино. В результате были показаны различия в динамике перифокальных реакций и «старения» фибрина в зависимости от локализации повреждений (голова, туловище, конечности), что автор связывает с особенностями кровоснабжения [11].

В национальном руководстве по судебной медицине, вышедшем в 2018 году под редакцией Ю.И. Пиголкина [30], авторами приведено подробное изложение хронологии явлений, происходящих в поврежденных тканях; отмечено множество ферментных и белковых факторов, выделяющихся на различных этапах тканевой реакции. Уделено внимание переживаемости тканей и, как следствие, трудности диагностики прижизненности повреждений на ранних этапах их существования. Подробно приведена классическая схема оценки давности повреждений по перифокальным сосудистым и клеточным реакциям, а также особенности

хронологии течения повреждений в различных тканях. К факторам, влияющим на динамику развития реакций в поврежденных тканях, авторы относят: характер ткани, вид повреждающего фактора, объем повреждения, регионарные особенности заживления, индивидуальные особенности (возраст, реактивность), лечение, в том числе хирургическое, и другие. В заключение авторы приводят перечень микроскопических, биохимических и биофизических методов, используемых для определения прижизненности и давности повреждений, упоминая из гистологических методов классическую гистологию и гистохимию, но не сообщая о возможностях иммуногистохимической диагностики.

Работы по поиску маркеров прижизненности и давности повреждений начал в 1960-е годы J. Raekallio, исследовав возможности гистохимической оценки содержания в поврежденных тканях гистамина и серотонина [135, 136]. Как показало время, результаты его исследований, проведенных в период по 1988 год, не нашли практического рутинного применения в судебной медицине, но послужили толчком к поиску новых перспективных методов.

Одними из первых работ, посвященных иммуногистохимическим маркерам заживления ран, были исследования G. Schultz и N.T. Bennett [115, 144], которые изучали факторы роста и дифференцировки. Так, исследуя процесс заживления ран в фармакологических целях (для разработки препаратов, влияющих на заживление), G. Schultz и соавт. в 1991 году провели серию экспериментов с эпидермальным фактором роста (EGF) и трансформирующим фактором роста – альфа (TGF α), показав их роль в процессах воспаления и репарации. Оба фактора синтезируются несколькими клетками, вовлеченными в процесс заживления раны, включая тромбоциты, кератиноциты и активированные макрофаги. Была выявлена целесообразность применения данных пептидов для лечения ран [144].

В клинических целях N.T. Bennett и G. Schultz в экспериментах *in vitro* установили, что пептидные факторы роста (EGF, TGF β , полученный из тромбоцитов фактор роста PDGF, инсулиноподобный фактор роста IGF и фактор роста фибробластов FGF) и их рецепторы регулируют ключевые аспекты восстановления мягких тканей, экспериментально полученные данные автор

подтвердил обзором клинических исследований [60, 61]. Такого же мнения о важности роли пептидных факторов роста в процессах заживления ран придерживался W. T. Lawrence [115].

В проведенном M. Schiller и соавт. исследовании сигнальных каскадов в поврежденных мягких тканях показана роль $TGF\beta$ в замедлении некротических и воспалительных реакций в тканях и в последующей организации внеклеточного матрикса в ходе заживления повреждений [142]. Позднее M. Pikuta и соавт., N. Ashika Riswana и K.K. Don показали в своих обзорных статьях значение межклеточных взаимодействий и влияния пептидных факторов роста в раневом процессе [57, 146]; отдельно $TGF\beta$ в этом плане посвящена обзорная статья D. Kiritsi и A. Nystrom [112].

В судебно-медицинском аспекте пептидные факторы роста $TGF\alpha$ и $TGF\beta 1$ изучали W. Grellner и соавт. [90], которые сосредоточили усилия на исследовании их происхождения, роли в заживлении ран и связанных с ними возможностях иммуногистохимических исследований. Были исследованы 125 кожных ран (операционный и биопсийный материал), а также контрольные образцы. В неповрежденной коже $TGF\alpha$ либо не экспрессировался, либо слабо экспрессировался в потовых железах, соединительной ткани, субэпидермальных клетках и сосудах; слабо экспрессировался в эпидермисе. Начиная с повреждений давностью 10–20 мин, экспрессия резко возрастала, особенно в шиповатом слое эпидермиса; пик экспрессии достигался в течение 60 минут. $TGF\beta 1$ в неповрежденной коже экспрессировался в глубоких слоях соединительной ткани; умеренная или выраженная экспрессия отмечалась в эндотелии; в эпидермисе и потовых железах экспрессия не отмечалась. Уровень экспрессии $TGF\beta 1$ отчетливо возрастал уже в первые минуты после причинения повреждения, особенно на широких участках травмированной кожи в верхних ее слоях, а также в шиповатом и базальном слое эпидермиса (иногда в зернистом). В соединительной ткани гиперэкспрессия носила характер сетчатого окрашивания, в глубоких слоях дермы нарастала стремительно. Примерно в 1/3 случаев гиперэкспрессия начиналась с первых минут после причинения повреждения, достигая наибольшего уровня в

эпидермисе в течение 30 минут. В дополнение к гиперэкспрессии TGFβ1 в эпидермисе, выраженная экспрессия обнаруживалась также в областях кровоизлияний. При давности повреждений от 30 до 60 минут почти в 90% кожных ран были отмечалась гиперэкспрессия TGFβ1, впоследствии сохранявшаяся в поздних фазах заживления. В то же время, поврежденные ткани с самым коротким периодом переживания (секунды, в случаях несовместимой с жизнью рельсовой травмы) не показывали никакой гиперэкспрессии TGFβ1. По результатам исследования авторы сделали выводы о том, что TGFα может применяться в качестве маркера раннего посттравматического интервала (примерно до 1–1,5 часов); TGFβ1 может применяться, начиная с 30 минут после причинения повреждения. В то же время, учитывая факт гиперэкспрессии TGFβ1 вблизи кровоизлияний, авторы предостерегают о возможности положительной реакции в посмертных повреждениях при наличии излития крови в мягкие ткани [90].

Т. Kondo в своих работах также положительно высказывается о возможности использования TGFβ1 и TGFα для оценки прижизненности повреждений и отмечает, что тема иммуногистохимических методов диагностики прижизненности и давности повреждений становится одной из самых востребованных и популярных в судебной медицине; в качестве перспективного метода автор рассматривает определение экспрессии нескольких маркеров одновременно [113, 114].

Заметные теоретические исследования о роли факторов роста, а также фибрина и хемокинов в регуляции динамики раневого процесса проведены R. Clark [68] и R. Gillitzer [86].

Большое внимание исследованию возможных маркеров прижизненности и давности повреждений уделили Р. Betz и соавт. В 1992 году их иммуногистохимическое исследование было посвящено связанным с миофибробластами перицеллюлярным компонентам базальной мембраны — коллагену типа IV, ламинину и гепарансульфата протеогликану (HSPG). Ламинин и HSPG были впервые обнаружены вокруг миофибробластов приблизительно через 1,5 дня после причинения повреждения. Коллаген типа IV не появлялся до 4-го дня

после нанесения раны. В ранах с давностью более 7 дней в 94% случаев фибробластические клетки имели положительное окрашивание на ламинин, в 70% ран содержались фибробластические клетки, положительные на HSPG, и в 63% вокруг этих клеток была получена положительная реакция на коллаген IV типа. Количество случаев, а также клеток, положительно окрашенных на ламинин, превысило соответствующие значения для HSPG и особенно для коллагена типа IV. Согласно выводам Р. Betz и соавт., перичеселлюлярное появление ламинина или HSPG вокруг миофибробластов указывало на давность раны, по меньшей мере, приблизительно 1,5 дня, а перичеселлюлярная локализация коллагена типа IV указывала на давность приблизительно 4 дня или более [150].

В том же году эти же авторы провели аналогичное исследование, посвященное фибронектину. Были исследованы 53 прижизненных раны, разделенные на группы по давности причинения; для контроля использованы 6 экспериментальных посмертных ран. В контрольных образцах слабое очаговое положительное окрашивание было обнаружено исключительно на краю образцов, и не распространялось на окружающую строму. Среди 17 исследованных ран давностью до 30 минут в десяти было обнаружено отчетливое положительное окрашивание стромы на фибронектин; отсутствие реакции в оставшихся 7 образцах автор объяснил чрезвычайно коротким периодом переживания (секунды). В ранах давностью до 3 недель фибронектин образовывал отчетливую сеть, содержащую все большее количество воспалительных клеток, соответствующих давности причинения раны. Авторы пришли к выводу о том, что фибронектин является полезным маркером для определения прижизненности ран давностью более нескольких минут и появляется до начала лейкоцитарной реакции [105].

В 1995 году Р. Betz объединил результаты своих исследований, создав в обзоре [63] первый прототип схемы для оценки давности повреждений. По его мнению, иммуногистохимическое обнаружение нитевидных ветвящихся структур с положительной реакцией на фибронектин в ранах давностью не менее нескольких минут свидетельствовало об их прижизненности еще до появления нейтрофильных гранулоцитов. Положительные реакции на коллаген типа III указывали на давность

повреждения по меньшей мере 2–3 дня, тогда как положительные реакции на коллаген типа V или VI возникали не раньше, чем через 3 дня после повреждения, а на коллаген типа I – не раньше 4 дней. Фибробласты, положительно окрашивающиеся в реакции на ламинин или HSPG, свидетельствовали о давности раны 1,5 дня или более. Вся схема была рассчитана на определение давности раны до 3 недель.

Экспрессию фибронектина в повреждениях исследовали также W. Grellner и соавт. [87]. Их работа поставила под сомнение ранее полученные данные о перспективности исследования фибронектина как маркера прижизненности и давности. В своих экспериментах с кожей свиней авторы получили положительную реакцию на фибронектин в половине (18 из 36) образцов посмертно причиненных повреждений. Однако, в опубликованном в 2007 году обзоре W. Grellner и B. Madea к перспективным маркерам раннего (до 1 часа) периода заживления повреждений относят не только TGF β 1, TGF α и другие маркеры, с которыми у них получились положительные результаты, но и фибронектин, что является противоречием относительно предыдущих исследований этих авторов [91].

В материале, представленном J. Balazic и соавт., исследовали экспрессию фибронектина в мягких тканях с огнестрельными повреждениями с коротким периодом переживаемости, оценивая интенсивность и распространенность реакции. По результатам был сделан вывод о том, что фибронектин является надежным маркером прижизненности раны и мощным инструментом для определения ее давности [79].

Еще одним положительным примером использования фибронектина и некоторых других белков как маркеров ранней реакции на повреждение является работа A. Fieguth и соавт., которые изучали возможность применения иммуногистохимических методов для оценки прижизненности странгуляционной борозды в случаях механической асфиксии. В качестве маркеров, помимо фибронектина, были выбраны миоглобин, мембраноатакующий комплекс C5b-9 и белок MRP-14. Исследовали поврежденные ткани шеи в случаях асфиксии, используя для контроля неповрежденные ткани шеи и образцы с механическими

повреждениями, не связанными с асфиксией (травма). По мнению авторов, полученные результаты позволяли сделать вывод о применимости панели из нескольких маркеров для оценки прижизненности повреждений в случаях асфиксии [81].

Многие исследователи в качестве маркеров ранней реакции на повреждение пытались применить цитокины, в частности, интерлейкины. Так, W. Grellner и соавт. в своих исследованиях изучали следующие цитокины – интерлейкин-1 β (IL-1 β), интерлейкин-6 (IL-6) и α -фактор некроза опухоли (TNF α) в 105 операционных и аутопсийных образцах колото-резаных ран человека, давностью от нескольких минут до 6 недель. Повышенная экспрессия IL-1 β и IL-6 в клетках эпидермиса, сосудов и потовых желез отмечалась уже через 15 и 20 минут соответственно, достигая максимума через 30–60 и 60–90 минут. Повышенная экспрессия TNF α наблюдалась через 15 минут с максимумом к 60–90 минутам. Уровень всех трех маркеров опускался до обычных значений через несколько часов. Аутолиз при давности смерти до 8 дней не искажал результаты исследований. Проанализировав результаты, авторы порекомендовали использовать в качестве контроля образцы от того же субъекта для индивидуального определения уровня базовой экспрессии маркеров [88, 89].

Y. Ishida, M. Nosaka и A. Kimura [103] провели иммуногистохимическое исследование уровня экспрессии интерлейкина IL-6, выделяющегося, в основном, интратромботическими макрофагами, в модели венозного тромба. Полученные данные позволили авторам сделать вывод о пригодности IL-6 как перспективного маркера для дальнейшей разработки методов оценки давности тромбов в интервалах времени образования свыше 5–7 дней.

Имеются также работы, посвященные изучению молекул клеточной и эндотелиальной адгезии в аспекте рассматриваемой проблемы. J. Dressler и соавт. в 1997 году по результатам исследования, посвященного молекуле клеточной адгезии ICAM-1 (CD54) пришли к выводу о том, что этот антиген может рассматриваться в качестве маркера прижизненности, поскольку его выраженная экспрессия наблюдается в поврежденных тканях в период от 1,5 часов до 3 суток

от причинения повреждения; в то же время автор отмечал, что одного лишь CD54 для решения вопроса о приживленности и давности недостаточно [151]. Продолжая свои исследования, автор получил аналогичные результаты для молекулы эндотелиальной адгезии VCAM-1 (CD106), получив отчетливую положительную реакцию в период от 3 часов до 3 суток, выраженно отличающуюся от отрицательной либо слабо положительной реакции в неповрежденной кожи, а также в экспериментальных образцах посмертных повреждений [76, 78].

Собрав большой экспериментальный, биопсийный и секционный материал (465 образцов ран), J. Dressler и соавт. провели иммуногистохимическое исследование с ICAM-1, VCAM-1, P- и E-селектинами. Положительный результат (гиперэкспрессия) наблюдался: для ICAM-1 через 1,5 часа, для P-селектина через 3 минуты, для E-селектина через 1 час, для VCAM-1 через 3 часа после причинения повреждения. В качестве контроля использовалась неповрежденная кожа и посмертно причиненные экспериментальные повреждения, однако о результатах исследования последних автор не сообщил [80].

Исследование J.A. Ortiz-Rey оказалось критическим по отношению к сторонникам изучения P-селектина в качестве иммуногистохимического маркера приживленности повреждений. Результаты исследований 45 образцов ран (24 приживленных, 14 посмертных экспериментальных, 7 с аутолитическими и гнилостными изменениями) показали отсутствие достоверных различий уровня экспрессии P-селектина в приживленных и посмертных повреждениях. По мнению автора, выявление P-селектина в посмертных повреждениях не позволяет считать его сколь-либо надежным маркером приживленности [99].

N. Van der Laan и соавт. первыми обозначили перекочевавшую из классической гистологии проблему зависимости иммуногистохимических проявлений динамики процессов заживления от вида и локализации повреждений. Исследовав группу из 21 биопсийного образца, включавшую хирургические раны, инфицированные раны и кожу в проекции перелома бедра, он установил различия в сроках экспрессии практически всех упомянутых к тому времени в исследованиях

потенциальных маркеров, включая Е- и Р-селектин, интерлейкины, ICAM-1, VCAM-1 [156].

Несмотря на упомянутые выше противоречия в опубликованных результатах исследований пригодности Р-селектина в качестве маркера прижизненности, в 2002 году отечественный исследователь А.М. Хромова провела собственную работу, подвергнув иммуногистохимическому анализу 18 аутопсийных образцов ран давностью от 2–3 минут и установив во всех случаях гиперэкспрессию Р-селектина в эндотелии сосудов. Сделав вывод о пригодности Р-селектина для оценки прижизненности повреждений, автор, тем не менее, ничего не сообщила об исследовании контрольных образцов интактных и посмертно поврежденных тканей, что не позволяет судить о специфичности выбранного ею маркера [42].

Продолжая пробные исследования, в следующем году А.М. Хромова продемонстрировала оригинальный подход, используя в практической экспертизе не положительный, а отрицательный результат иммуногистохимического анализа. Она сообщила об исследовании экспрессии Е- и Р-селектина в посмертно выражено измененных образцах трупной ткани (фрагмент мозгового вещества и зуб); основываясь на отсутствии экспрессии Р-селектина, автор сделала экспертный вывод об отсутствии прижизненных повреждений [43], не принимая в расчет аутолитические изменения тканей.

В 2010 году были опубликованы разработки R. Ceschì, которая также изучала экспрессию Р-селектина, полагая, что он является достаточно надежным маркером прижизненности повреждений. По ее данным, повышенная экспрессия Р-селектина обнаруживалась в эндотелиальных клетках сосудов кожи уже через 1 мин после причинения повреждения, достигая максимума к 10–15 минутам. В других исследованиях повышенная экспрессия выявлялась в период от 3 мин до 7 ч. Поскольку базовая экспрессия Р-селектина достаточно вариабельна, автор рекомендует проводить ее оценку обязательно в сравнении с негативным контролем образца кожи того же субъекта. Для выбора надежных маркеров прижизненности повреждений автор рекомендует полагаться на те, которые в норме вообще не присутствуют в неповрежденных тканях; к таким маркерам были

отнесены IL-1 β (в кератиноцитах), TNF α (в кератиноцитах), IL-6 (в кератиноцитах), VCAM, а также селектины E и P. Кроме того, могут быть использованы вещества, которые никогда не присутствуют в посмертных повреждениях: лейкотриен- β_4 , катепсины A и D, D-димер фибрина. Положительно автор отзывается о перспективах исследования TGF β 1, указывая, что он в норме экспрессируется только в соединительной ткани. О возможности применения ряда маркеров, в том числе фибрина и фибронектина, простагландинов, гистамина, протеаз R. Сесчи высказывается критически, считая получаемые с их помощью результаты недостоверными [66].

Тем не менее, в опубликованном в 2007 году обзоре W. Grellner и B. Madea [91] к перспективным маркерам раннего (до 1 часа) периода заживления повреждений относят не только TGF β 1, TGF α , IL-1 β , IL-6, TNF α , ICAM-1, VCAM-1, рекомендованные различными авторами согласно полученным положительным результатам, но и фибронектин и E- и P-селектины, по поводу которых ранее были получены противоречивые данные.

Похожий обзор литературных данных, но касающийся гистохимических маркеров, пригодных для определения давности повреждений в мягких тканях и головном мозге, подготовил M. Oehmichen. В качестве маркеров ранней давности (до 30 минут) повреждений мягких тканей автор приводит фибронектин, катепсин D, фибрин D-димер, TNF α , IL-1 β , лейкотриен B $_4$, P-селектин. Тем не менее, по мнению автора, данный вопрос требует дальнейшего изучения [130].

Многим приведенным выше данным противоречит работа E. Turillazzi и соавт., которые так же, как и предыдущие авторы, оценивали пригодность различных маркеров прижизненности применительно к странгуляционным бороздам. Материалом послужила кожа со странгуляционной бороздой в 49 случаях повешения; для контроля использован 21 образец неповрежденной кожи и экспериментальные посмертные борозды. Были применены антитела к фибронектину, TNF α , триптазе, IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1, IL-15, IL-1 β , CD45, CD4, CD3, CD8, CD68, CD20, CD15. По мнению авторов, из всех перечисленных веществ

только триптаза, CD15 и IL-15 могут быть надежными для оценки прижизненности странгуляции [154].

G. Gauchotte в своем обзоре (2013) указал, что иммуногистохимия представляется наиболее ценным методом определения прижизненности и давности повреждений кожи до начала видимой клеточной реакции, учитывая простоту выполнения и возможность анализа локализации молекул, представляющих интерес. К перспективным для изучения маркерам автор относит $\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-1 β , $\text{TGF}\alpha$ и $\text{TGF}\beta 1$. Особое внимание автор обращает на необходимость многократной проверки результатов исследований на посмертных экспериментальных повреждениях, поскольку многие ранее исследованные маркеры оказались, по мнению автора, ненадежными именно по причине положительной реакции в посмертных повреждениях (например, фибронектин, Р-селектин) [149].

Начиная с 2014 года, большой вклад в изучение иммуногистохимии тканевых реакций вносят F.R. Van de Goot и J. Fronczek. Проведя огромный объем исследований (более 800 образцов кожи), они разработали вероятностную систему оценки прижизненности и давности повреждений кожи, основываясь на уровне экспрессии фибронектина, Р-селектина и фактора VIII; в то же время ни один из указанных маркеров не показал абсолютно определяемых результатов, которые можно было бы интерпретировать без применения вероятностных методов оценки [47].

В исследовании С.О. Caratina, опубликованном с интригующим названием «Действительно ли Р-селектин и фибронектин полезны в оценке прижизненности?» результаты, по мнению автора, свидетельствуют о пригодности указанных маркеров для диагностики прижизненности, но в то же время непригодности для диагностики давности, поскольку корреляция между их экспрессией и давностью повреждений обнаружена не была [65]. В то же время следует отметить, что исследование было проведено всего на 17 аутопсийных образцах прижизненных повреждений, и ни о каком контроле авторы не сообщили.

Большой интерес представляет исследование реакции тучных клеток на повреждение тканей, проведенное в судебно-медицинском аспекте А. Bonelli и соавт. Поскольку морфометрические методы гистологии были к этому времени уже хорошо известны, авторы провели исследование плотности расположения тучных клеток (на мм² площади среза) в краях повреждений кожи. Иммуногистохимии автор отвел прикладную роль, проведя достоверную маркировку тучных клеток окраской на триптазу и химазу. Исследованы прижизненные раны давностью от нескольких секунд до 1 часа, контрольные образцы близко расположенной кожи тех же субъектов, образцы неповрежденной кожи других субъектов, посмертно причиненные экспериментальные раны (всего 80 биопсийных и аутопсийных образцов). В результате морфометрическим методом установлено достоверное различие в плотности расположения тучных клеток в прижизненно поврежденных тканях по сравнению как с неповрежденной кожей, так и с посмертно поврежденной [106].

Необходимо отметить, что особенностью исследования А. Bonelli и соавт. является получение прижизненно поврежденных, посмертно поврежденных и интактных образцов кожи от разных субъектов (прижизненно поврежденные и интактные – операционный материал от различных пациентов, посмертно поврежденные – от трупов при судебно-медицинском вскрытии), что не позволило авторам провести сопоставление и анализ реакций тучных клеток у каждого индивида в отдельности и вынудило ограничиться лишь обобщенной статистической обработкой [16].

Позднее морфометрический подход к оценке плотности расположения тучных клеток в перибронхиальной и периваскулярной зоне легочной ткани использовали В. Мисіассіа и соавт., определяя тучные клетки с помощью иммуногистохимической окраски на CD117 и установив, что при смерти от механической асфиксии плотность тучных клеток достоверно возрастает по сравнению со случаями скоропостижной смерти или несовместимой с жизнью травмы [56].

Несколько исследований по изучаемому вопросу провел М. Oehmichen [129]. Первое из них, датированное 2004 годом, не представляет какого-либо интереса в плане оценки прижизненности повреждений, поскольку охватывает иммуногистохимическое определение клеток, участвующих в развитии тканевой реакции (тучные клетки, лейкоциты, лимфоциты, макрофаги) и хронометраж их появления в тканях. Положительным моментом является то, что автор обнаружил дегрануляцию тучных клеток в перифокальной зоне кровоизлияний в течение нескольких минут после повреждения. Также, по мнению автора, миграция нейтрофильных гранулоцитов начиналась в те же сроки, что, однако, противоречит давно принятым данным классической гистологии; объяснения такому противоречию автор не дал.

Собственные эксперименты М. Oehmichen посвятил изучению реакции тучных клеток. На 64 аутопсийных образцах кожных ран с известной давностью повреждений было исследовано количество триптаза-положительных тучных клеток, которые не потеряли активность вследствие дегрануляции, и количество нафтол-AS-D-хлорацетат-эстераза (NAS-DCIAE)-положительных тучных клеток, которые полностью потеряли активность, дегранулировав в ткань энзим-положительными гранулами. Результаты исследования показали, что вблизи краев раны количество NAS-DCIAE-положительных тучных клеток резко падало по сравнению с количеством триптаза-положительных уже в течение первого часа после причинения повреждения. Таким образом, автор сформулировал предположение, что падение количества NAS-DCIAE-положительных тучных клеток в краях раны может являться одним из признаков ее прижизненности, что, однако, требует дальнейшего экспериментального подтверждения [125].

Дегрануляции тучных клеток, а также определению экспрессии в поврежденных мягких тканях фактора VIII, CD15 и триптазы были посвящены собственные разработки G. Gauchotte и соавт. [84]. Из приведенного только определение дегрануляции, по мнению автора, обладало достаточной чувствительностью (75%) и специфичностью (100%) для отнесения к надежным методам диагностики прижизненности.

Впоследствии G. Gauchotte и соавт. исследовали усовершенствованный метод определения плотности расположения гранулоцитарных лейкоцитов, проводя их ИГХ окрашивание антителами к CD15 или миелопероксидазе совместно с окрашиванием гликофорином С – последнее, по мнению авторов, требовалось, чтобы исключить из подсчета лейкоциты, пассивно вышедшие из поврежденных сосудов в кровоизлияниях [127].

В обзорной работе N. Li и соавт. [161] в качестве маркеров повреждений малой давности (первый час) указаны фактор VIII, CD15 и триптаза, ранее упомянутые G. Gauchotte.

Таким образом, в вопросе о возможности исследования реакций тучных клеток в целях диагностики прижизненности повреждений имеются существенные противоречия, поскольку одни авторы считают надежным признаком изменение плотности расположения тучных клеток, и ненадежным – дегрануляцию, а другие придерживаются противоположного мнения.

Помимо исследований, посвященных всем упомянутым выше антигенам, имеются также немногочисленные и разрозненные работы, в которых авторы изучают иммуногистохимическим методом некоторые другие белки. Так, в исследовании R. Hausmann и соавт. была показана возможность оценки давности повреждений кожи на поздних сроках по данным иммуногистохимического исследования фосфопротеина p53 в фибробластах. Результаты показали, что гиперэкспрессия p53 возникала достоверно в ранах давностью 8 дней и более [94].

Широкий спектр исследований, начиная с 2012 года, был проведен Y. Ishida, M. Nosaka и A. Kimura. Проведенное ими иммуногистохимическое определение циклооксигеназы-2 в нейтрофилах и макрофагах в области кожных ран показало положительную реакцию в повреждениях давностью 8 часов и более. В другой работе положительная реакция на металлопротеиназы матрикса MMP-2 и MMP-9 в макрофагах поврежденной кожи была получена к 7-му дню [100, 101].

Переключив внимание с иммуногистохимии на метод белкового иммуноблоттинга (western blotting), авторы провели исследование, основанное на изучении редукции аутофагии в прижизненно поврежденной коже по падению

содержания белка LC3-II - основного маркера аутофагии, отношения фракций LC3-II/LC3-I, а также по увеличению содержания нуклеопорина p62. Использовали экспериментальный материал от мышей и 4 случая аутопсии с давностью наступления смерти от единичных минут (2 случая – повешение) до 1 часа. Во всех случаях в прижизненно поврежденной коже определяли выраженное уменьшение содержания LC3-II, отношения LC3-II/LC3-I, увеличение содержания p62 по сравнению с контрольными образцами. В экспериментальных образцах выраженные изменения наблюдали к 30 минутам после прижизненного причинения повреждений. По мнению авторов, описанный метод явился новаторским в решении вопроса прижизненности повреждений. [58].

В 2018 г. Y. Ishida исследовал экспрессию аквапоринов AQP1 и AQP3 – белков клеточных мембран, регулирующих транспорт жидкости через эпителиальные и эндотелиальные клетки – в образцах кожи шеи, которые были получены от трупов в 56 случаях компрессии шеи (повешение – 35, удушение – 21). Неповрежденная кожа от того же субъекта применялась в качестве контроля. В отношении AQP1 не было установлено существенных различий в поврежденных и неповрежденных образцах; его окраска в капиллярах дермы была практически одинаковой. В то же время наблюдалась резко выраженная и достоверная гиперэкспрессия AQP3 в кератиноцитах в области компрессии кожи. По мнению автора, обнаружение гиперэкспрессии AQP3 в коже шеи можно считать ценным маркером для диагностики прижизненности компрессии шеи. Об исследовании образцов с посмертной экспериментальной компрессией автор не сообщил [82].

Аналогичные результаты для AQP3 ранее (2014) были получены Н. Kubo и соавт. при исследовании прижизненных и посмертных ожогов. Однако, достоверная разница была получена авторами только в результатах количественного определения экспрессии генов, ответственных за синтез AQP3; иммуногистохимическое окрашивание кератиноцитов перифокальной зоны на AQP3 не выявило достоверных различий в прижизненных и посмертных ожогах [83].

Исследование аквапоринов в 2021 г. продолжили J. Prangenberg и соавт. На 30 образцах повреждений различного характера (тупыми твердыми и колюще-режущими предметами, огнестрельные повреждения, странгуляционные борозды, отморожение) устанавливали экспрессию AQP 1 и 3, используя в качестве контроля образцы неповрежденной кожи. Авторы наблюдали повышение экспрессии AQP3 в эпидермисе при всех видах прижизненных механических повреждений и воздействии холода; в большинстве случаев (но не во всех!) экспрессия была выше, чем в макроскопически неповрежденной коже; экспрессия в неповрежденной коже была выше, чем в поврежденной, только в четырех случаях, а в поврежденной коже ни разу не было отрицательной экспрессии. Однако, авторами было показано, что в случаях обширной сочетанной травмы результаты могут быть недостоверными, так как наблюдается общая повышенная выраженность экспрессии AQP3, не имеющая достоверных различий в поврежденной и макроскопически неповрежденной коже, на основании чего был сделан вывод о бесполезности исследования экспрессии AQP3 в случаях обширных травматических воздействий [51].

Y. Yagi и соавт. предложили метод оценки давности повреждений кожи в сроки 1–5 дней, основанный на исследовании комбинации трансмембранных белков CD14, CD32B и CD68, экспрессируемых на воспалительных клетках [102].

В одной из последних работ, посвященных таймингу повреждений (2022), Y. Ishida переключил фокус исследования на клетки костномозгового происхождения и в обзоре описал практически все типы соответствующих клеток (тучные клетки, макрофаги, дендритные клетки; отдельный тип фибробластов, развивающихся из мезенхимальных стволовых клеток) в качестве потенциальных маркеров давности повреждений [109]; в то же время, в отношении тучных клеток, как наиболее рано выявляемых в зоне повреждений кожи, автор не привел никаких собственных результатов, лишь сославшись на ранее указанные данные A. Bonelli.

F.R. Van de Goot и J. Fronczek в серии экспериментов исследовали экспрессию маркеров, свойственных воспалительным клеткам, медиаторов воспаления, а также коллагена III и IV типов. По результатам были составлены

сводные таблицы частоты обнаружения указанных маркеров в различных интервалах времени, прошедшего от причинения повреждения; в отношении коллагена был сделан вывод об отсутствии достоверных изменений его экспрессии в интервале от 4,5 часов до 10 дней [49, 50].

В главе руководства по аутопсийной практике [155], посвященной вопросам диагностики прижизненности и давности повреждений, F.R. Van de Goot и J. Fronczek отмечают, что иммуногистохимическое исследование может быть очень ценным, поскольку методы классической гистологии при отсутствии клеточных реакций не позволяют достоверно отличить ранние (до 15–30 минут) прижизненные повреждения от посмертных. Авторы рассматривают иммуногистохимическое исследование как обязательный этап, следующий за классическим гистологическим исследованием повреждений, и предлагают использовать группу ранних медиаторов, которые обнаруживаются в поврежденных тканях на минимальных сроках после причинения повреждений, к которой относят (в порядке возрастания времени начала обнаружения): фактор VIII, фибронектин, Р-селектин, CD31, гликофорин, катепсин D, TNF α , Е-селектин, TGF β . Авторы обращают внимание на то, что наличие положительного и отрицательного контроля при исследованиях обязательно. Для каждого из названных маркеров приведена подробная шкала оценки экспрессии в соответствующих структурах от 0 до 3. По общему правилу, окраска 0 соответствует окраске отрицательного контроля, окраска 3 соответствует или более интенсивна, чем окраска положительного контроля. В заключение авторы отмечают, что результаты иммуногистохимических реакций на различные маркеры должны быть сопоставимы между собой, в соответствии с известным временем появления их в поврежденных тканях; исследование только одного антигена не представляет доказательной ценности.

К аналогичному выводу о необходимости «панельного» исследования нескольких маркеров и последующего сопоставления данных пришел M. Takamiya [165].

W. Grellner и B. Madea [91] в своем обзоре определяют перспективные направления для изучения иммуногистохимических маркеров прижизненности и давности образования повреждений, а также обращают внимание на факторы, которые влияют на скорость развития воспалительных процессов в поврежденных тканях, относя к таковым: вид, протяженность и выраженность повреждения, тип поврежденной ткани, температуру тела и состояние местного кровообращения, возраст, пол, состояние питания, наличие заболеваний, эндокринных и метаболических нарушений, воздействия экзогенных факторов.

R. Cecchi [66] так же отмечает, что общепатологический подход к исследованию раневого процесса не уделяет должного внимания фактору времени, поэтому не устраивает судебных патологов; судебно-медицинским экспертам необходимы собственные исследования в этой области. Исследование хронологии раневых процессов, по мнению автора, всегда должно учитывать размер и вид повреждения, характеристики поврежденных тканей, их реактивность, возраст пострадавшего, наличие сопутствующих заболеваний, прием лекарственных препаратов, поскольку все вышеперечисленное может влиять на ход и сроки развития реакций в заживающей ране.

Р.А. Peyron и соавт. в 2017 году провели предварительное исследование достаточно широкого списка веществ (TNF α , IL-1, IL-6, IL-10, IL-12p70 и IFN- α), определяя количественным методом их содержание в образцах кожи из краев прижизненных ран и контрольных неповрежденных образцах. По мнению авторов, наибольшие различия были установлены в содержании TNF α [118].

В последующей работе [70] спустя 5 лет авторы провели исследование еще большего количества цитокинов и белков (IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, TNF α), продолжив определять их количественно в материале от 24 трупов с прижизненными повреждениями по сравнению с контролем. Различия содержания в коже из области прижизненных повреждений и контрольном материале оказались наиболее достоверными у IL-8.

В 2019 году, явно запаздывая относительно общей тенденции поиска наиболее ранних ИГХ маркеров воспалительного процесса, А.А. Fouad и соавт.

сообщили об исследовании накопления CD14-окрашенных клеток в прижизненных повреждениях кожи [72]; в качестве наименьшей исследованной давности повреждений авторами был указан интервал до 12ч.

Исследование совершенно новых для судебной медицины потенциальных маркеров прижизненности повреждений было проведено в 2021 г. S. Deacu и соавт. Белок HMGB1 и взаимодействующий с ним рецептор RAGE относительно недавно вошли в патологоанатомическую практику как участники сигнальных каскадов многих процессов, в том числе воспалительных, репаративных и неопластических. В работе S. Deacu и соавт. была исследована экспрессия указанных маркеров в эпидермисе на материале прижизненных повреждений от 96 трупов. В качестве контрольных образцов использованы посмертные повреждения от 11 трупов (других!), а также интактная кожа живых добровольцев. Авторы отметили, что в кератиноцитах неповрежденной кожи имеется ядерная экспрессия HMGB1 (нормальная локализация белка), которая в области прижизненных повреждений сменяется цитоплазматической (выход белка через ядерную мембрану в цитоплазму). Для оценки указанных явлений авторами предложена полуколичественная шкала, которая была применена к результатам исследования всего объема прижизненно поврежденных и контрольных образцов. По заключению авторов, ими были показаны достоверные различия в экспрессии HMGB1 между прижизненными повреждениями различной давности, начиная с причиненных за единичные секунды до наступления смерти, посмертными повреждениями и интактным контролем, а экспрессия RAGE усиливалась в образцах с прижизненными повреждениями [97]. К сожалению, использование контрольного материала, полученного от других субъектов (не тех, у которых были взяты образцы прижизненных повреждений), не позволяет на данном этапе чрезмерно оптимистически относиться к полученным результатам, но, тем не менее, исследование указанной сигнальной цепи может оказаться перспективным в плане судебно-медицинской диагностики прижизненности.

Необходимо также отметить, что S. Deacu и соавт. были единственными, кто предположил гипотетическую возможность диагностики прижизненности

механических повреждений с использованием HMGB1; других работ аналогичного содержания мы не встретили.

Как видно из приведенного нами анализа литературных данных, посвященных вопросу иммуногистохимического исследования прижизненности и давности повреждений, публикации зарубежных авторов, имеющих приоритет в данной проблеме по сравнению с отечественными исследователями, представляются не слишком многочисленными, носят порой противоречивый характер и в большинстве случаев являются аналитическими обзорами литературы. Разработки же российских судебных медиков в этом плане еще более минималистичны.

Одна из ранних отечественных публикаций, посвященных возможностям иммуногистохимического исследования маркеров прижизненности и давности ран, принадлежит Г.М. Харину [8]. В 2001 году он представил краткий обзор иностранных исследований и данные собственных экспериментальных наблюдений за течением ожогов и ран у крыс. В заключение автор указал, что целесообразно разрабатывать одновременное применение набора маркеров различных клеточных элементов и тканевых структур (панели моно- и поликлональных антител); объективизировать получаемую при этом информацию следует путем использования различных приемов морфометрического анализа, позволяющих на иммуногистохимических препаратах определять точную локализацию, а также количественное соотношение клеточных элементов и тканевых структур в зоне повреждения. Высказано убеждение, что внедрение в экспертную практику методов иммуногистохимического анализа означает переход на более высокий уровень изучения посттравматической регенерации тканей, что должно способствовать разработке достоверных критериев оценки прижизненности и давности причинения повреждений.

Разработки А.М. Хромовой [42, 43], посвященные Р-селектину как маркеру ранней прижизненной реакции, мы уже проанализировали выше.

В сообщении М.Н. Меджидова и Д.В. Богомолова, сделанном в 2004 году, приведены данные иммуногистохимического исследования заживления

экспериментальных ран десны и показана роль иммуногистохимических методов в оценке давности раны по спектру коллагенов и иммуноглобулинов, содержанию фибрина и фибронектина, а также маркеров Т-лимфоцитов-хелперов и макрофагов [19].

Использование иммуногистохимических методов для дифференцировки различных классов лимфоцитов при исследовании повреждений селезенки предложено в 2005 году В.П. Новоселовым, что, по его мнению, позволило более полно судить о динамике развития воспалительной реакции в зоне повреждения. Автором не приведено каких-либо практических рекомендаций по уточнению давности повреждений с помощью этого метода [22].

В 2014 году основные данные из опубликованных наблюдений были кратко обобщены в обзоре Е.И. Сурковой, посвященном основным исследованным маркерам давности механических повреждений [34].

В ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» в 2014 году опубликована статья Д.В. Богомолова и соавт., посвященная перспективам использования методов иммуногистохимии для установления прижизненности и давности механических повреждений. По заключению авторов, скорейшее внедрение методов ИГХ в науку и практику судебно-медицинской экспертизы позволит повысить аргументацию ответов на многие экспертные вопросы [26].

Продолжая свои исследования, в 2016–2017 г.г. Д.В. Богомолов и соавт. опубликовали статьи, посвященные иммуногистохимической диагностике прижизненности странгуляционной механической асфиксии, в которых показали перспективность использования фибриногена и бесперспективность использования фибронектина в качестве маркера прижизненности странгуляции [21, 32].

В статье от 2018 года приведены результаты исследования странгуляционных борозд и ткани легких, проведенного с более широким спектром маркеров (общий цитокератин, фибриноген, иммуноглобулин λ , фибронектин и CD-117). В дерме и подкожной основе валиков прижизненных странгуляционных борозд наблюдалась достоверно более высокая экспрессия фибриногена по

сравнению с посмертными бороздами и участками контрольной интактной кожи. Иммуноглобулин λ был несколько больше представлен в прижизненных бороздах, но различия были меньшими, чем с фибриногеном. У лиц, скончавшихся от механической асфиксии, в зонах мелкоочагового отека легких фибриноген не обнаруживался. Экспрессия фибронектина была слабой и локализовалась только в венах подкожной основы. В случаях странгуляционной асфиксии, удавления руками и утоплений антиген CD-117 имел значительную очаговую экспрессию в клетках межальвеолярных перегородок, доказывая дифференцирующую роль маркера острой альвеолярной гипоксии. По заключению авторов, полученные данные свидетельствуют о новых маркерах прижизненности странгуляционной механической асфиксии, использование которых должно способствовать совершенствованию диагностики данного вида смерти. В перспективе возможна разработка усовершенствованного алгоритма диагностики механической асфиксии с использованием иммуногистохимических методов для установления вида, темпа и ее прижизненности [23].

Подводя итог анализу опубликованных в специальной литературе результатов исследований, можно сказать, что к настоящему времени проблема иммуногистохимической оценки давности повреждений находится на более близком к решению этапе, чем проблема диагностики прижизненности. Изучение динамики появления различных маркеров в ране уже привело некоторых исследователей к мысли о создании систем, позволяющих устанавливать давность повреждений на основании совокупности положительных и отрицательных реакций на те или иные вещества с известными сроками их появления в поврежденных тканях; применение таких иммуногистохимических «панелей» должно в ближайшем будущем послужить инструментом уточнения результатов, получаемых методами классической гистологии на основании изучения клеточных реакций.

Вопрос диагностики прижизненности повреждений остается практически таким же острым, как и до использования иммуногистохимических методов, пока не найдены надежные маркеры ранних прижизненных реакций. Как и в

классической гистологии, основные трудности связаны с явлением переживаемости тканей и способности их имитировать некоторые «прижизненные» реакции уже после смерти организма в целом, то есть после остановки кровообращения. Явление переживаемости, хорошо известное специалистам в области классической судебно-медицинской гистологии и вносящее коррективы в трактовку наблюдаемых ранних реакций (перифокальных кровоизлияний и сосудистых реакций), таким же образом осложняет интерпретацию результатов иммуногистохимических исследований, всегда ставя перед специалистами вопрос – а не может ли выбранный маркер экспрессироваться посмертно? Поэтому ни один из авторов изученных нами исследований пока не дал четко аргументированных практических рекомендаций по иммуногистохимической диагностике прижизненности травмы.

В Таблице 1 нами обобщены сведения из проанализированных источников об основных исследованных иммуногистохимических маркерах с временем начала экспрессии в поврежденной коже не более 30 минут [35].

Наиболее перспективными для собственных исследований нам представляются TGF β 1 и AQP3 как выявляемые наиболее рано и к настоящему времени не показавшие непригодных результатов в контрольных образцах; также заслуживает внимания Р-селектин, несмотря на наличие ряда противоречивых отзывов о его ненадежности.

Несмотря на единичный характер работы, посвященной HMGB1, описанные в ней изменения экспрессии представляются нам достаточно закономерно обоснованными и представляющими интерес для включения данного маркера в эксперимент.

Кроме того, интересным методом может оказаться морфометрия плотности тучных клеток с использованием их иммуногистохимической детекции и исследование феномена их дегрануляции.

Таблица 1 – ИГХ маркеры ранней реакции на повреждение
(по литературным данным)

№ п/п	Название маркера	Время начала положительной реакции	Источники	Данные о ненадежности
1	TGFβ1	первые минуты	[90, 149, 155]	
2	Фактор VIII	первые минуты	[155]	Да
3	AQP3	первые минуты	[82, 83]	
4	HMGB1/RAGE	первые минуты	[97]	
5	P-селектин	3 минуты	[42, 65, 80, 130, 155]	Да
6	TGFα	10 минут	[90, 149]	
7	IL-1b	15 минут	[66, 88, 149]	
8	TNFα	15 минут	[66, 88, 149, 155]	
9	IL-6	20 минут	[66, 88, 149]	
10	Фибронектин	до 30 минут	[65, 105, 155]	Да
11	Катепсин D	до 30 минут	[130, 155]	
12	Фибрин D- димер	до 30 минут	[66, 130]	
13	Лейкотриен B4	до 30 минут	[66, 130]	
14	Увеличение плотности тучных клеток	секунды	[106]	
15	Дегрануляция тучных клеток	первые минуты	[84]	Да

Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материал исследования и его объем

В качестве материала для диссертационного исследования в серийном эксперименте по применению ИГХ метода для диагностики прижизненности нами 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 от тех же трупов получали из областей тела, симметричных прижизненным повреждениям. Также в симметричных областях наносили экспериментальные посмертные повреждения путем удара бойком секционного молотка [16].

Фрагменты кожи с прижизненными кровоподтеками, а также контрольные (без повреждений и в проекции посмертно причиненных повреждений [далее – посмертные повреждения]) от каждого изучаемого субъекта получали в ходе судебно-медицинского исследования трупа в течение первых суток после наступления смерти, при условии отсутствия аутолитических и гнилостных процессов. Фрагменты кожи (всего 120) изымали размером около 2х1 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 2).

Таблица 2 – 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

Кроме этого, в рамках диссертационного исследования нами 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.

На коже передней брюшной стенки 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.

2.2. Методы исследования

В работе были применены следующие методы исследования:

- 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

2.2.1. Гистологическое исследование образцов, окрашенных гематоксилином и эозином, толуидиновым синим / азуром-II и эозином

Полученные в ходе судебно-медицинского исследования трупа 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. Для заливки использовали парафин с известным сроком годности и тщательно контролировали, чтобы температура парафина была не выше 60°C.

С парафиновых блоков на ротационном микротоме Leica RM2235 изготовили 166 срезов толщиной 2 μm , 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 толуидиновым синим, оценивали наличие тучных клеток и коэффициент их дегрануляции.

2.2.2. Иммуногистохимическое исследование

В медицинском обороте существует два вида первичных (специфических) антител, применяемых для ИГХ исследований:

- для диагностических целей, то есть с предварительно разработанным и указанным изготовителем протоколом их применения;
- для научных целей (обычно редкие виды) – без разработанного протокола, который в таком случае необходимо разрабатывать самостоятельно.

Антитела, намеченные нами для исследований на предмет пригодности в целях диагностики прижизненности, крайне редко применяются в повседневной патологоанатомической практике, поэтому в нашем распоряжении оказались 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).

Также имелись системы визуализации Novolink Polymer Detection Systems и Ventana ultraView Universal DAB Detection Kit.

Таким образом, прежде чем использовать данные антитела для проведения экспериментов, необходимо было разработать протокол их применения. В этих целях нами использован контрольный материал, в котором заведомо содержится искомый антиген. В качестве положительного контроля для антител к TGF β 1 были взяты образцы последа (антиген должен быть экспрессирован в синцитиальных узелках и децидуальных клетках), и протоковой карциномы молочной железы. Для антител к CD62p в качестве положительного контроля был взят фрагмент миндалина (согласно рекомендациям изготовителя), а для AQP3 – образец неповрежденной кожи, в эпидермисе которой этот антиген экспрессируется в кератиноцитах. Отрицательными контролями для выявления чувствительности и специфичности антител послужили образцы положительных контролей без нанесения первичных антител, а также структуры данных образцов, не содержащие указанные антигены.

Контролем для HMGB1 (как положительным, так и отрицательным) послужили образцы неповрежденной кожи, в эпидермисе которых регистрировали нормальную ядерную экспрессию маркера при отсутствии цитоплазматической экспрессии.

Для получения адекватного результата реакции с первичными антителами важна степень их разведения, время и температура инкубации. Разведение антител обычно зависит от свойств антител, условий демаскировки, системы визуализации и pH буферного раствора. Оптимальное разведение – самое большое разведение, при котором наблюдается максимальное специфическое окрашивание с наименьшей фоновой окраской при определенных условиях исследования. Время инкубации зависит от тех же параметров, чаще всего оно составляет от 10 до 30 минут, если инкубация происходит при комнатной температуре; некоторые протоколы предписывают температуру инкубации 37°C во влажной камере несколько минут либо 40°C в холодильнике несколько часов.

В результате экспериментов нами было выявлено, что планируемое для антител TGFβ1, CD62p, AQP3 фирмой-изготовителем разведение антител 1:1000 является слишком большим, а время инкубации 30–40 минут – слишком малым. Важным фактором для получения специфичного результата реакции оказалось соответствие антител системе визуализации. Система визуализации Novolink показала с антителами TGFβ1, CD62p, AQP3 неадекватный результат – было выявлено сильное фоновое окрашивание, удалить которое с помощью подбора разведения антител и pH буферных растворов не представилось возможным. Применение системы Ventana позволило получить «чистое» специфическое окрашивание в положительных контролях с антителами TGFβ1, CD62p, AQP3.

В случае с HMGB1 ситуация носила обратный характер: при использовании системы Ventana возникали артефакты и искажения окраски в виде скоплений хромогена по типу «клякс», неокрашенных «пустых» ядер кератиноцитов. Использование системы визуализации Novolink позволило получить «чистый» результат контроля с равномерно окрашенными ядрами (нормальная ядерная экспрессия).

Таким образом, нами был определен следующий протокол исследования: антитела TGFβ1, AQP3 данного производителя необходимо использовать в оптимальном разведении 1:200, время инкубации составляло 2 часа при комнатной температуре, pH буфера 6. Для антител CD62p время инкубации и pH буфера оказалось аналогичным, а оптимальное разведение составляло 1:50. При этом в положительном контроле антиген TGFβ1 четко экспрессировался в синцитиальных узелках и децидуальных клетках в области базальной пластинки и в плодных оболочках, антиген CD62p экспрессировался в эндотелии мелких сосудов миндалины, антиген AQP3 показывал выраженную экспрессию в кератиноцитах контрольного образца кожи; при этом в других структурах, а также в образцах без нанесения первичных антител экспрессия указанных антигенов отсутствовала.

Антитело HMGB1 использовали в разведении 1:500, время инкубации составляло 2 часа при комнатной температуре, pH буфера 6.

Имевшиеся в нашем распоряжении антитела к триптазе тучных клеток Mast Cell Tryptase (10D11, Bond) были предназначены изготовителем для диагностических целей, то есть поставлялись с установленным протоколом применения, поэтому нами разработка протокола не проводилась. В качестве системы визуализации в данном случае была применена система Novolink.

С парафиновых блоков, полученных в результате пробоподготовки материала от трех исследуемых групп (экспериментальная и две контрольных), на ротационном микротоме Leica RM2235 изготовили срезы толщиной 3µm, которые вводились в ИГХ реакцию с тем или иным изучаемым антителом. Количество срезов, полученных по каждой группе в результате реакции с тем или иным антителом указано в Таблице 2 (стр. 47).

Микроскопическое исследование в светлом поле проводили на микроскопе Leica DM2500 (окуляры 10х/23мм, объективы 5х, 10х, 20х, 40х, 63х) в проходящем свете. Исследовали следующие параметры:

- 1) выраженность экспрессии TGFβ1 в кератиноцитах эпидермиса на всем его протяжении в препарате, а также в подлежащей дерме, во всех группах образцов;
- 2) выраженность экспрессии CD62p в эндотелии мелких сосудов дермы на всем ее протяжении в препарате, во всех группах образцов;
- 3) выраженность экспрессии AQP3 в кератиноцитах эпидермиса на всем его протяжении в препарате, во всех группах образцов;
- 4) выраженность ядерной и цитоплазматической (по отдельности) экспрессии HMGB1 в кератиноцитах эпидермиса на всем его протяжении в препарате, во всех группах образцов;
- 5) плотность дермальных тучных клеток, маркированных ИГХ антителами к триптазе.

2.2.3. Морфометрическое исследование

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 $\sim 0,95 \text{ мм}^2$.

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 [134]. Для работы программы выбирали на сканированном изображении участок микропрепарата на всю толщу дермы (от базального слоя эпидермиса до подкожной клетчатки) общей площадью около 2 мм^2 . Для корректной работы перед детекцией клеток задавали исходные значения цветовых каналов для положительной ИГХ окраски (DAB) для каждого микропрепарата. Выполняли детекцию клеток на выбранном участке дермы и подбирали наиболее точное значение «отсечки» позитивного/негативного окрашивания, ориентируясь на результаты распознавания в изображении. После проверки правильности распознавания позитивно окрашенных тучных клеток считывали выдаваемое программой значение плотности тучных клеток на выбранном участке (Рисунки 1,2) [16].

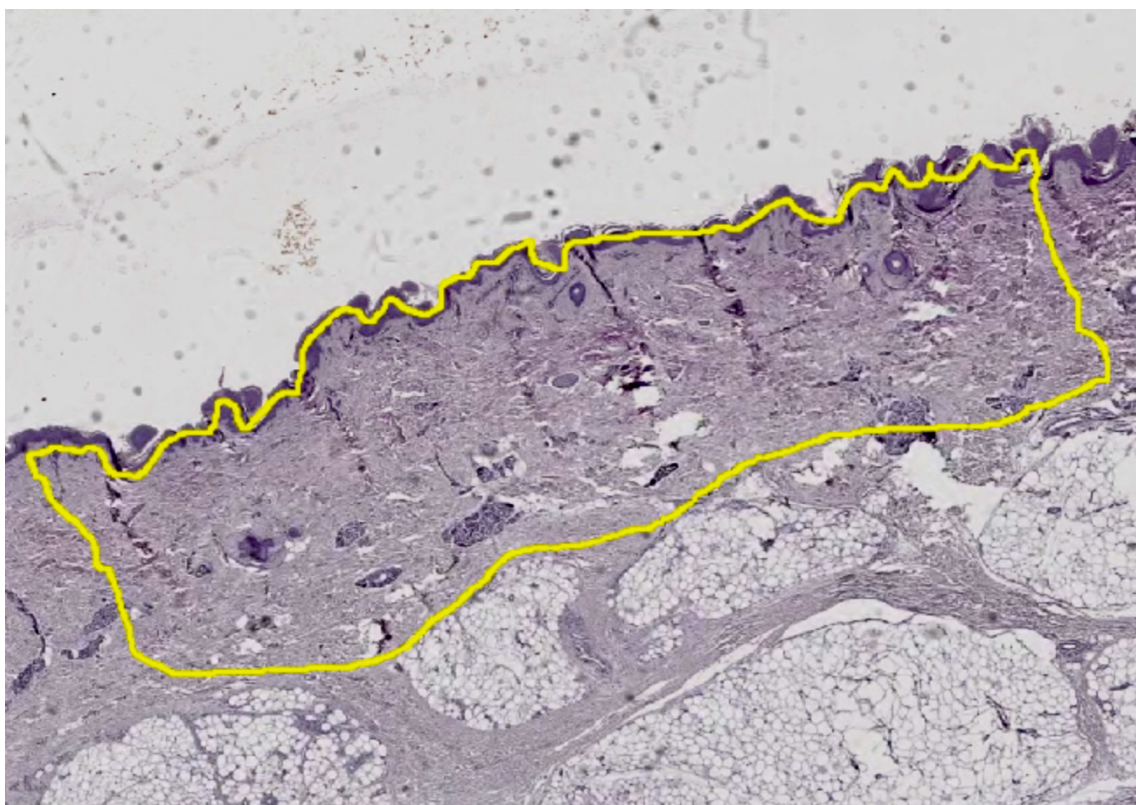


Рисунок 1 – Вид участка кожи для автоматического распознавания в программе QuPath; желтая линия – разметка площади дермы, на которой предполагается подсчет тучных клеток.

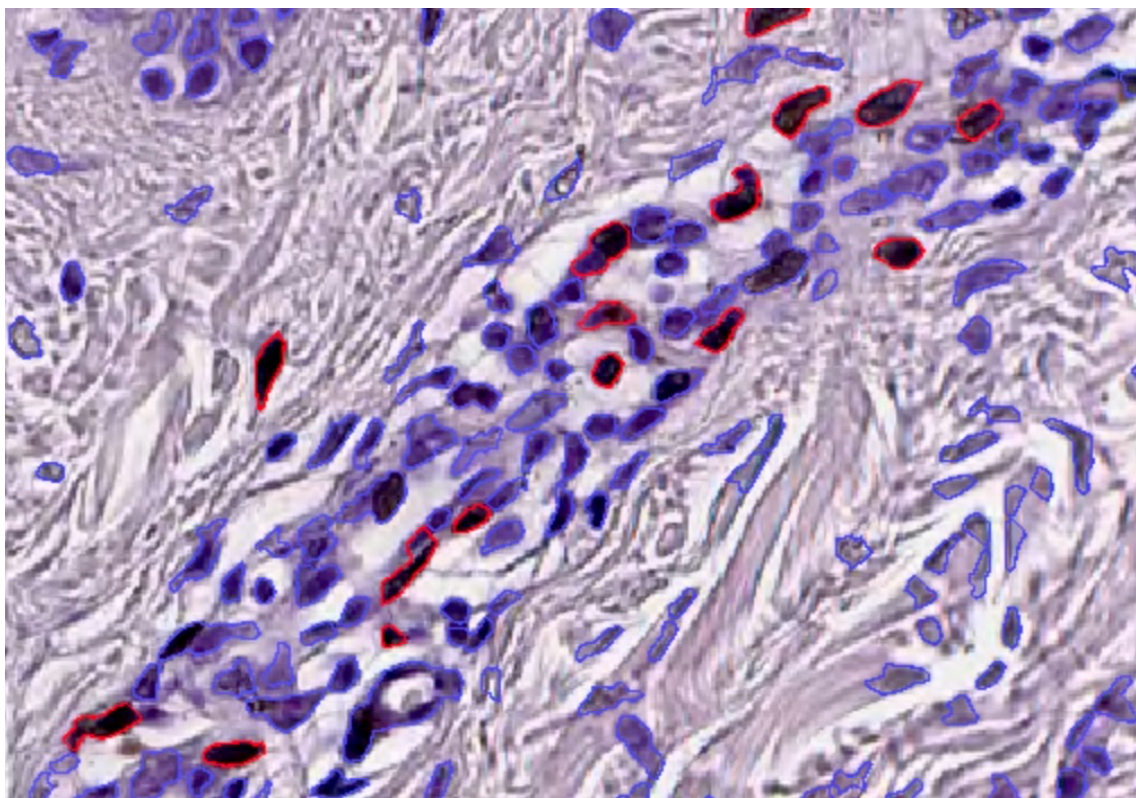


Рисунок 2 – Результат автоматического распознавания тучных клеток в программе QuPath.

2.2.4. Статистическое исследование

Статистическую обработку результатов исследования экспрессии TGF β 1 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 TGF β 1, 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.

Глава 3. ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ С АНТИТЕЛАМИ К TGFβ1, CD62P, AQP3 И HMGB1

3.1. Предварительная оценка прижизненности повреждений кожи в срезах, окрашенных гематоксилином и эозином

Перед тем, как применять иммуногистохимическую реакцию с выбранными для исследования антителами, мы посчитали необходимым оценить весь полученный материал с помощью классического гистологического метода с окраской гематоксилином и эозином.

Морфологических признаков каких-либо воспалительных заболеваний кожи (продуктивных клеточных инфильтратов, гранулем и т.п.), которые могли бы повлиять на результаты и требовали бы исключения образцов из эксперимента, в представленном материале обнаружено не было.

Ряд признаков, которые описаны в литературе и до сих пор считаются критериями прижизненности, таковыми на самом деле не являются. Например, появление фибрина в зоне кровоизлияния, которое начинается почти сразу после травмы, может наблюдаться и посмертно. В ряде исследований в качестве прижизненного феномена описаны внутрисосудистая агрегация тромбоцитов и образование микротромбов по краю раны, но агрегаты тромбоцитов также могут возникать и на ранней посмертной стадии, к тому же их зачастую бывает сложно диагностировать. Также было доказано, что метакромазия, видимая при окраске толуидиновым синим, является артефактом, а не признаком прижизненности. Отложение внеклеточных мукополисахаридов, положительно окрашивающихся ШИК, не имеет диагностического значения для определения прижизненности, поскольку оно также возможно и посмертно [115]. Вследствие этого, в исследуемых срезах нами оценивались только наличие или отсутствие кровоизлияния, его выраженность и состав, состояние сосудов, наличие отека ткани.

При исследовании полученных гистологических микропрепаратов кожи из области прижизненных повреждений (группа 1) во всех 40 случаях в дерме и

подкожной жировой клетчатке выявлялись очаговые кровоизлияния, 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 (Рисунок 3).

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 (Рисунок 4).

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.

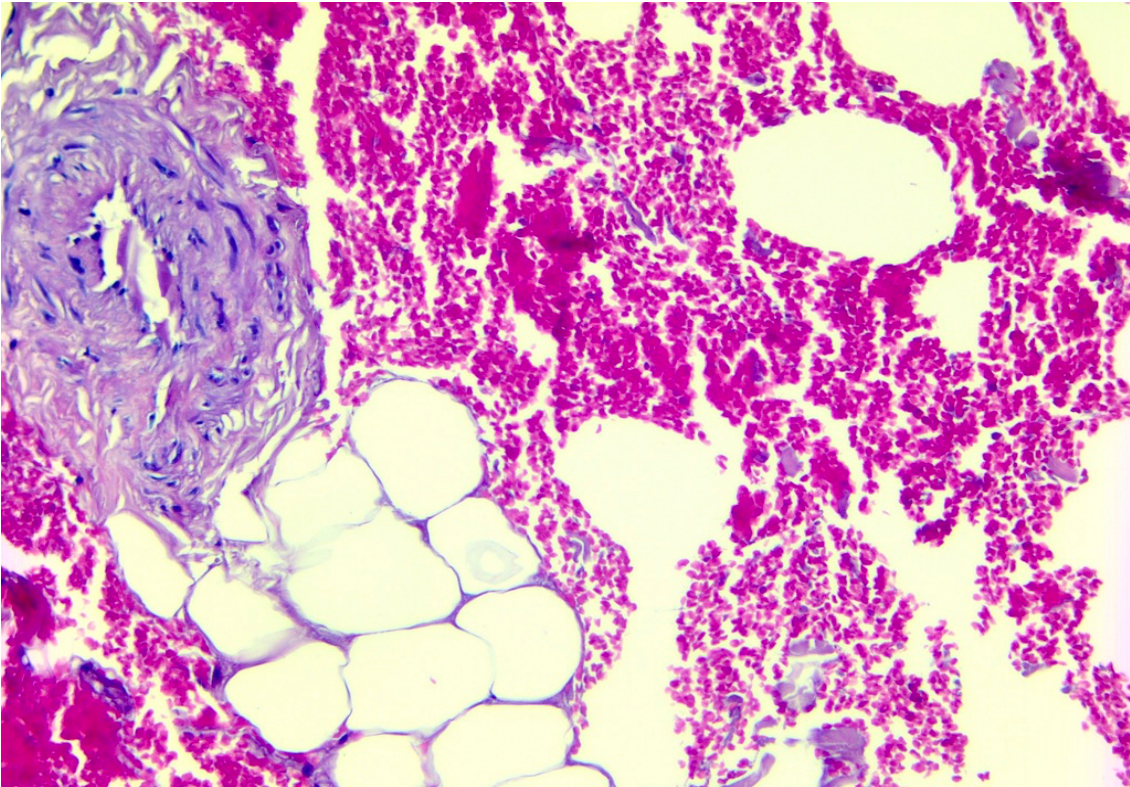


Рисунок 3 – Прижизненное кровоизлияние; спазм мелкой артерии. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200

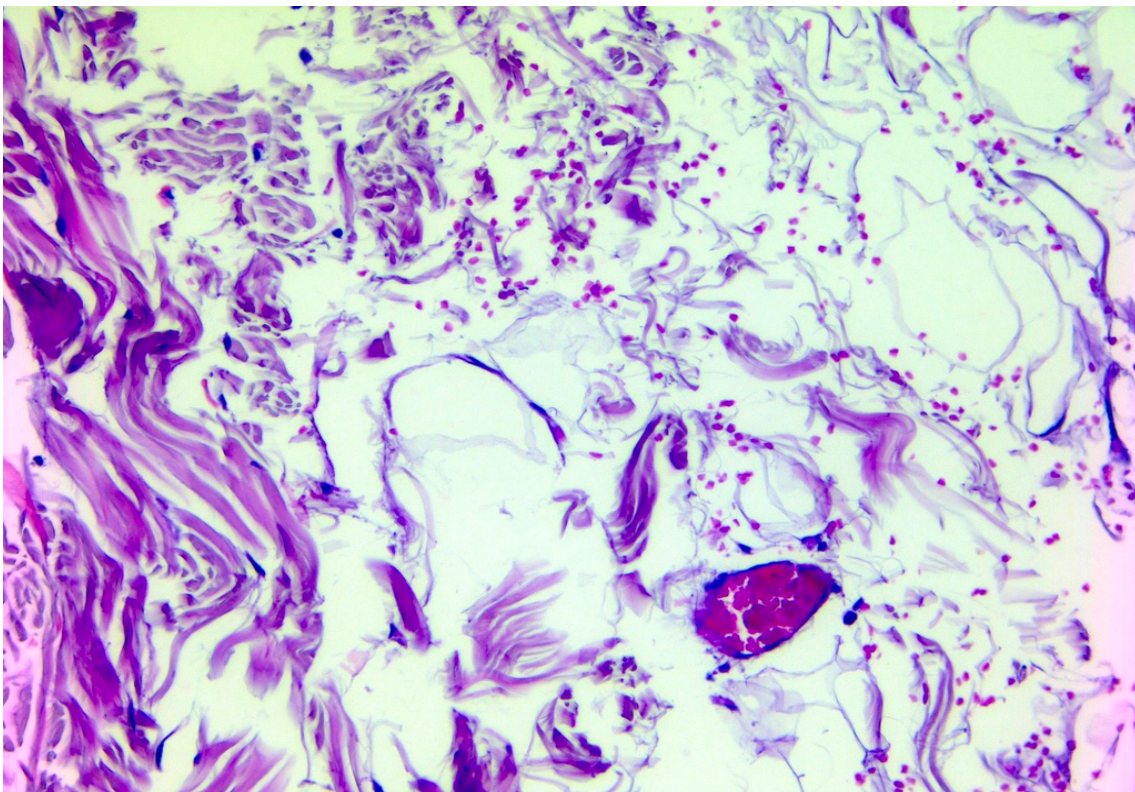


Рисунок 4 – Посмертное кровоизлияние; перифокально полнокровие паретичной венулы. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200

3.2. Характеристика иммуногистохимической реакции TGF β 1

3.2.1. Результаты оценки и научное обоснование экспрессии TGF β 1 в исследуемых образцах

Выраженность экспрессии TGF β 1 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 TGF β 1 в эпидермисе (Таблица 3, Рисунки 5–8).

Таблица 3 – 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!)

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.

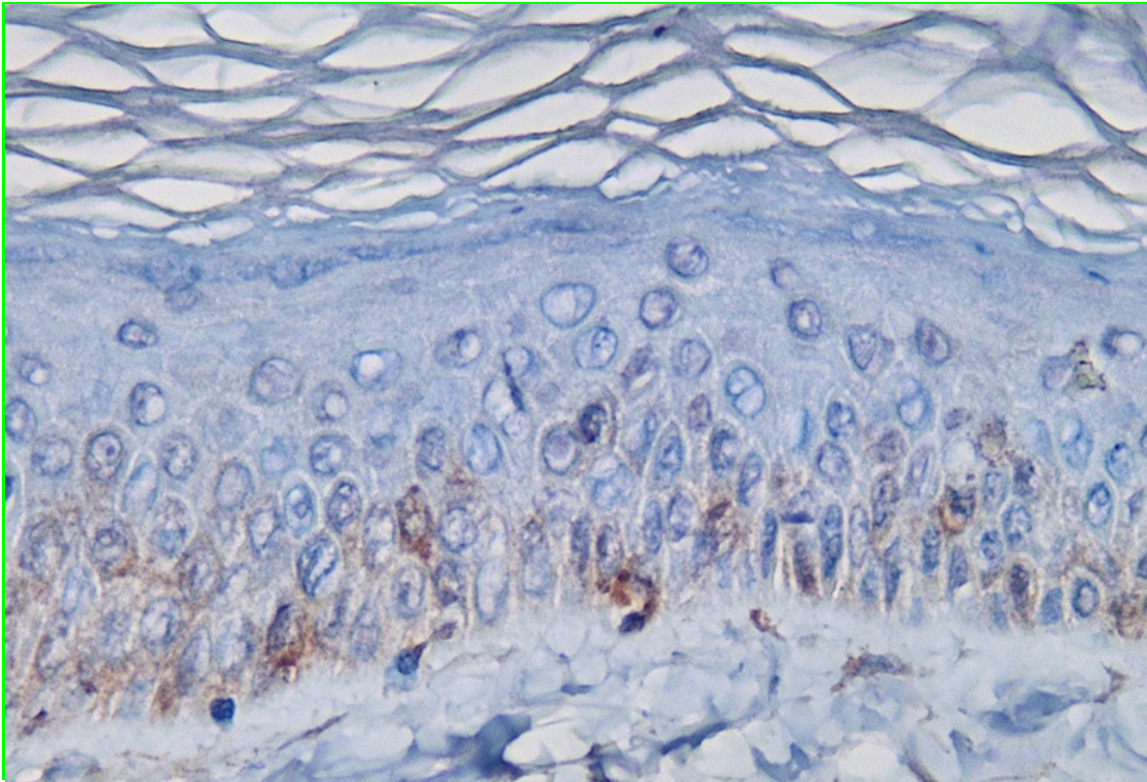


Рисунок 5 – Экспрессия TGFβ1 в эпидермисе 1 балл. ИГХ с антителами к TGFβ1.
Ув. 400

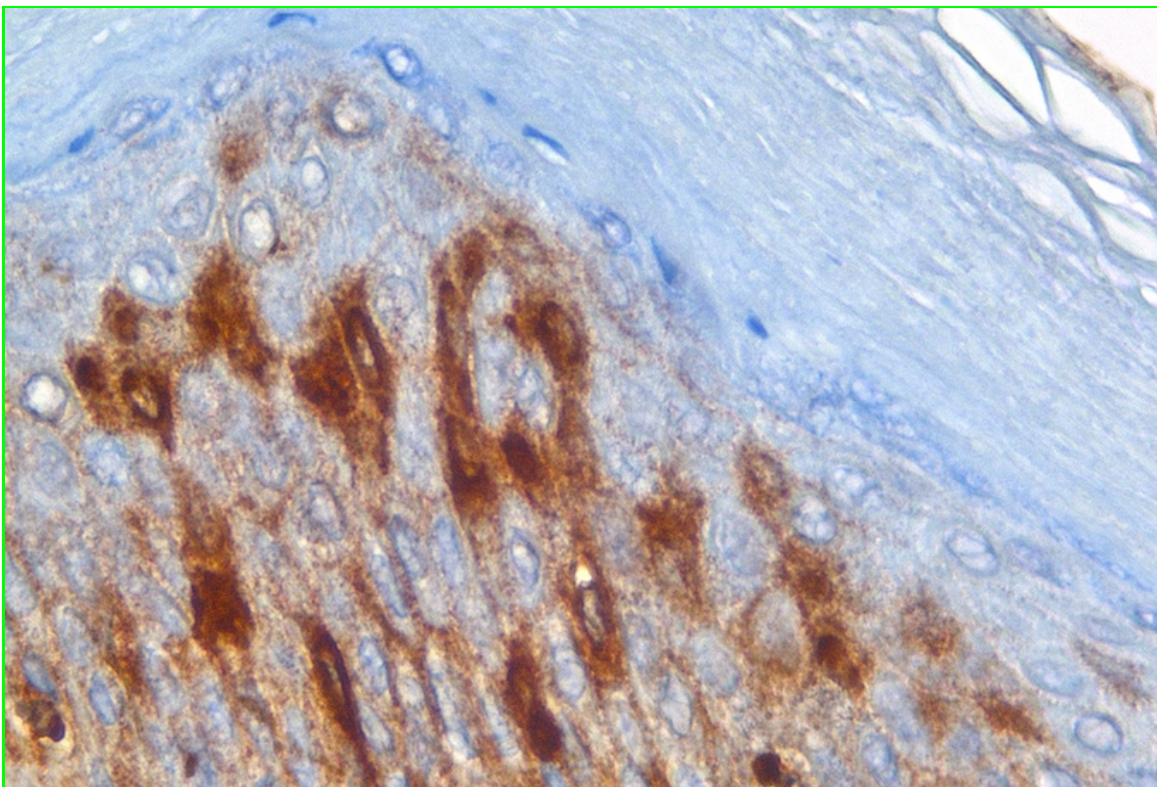


Рисунок 6 – Экспрессия TGFβ1 в эпидермисе 2 балла. ИГХ с антителами к TGFβ1.
Ув. 400

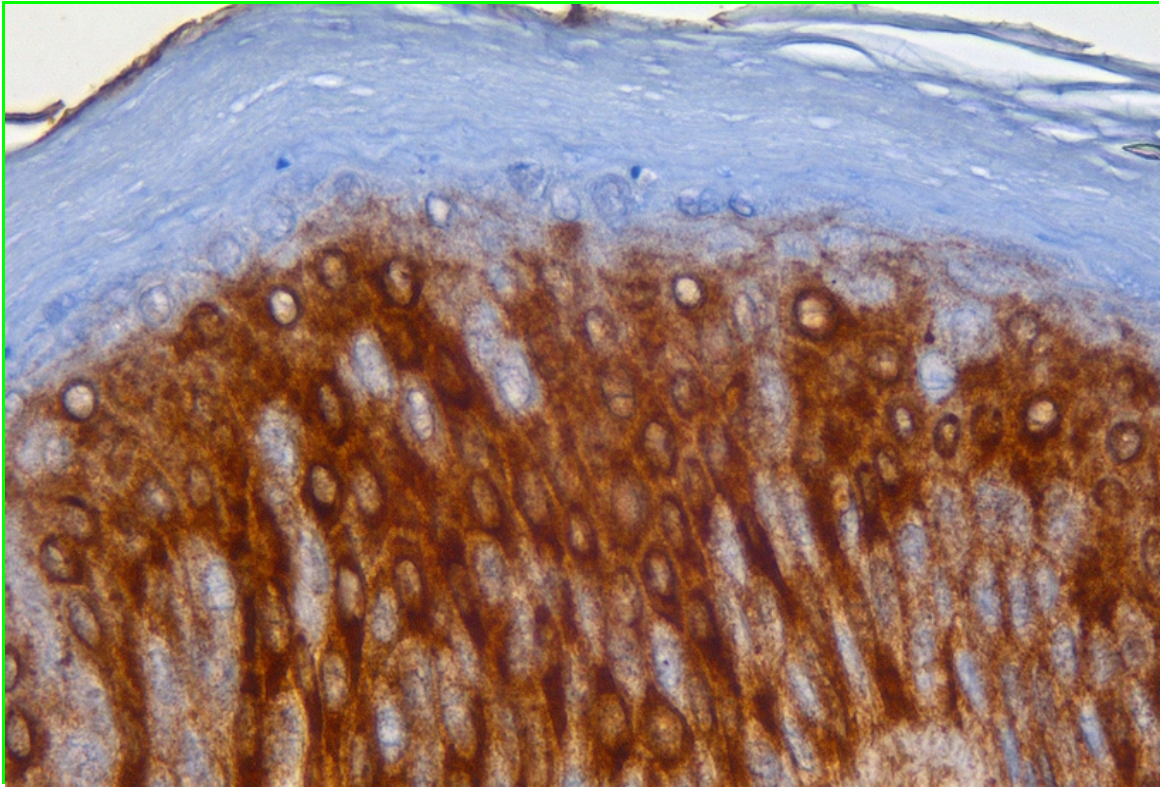


Рисунок 7 – Экспрессия TGF β 1 в эпидермисе 3 балла. ИГХ с антителами к TGF β 1.
Ув. 400

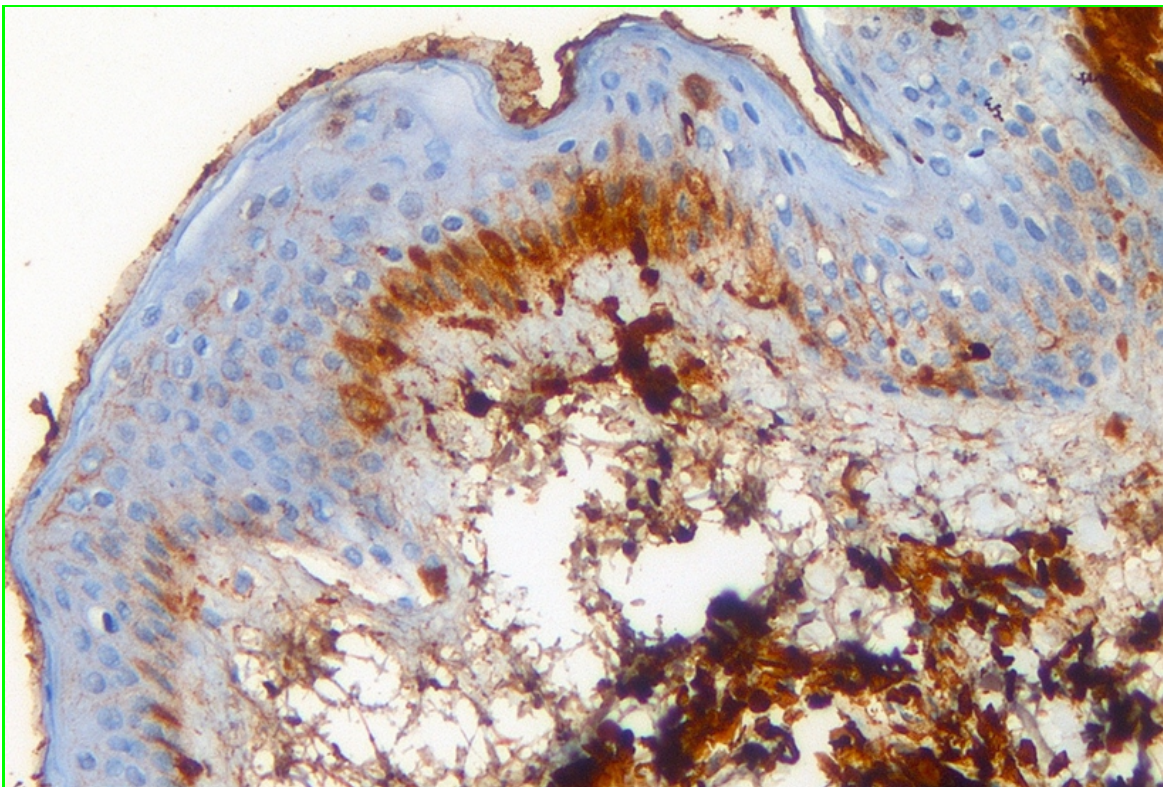


Рисунок 8 – Экспрессия TGF β 1 в эпидермисе 4 балла. ИГХ с антителами к TGF β 1.
Ув. 200

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 4.

Таблица 4 – 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 9).

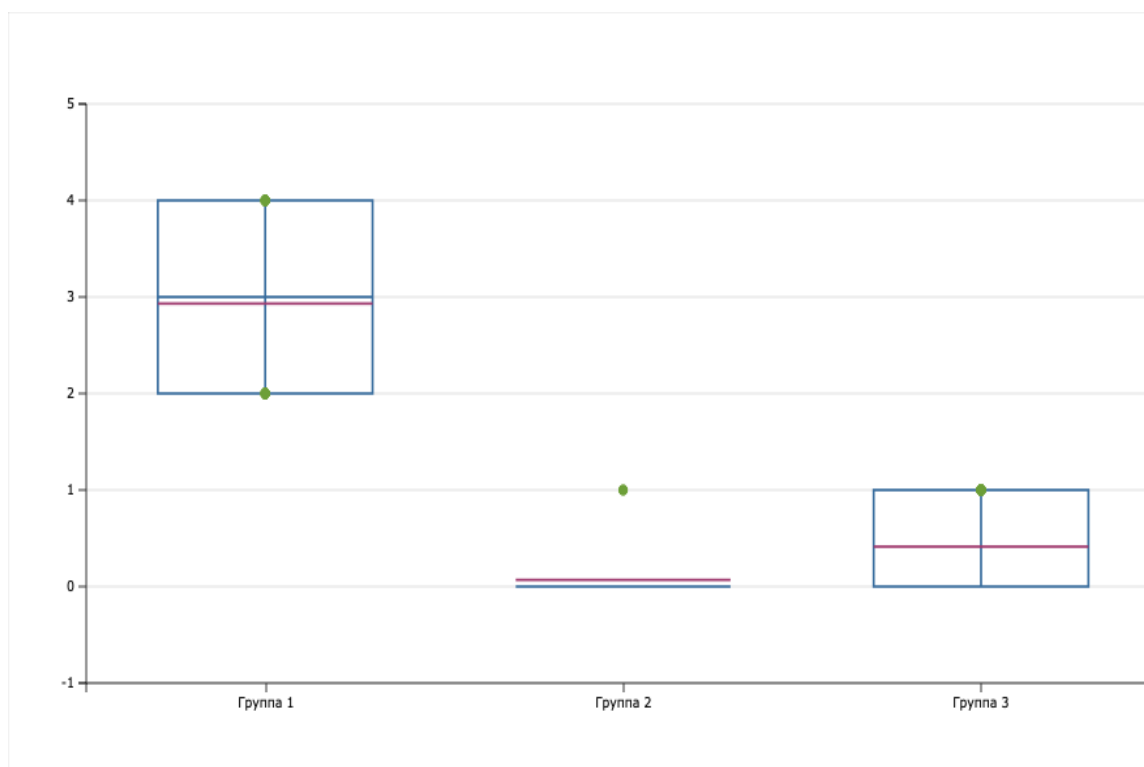


Рисунок 9 – Экспрессия TGF β 1 в образцах 1, 2, 3 групп, баллы, n=29, $p < 10^{-5}$

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 преобладающим. 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 LTBP (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 LTBP «маскируют» эпитопы TGF β 1, и его неактивная 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 плазмина и тромбина, преимущественно при повреждении экстрацеллюлярного матрикса. [110, 152]. В острых воспалительно-репаративных процессах синтез и активность TGF β 1 прекращаются после восстановления поврежденной ткани, в хронических – наблюдается устойчивая продукция TGF β 1, что приводит к прогрессирующему фиброзу, образованию гипертрофированных и келоидных рубцов. TGF β 1 обладает провоспалительными свойствами, в частности, служит хемоаттрактантом для последующей миграции в рану лейкоцитов, макрофагов и фибробластов, стимулирует высвобождение некоторых интерлейкинов. В процессе заживления повреждений TGF β 1 выступает как мощный индуктор синтеза коллагена типа I, II, III, V, VI, X и фибронектина, обладает профиброгенным действием посредством стимуляции мезенхимальных клеток и фибробластов [152].

TGF β 1 является многофункциональным цитокином, оказывающим значительное влияние на ряд физиологических и патологических процессов, мощным ингибитором пролиферации клеток и индуктором апоптоза, контролирующим баланс между репликацией и гибелью клеток. Участие TGF β 1 проявляется в регенеративных процессах (заживление повреждений мягких тканей,

органов и костей), неопластических процессах, развитии фиброза. Кроме того, TGF β 1 участвует в органогенезе эмбриона, кроветворении, хондро-, адипо- и ангиогенезе, формировании кожи. Действие TGF β 1 зависит от типа клетки-мишени; так, он стимулирует пролиферацию некоторых клеток мезенхимального происхождения (звездчатых клеток печени, фибро- и остеобластов, шванновских клеток, ингибирует рост эпителиальных, эндотелиальных, гемопоэтических (включая мегакариоциты) клеток, кератиноцитов, гепатоцитов [147, 152, 167], подавляет активность Т- и В-лимфоцитов [138].

В патологоанатомических исследованиях показана роль TGF β 1 в процессах фиброза при ряде хронических заболеваний. При панкреатитах экспрессия TGF β 1 в поджелудочной железе (в особенности, в клетках островкового аппарата) способствует прогрессированию фиброза [9]. Аналогичным является воздействие TGF β 1 на структуры печени при аутоиммунных заболеваниях, в частности, аутоиммунном гепатите и первичном билиарном циррозе [27]. Экспрессия TGF β 1 достоверно падает в эпителии желудка и двенадцатиперстной кишки при развитии гастритов и язвенных поражений, ассоциированных с *Helicobacter pylori* [48]; увеличение экспрессии TGF β 1 в эпителии отмечено при воспалительных заболеваниях кишечника, сопровождающихся фиброзом [132]. Резистентность к сигналам TGF β 1 рассматривается в качестве одного из факторов канцерогенеза при раке желудка и толстой кишки [153]. Исследуется роль TGF β 1 в канцерогенезе опухолей кожи [69].

В заживающей ране TGF β 1 вырабатывается лейкоцитами, макрофагами, фибробластами и кератиноцитами и воздействует на эти клетки, стимулируя инфильтрацию воспалительных клеток, фиброплазию, синтез и распад белков матрикса и ангиогенез [139]. В литературе описано, что 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 перицеллюлярном 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 [74, 111, 119, 162, 163].

Мы в нашей работе исследовали 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, плазмин, образующийся из плазминогена, который может катализировать высвобождение TGF β 1 из комплекса; в свою очередь активированный TGF β 1 вызывает активацию плазмينا и таким образом процесс закольцовывается [46]. 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 (Рисунок 10).

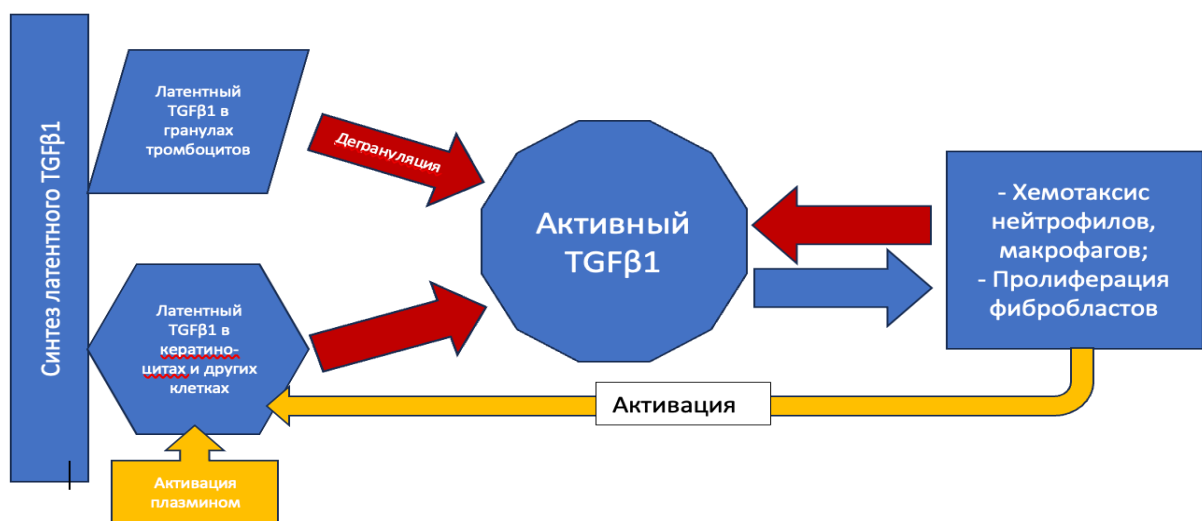


Рисунок 10 – Схема двойного пути активации TGF β 1

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 [15, 36].

3.2.2. Метод определения прижизненности повреждений кожи с помощью антител к TGF β 1

На основании приведенных выше результатов ИГХ исследования экспрессии TGF β 1, показавших статистически достоверные различия в группе прижизненных повреждений по сравнению с группами посмертно причиненных повреждений и интактных образцов, для практических целей нами был разработан метод ИГХ диагностики прижизненности повреждений кожи тупыми твердыми предметами [38].

Исследование эпидермиса и дермы на всем протяжении микропрепаратов из области повреждений и контрольных образцов, окрашенных антителами к TGF β 1, проводят в светлом поле, при этом для оценки экспрессии используют полуколичественную шкалу (см. Таблицу 3).

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.

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

3.3. Характеристика иммуногистохимической реакции Р-селектина (CD62p)

Результаты, полученные при ИГХ исследовании экспериментального материала, 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 (Таблица 5, Рисунок 11).

Таблица 5 – Результаты исследования экспрессии CD62p

Экспрессия	Прижизненные, группа 1, n=12	Контроль, группа 2, n=12	Посмертные, группа 3, n=12
Положит.	9	7	10
Отрицат.	3	5	2

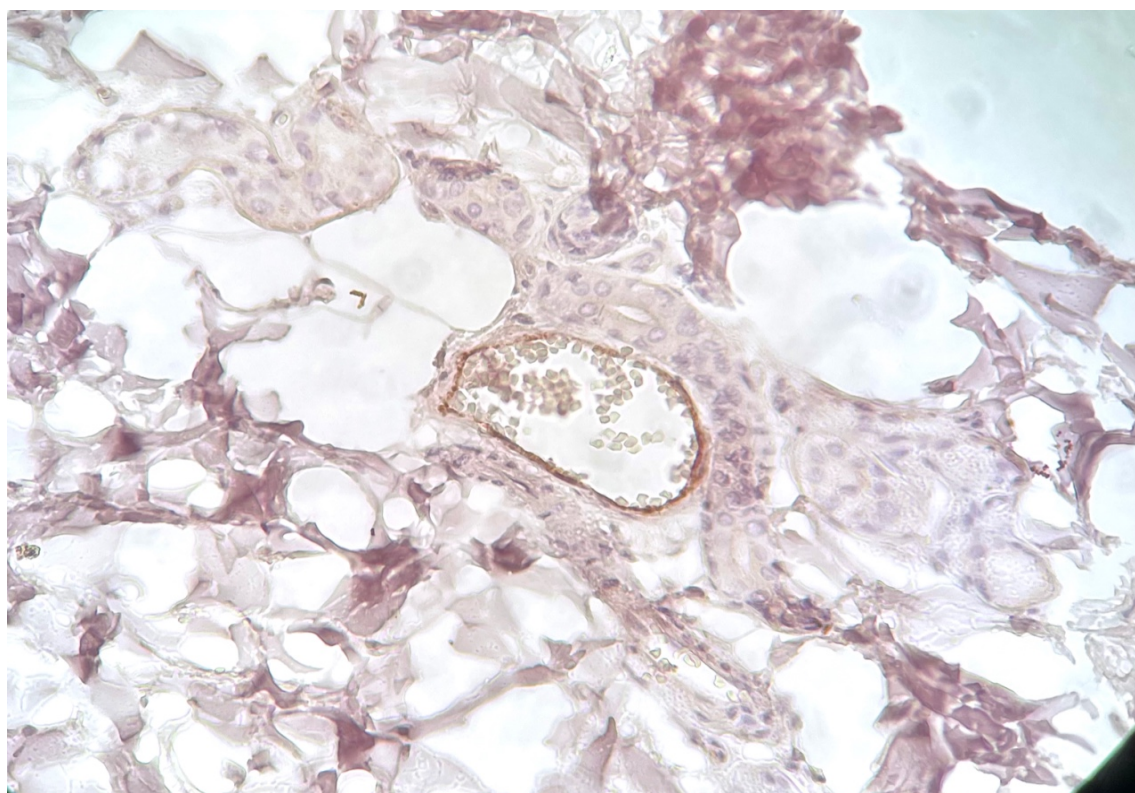


Рисунок 11 – Экспрессия CD62p в эндотелии сосуда рядом с мелкоочаговым кровоизлиянием во фрагменте кожи с посмертно причиненным повреждением. ИГХ с антителами к CD62p. Ув. 200

Семейство селектинов состоит из трех одноцепочечных белковых трансмембранных рецепторов, которые обеспечивают первоначальную адгезию лейкоцитов на поверхности эндотелиальных клеток и их дальнейшее движение, которое обеспечивается постоянным образованием и разрушением связей между селектинами и их лигандами. Названия селектинов отражают место их экспрессии: Е-селектин (endothelial – эндотелиальный, CD62e), Р-селектин (platelet – тромбоцитарный, CD62p), L-селектин (leukocyte – лейкоцитарный, CD62l).

Основным и наиболее изученным лигандом Р-селектина является PSGL-1 (гликопротеиновый лиганд Р-селектина – 1), который находится в клеточной мембране нейтрофильных лейкоцитов вокруг кончиков их микроворсинок; в условиях воспалительной реакции PSGL-1 может связываться со всеми тремя селектинами [143].

Согласно литературным данным, Р-селектин находится в а-гранулах тромбоцитов и в тельцах Вейбеля-Паладе эндотелиальных клеток. При активации стимулирующими факторами (такими, как гистамин, эпинефрин или тромбин), гранулы сливаются с клеточной мембраной, и Р-селектин оказывается на поверхности клетки [157]. В то время как взаимодействие PSGL-1 лейкоцитов с Р-селектином на поверхности эндотелия обеспечивает краевое стояние лейкоцитов и лейкодиapedез, экспрессия Р-селектина на поверхности активированных тромбоцитов приводит к адгезии лейкоцитов в образующихся тромбах.

Влияние Р-селектина на развитие клеточных воспалительных реакций имеет некоторую органоспецифичность. В эксперименте показано, что он играет важную роль в развитии воспаления в коже и слизистых, миокарде, почке и скелетных мышцах, тогда как миграция лейкоцитов в печени и легких происходит практически независимо от Р-селектина.

Доказана роль Р-селектина в развитии атеросклеротических изменений сосудистой стенки [116]. Предложен метод прогноза развития сердечно-сосудистых заболеваний, связанных с атеросклерозом и тромбозом сосудов, основанный на количественном определении растворимой формы sР-селектина в крови [133].

Е- и Р-селектины оказывают выраженное влияние на процесс заживления повреждений. В эксперименте установлено резкое снижение скорости развития воспалительно-репаративных реакций при дефиците обоих указанных селектинов; при моделировании изолированного дефицита Р-селектина наблюдалось выраженное замедление клеточных реакций раннего этапа заживления [75, 77, 140].

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.

Кроме того, данные о нормальной локализации Р-селектина в тельцах Вейбеля-Паладе эндотелиальных клеток, как и рекомендованная производителем для позитивного контроля ИГХ окрашивания ткань (интактная миндалины) также свидетельствуют о том, что Р-селектин нормально может экспрессироваться в отсутствие повреждений или воспалительных реакций в исследуемой ткани.

С другой стороны, в небольшом количестве образцов всех экспериментальных групп имело место отсутствие экспрессии указанного антигена. Возможным объяснением этому могут быть данные из литературных источников о том, что при некоторых патологических состояниях может выявляться как повышенная, так и пониженная концентрация Р-селектина в плазме крови, механизмы таких изменений еще требуют дальнейшего изучения.

Таким образом, полученные нами результаты на сегодняшний день не позволяют рассматривать CD62p в качестве надежного маркера прижизненности повреждений. Для более подробного изучения механизма и оценки экспрессии этого белка в эндотелиоцитах, в том числе и при механической травме, требуются дальнейшие исследования с учетом соматического статуса субъекта.

3.4. Характеристика иммуногистохимической реакции аквапорина-3 (AQP3)

С помощью ИГХ метода 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 (Таблица 6, Рисунки 12, 13).

Таблица 6 – Результаты исследования экспрессии AQP3

Экспрессия	Прижизненные, группа 1, n=12	Контроль, группа 2, n=12	Посмертные, группа 3, n=12
Положит.	10	12	9
Отрицат.	2	0	3

Аквапорины (AQP) представляют собой семейство небольших, гидрофобных мембранных белков, действующих, главным образом, как селективные поры, обеспечивающие транспорт через плазматические мембраны клеток. Среди 13 аквапоринов, известных у человека и иных млекопитающих (AQP0–AQP12), выделяют две группы: AQP 1, 2, 4, 5 и 8 функционируют главным образом как транспортеры воды по осмотическому градиенту; AQP 3, 7, 9 и 10, называемые «акваглицеропоринами», обеспечивают транспорт воды, а также глицерина и, возможно, других низкомолекулярных растворимых веществ. AQP экспрессируются в плазматических мембранах различных типов клеток, где происходит трансмембранный транспорт воды и глицерина [59, 93, 117, 145].

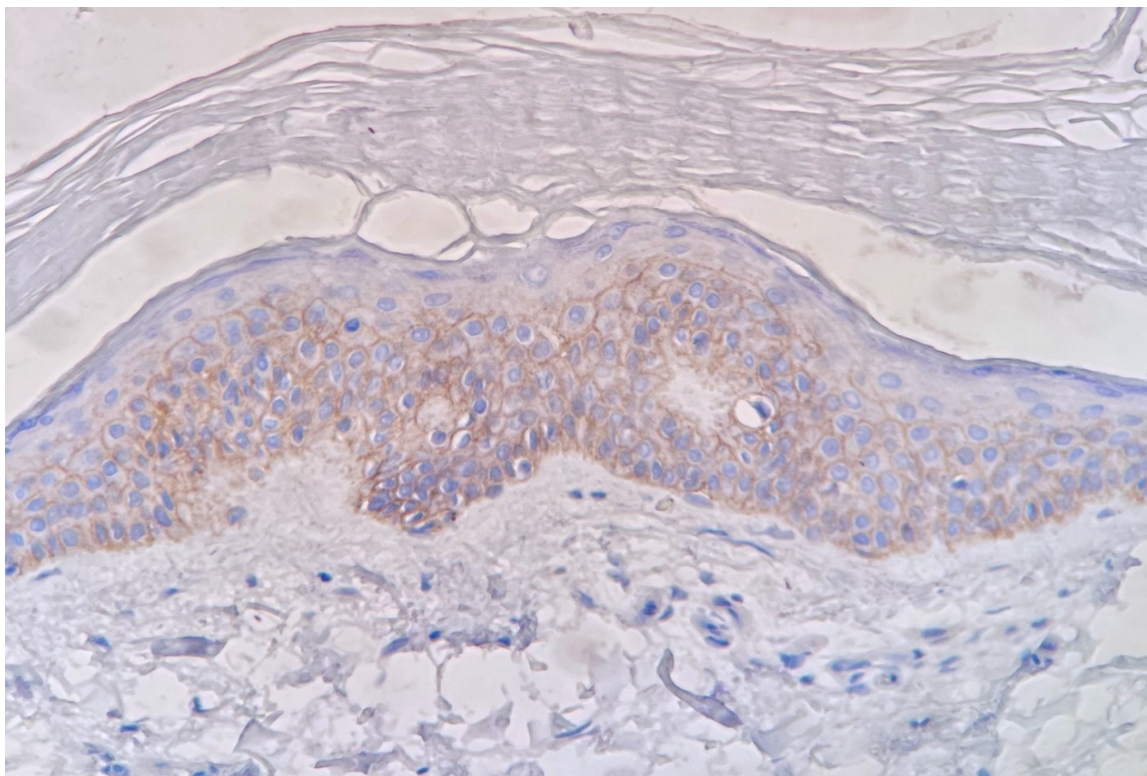


Рисунок 12 – Экспрессия AQP3 средней выраженности в кератиноцитах эпидермиса, прижизненное повреждение. ИГХ с антителами к AQP3. Ув. 200

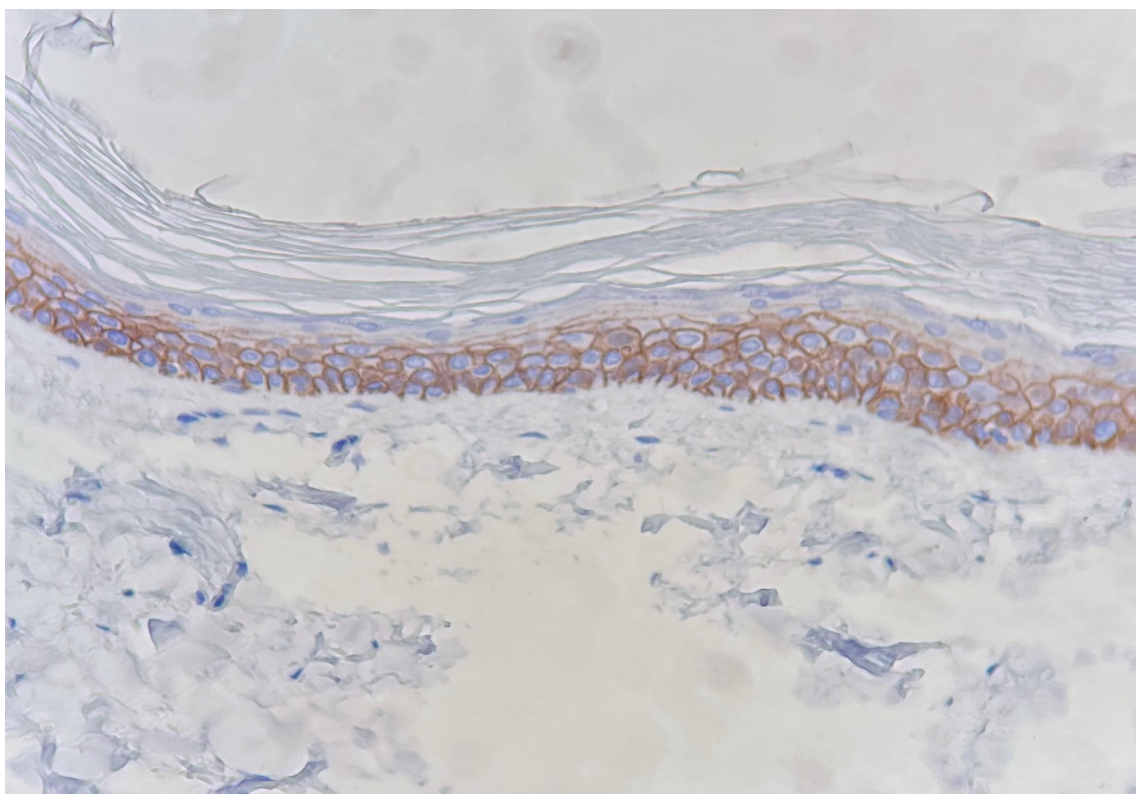


Рисунок 13 – Выраженная экспрессия AQP3 в кератиноцитах эпидермиса, посмертное повреждение. ИГХ с антителами к AQP3. Ув. 200

Множество процессов в организме, таких как: передача нервного импульса, секреция желез, выработка спермы, поддержание гомеостаза, регуляция концентрации вторичной мочи, сохранение влажности и эластичности кожи – происходят при участии аквапоринов. Недостаточность функции последних способствует развитию ряда патологических состояний: нефрогенного несахарного диабета, в частности, литий-индуцированного, катаракты, нарушений кровообращения, а также заболеваний, сопровождающихся сухостью кожи. Аквапорины вовлечены в процессы миграции клеток и заживления повреждений [64]. Отмечено, что функции некоторых аквапоринов оказываются задействованными на различных этапах онкогенеза [160].

Учитывая широту распространения и функций аквапоринов, в настоящее время актуальными являются научные исследования, направленные как на изучение диагностического значения колебаний экспрессии аквапоринов в различных тканях (в первую очередь, для онкотипирования), так и на разработку лекарственных препаратов, влияющих на патологические процессы путем воздействия на функции аквапоринов [54, 71, 126, 159].

Акваглицеропорин AQP3 экспрессируется в базолатеральных плазматических мембранах многих эпителиальных покровов человека. В желудочно-кишечном тракте его экспрессия наблюдается в слизистой оболочке желудка, подвздошной кишки и дистальной части ободочной кишки. AQP3 присутствует в роговице, эпителии верхних и нижних дыхательных путей, молочной железы, печени, поджелудочной железы, яичника, простаты, мочевого пузыря, в некоторых структурах головного мозга. В почке AQP3 экспрессируется в плазматической мембране эпителия собирательных трубочек, где он участвует в тонкой регуляции обратного осмоса воды и концентрации мочи. [52, 158].

AQP3 является наиболее изученным из аквапоринов, присутствующих в структурах кожи. Его выраженная экспрессия в норме наблюдается в плазматической мембране кератиноцитов в базальном и шиповатом слоях эпидермиса, а также в сальных железах и клетках Лангерганса. AQP3, обеспечивая транспорт воды и глицерина, способствует поддержанию гидратации кожи и может

также влиять на миграцию и пролиферацию кератиноцитов в процессе заживления ран. Результатами экспериментов показано, что роль AQP3-зависимого транспорта глицерина является ключевой в поддержании должного уровня гидратации; также отмечено влияние функционирования AQP3 на состояние подкожной жировой клетчатки [52, 53, 55, 92, 93, 131].

Недостаточность функции AQP3 в коже отмечается при ряде заболеваний и состояний, сопровождающихся сухостью кожи: атопическом дерматите, некоторых видах экзем, системном лечении ретиноидами. Уровень экспрессии AQP3 изменяется при плоскоклеточном раке кожи; в эксперименте показано, что AQP3 может играть существенную роль в развитии злокачественных новообразований кожи [53, 93, 159].

В качестве онкоморфологического диагностического признака гиперэкспрессия AQP3 обнаружена при раке легких, толстой кишки, пищевода, плоскоклеточном раке полости рта, гепатоцеллюлярном раке и протоковом раке поджелудочной железы. При аденокарциноме желудка и инвазивном протоковом раке молочной железы уровень гиперэкспрессии AQP3 коррелирует со стадией опухоли, отражая ангиогенез, миграцию, инвазию, распространенность метастазирования в лимфатические узлы, указывая на неблагоприятный прогноз выживаемости пациентов. При раке мочевого пузыря поздние стадии опухоли, наоборот, характеризовались снижением уровня экспрессии AQP3. Высказаны предположения, что в перечисленных случаях AQP3 не только служит диагностическим признаком, но и является активным участником онкогенеза [52, 71, 126].

Полученные нами результаты противоречат проанализированным выше 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 несовместимой с жизнью 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 [51], что делает исследование экспрессии AQP3 недостоверным в случаях обширных травм.

Отдельно нам представился случай проверить на экспертном материале утверждение Y. Ishida и соавт. [82] о возможности диагностики прижизненности механической асфиксии по увеличению выраженности экспрессии AQP3 в эпидермисе странгуляционной борозды.

На судебно-гистологическое исследование в рамках повторной судебно-медицинской экспертизы нам поступили парафиновые блоки с материалом от трупа женщины 38 лет, скончавшейся вследствие механической асфиксии при повешении. Из блоков, содержащих материал странгуляционной борозды и посмертно причиненной ссадины туловища, были изготовлены микропрепараты, окрашены ИГХ методом антителами к AQP3 согласно разработанному нами протоколу. В результате исследования мембранная экспрессия AQP3 в эпидермисе была обнаружена и в прижизненной странгуляционной борозде, и в области посмертной ссадины, но в области прижизненной борозды она носила несколько более выраженный характер, чем в посмертном повреждении (Рисунки 14, 15).

Таким образом, мы отчасти подтвердили данные, изложенные Y. Ishida и соавт. [82]. В то же время следует отметить, что различия в экспрессии были небольшими (разница интенсивности окраски находилась на минимальной границе восприятия), кроме того, они могли быть объяснены сближением клеточных границ в эпидермисе, подвергшемся компрессии. Поскольку исследование странгуляционных борозд не является целью настоящей работы, дальнейший анализ результатов нами не проводился.

Подводя итог изложенному, в собственном исследовании мы не получили результатов, которые на данном этапе позволяли бы рассматривать аквапорин AQP3 в качестве маркера прижизненности повреждений твердыми тупыми предметами.

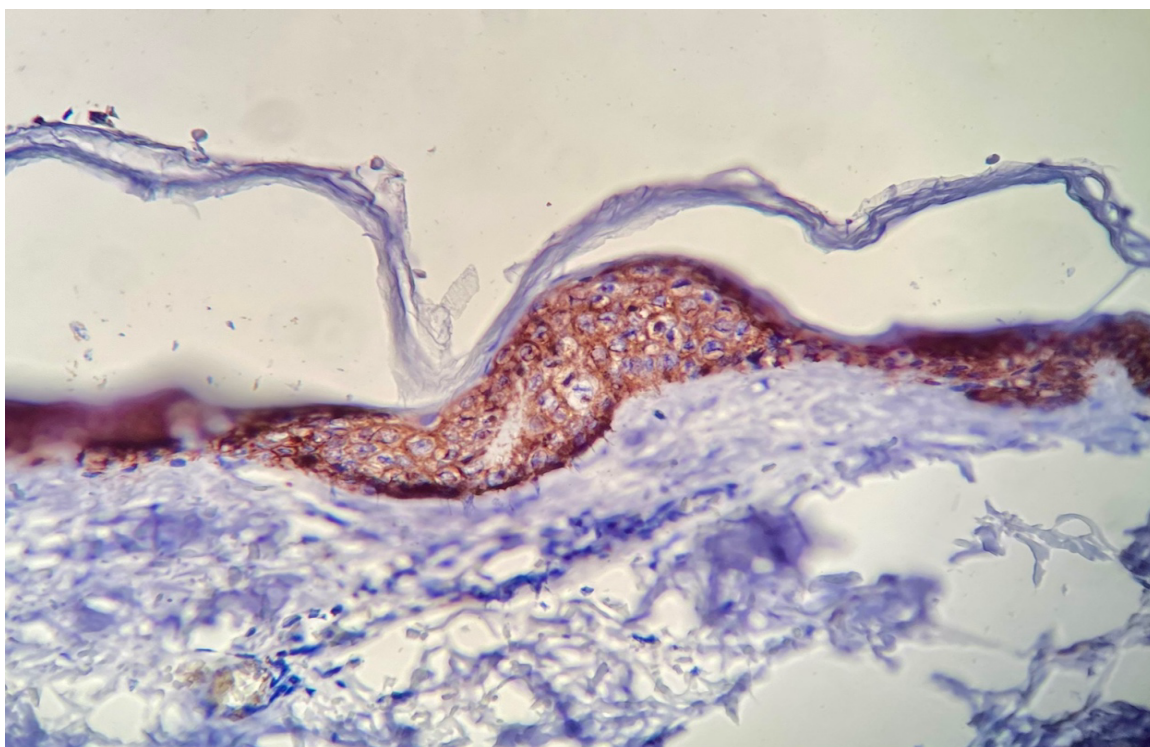


Рисунок 14 – Фрагмент кожи с прижизненной странгуляционной бороздой, выраженная экспрессия AQR3 в кератиноцитах эпидермиса. ИГХ с антителами к AQR3. Ув. 200

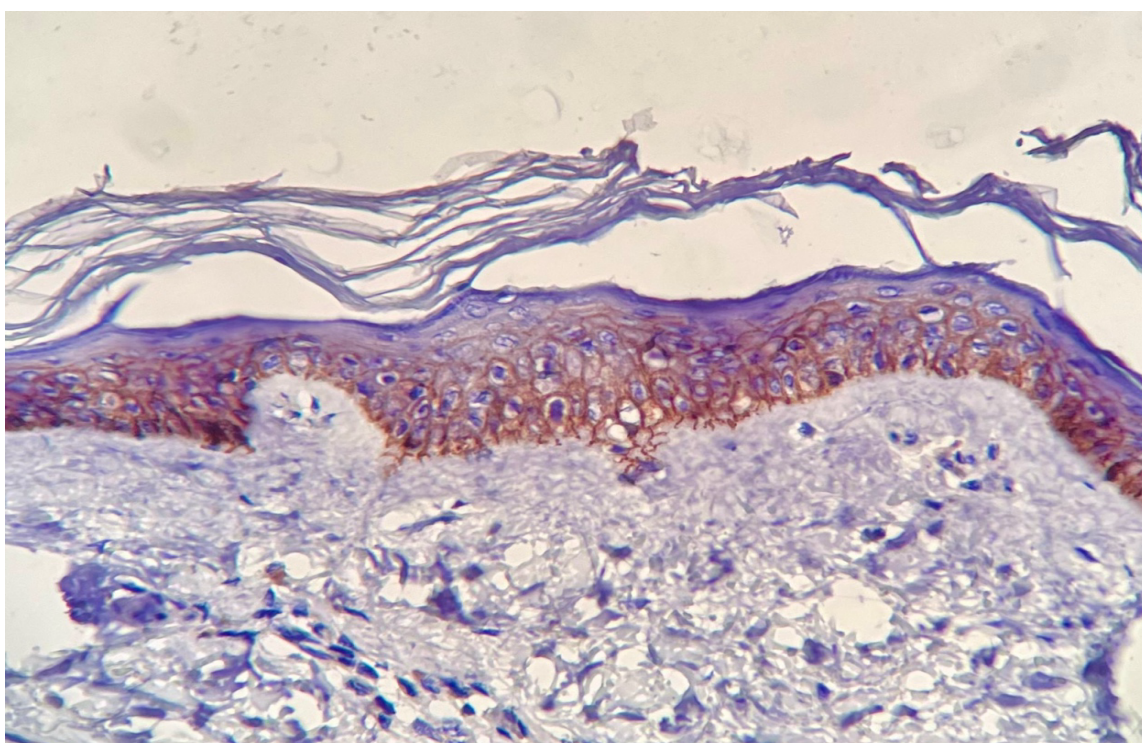


Рисунок 15 – Фрагмент кожи с посмертной ссадиной, незначительно менее выраженная (чем на Рисунке 14) экспрессия AQR3 в кератиноцитах эпидермиса. ИГХ с антителами к AQR3. Ув. 200

3.5. Характеристика иммуногистохимической реакции HMGB1

В образцах кожи всех трех групп была выявлена яркая ядерная экспрессия HMGB1 в кератиноцитах, интенсивность которой была нами принята 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 7, Рисунки 16–18).

Таблица 7 – 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

High-Mobility Group Box 1 (HMGB1) — это высокомолекулярный белок, играющий ключевую роль в процессах репарации ДНК, регуляции транскрипции, в том числе при воспалении и иммунном ответе. В нормальных условиях HMGB1 локализуется в ядре, где он взаимодействует с ДНК, способствуя её структурной организации [44, 141].

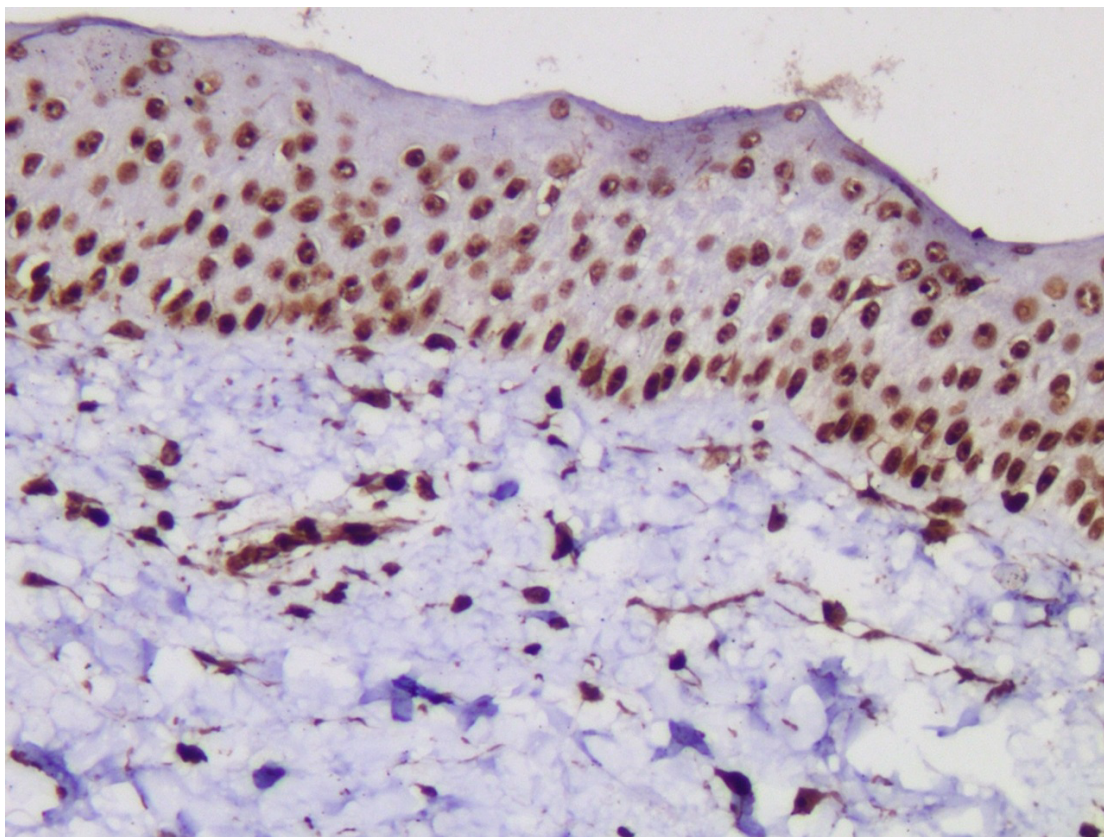


Рисунок 16 – Отсутствие цитоплазматической экспрессии HMGB1 в кератиноцитах эпидермиса. ИГХ с антителами к HMGB1. Ув. 200

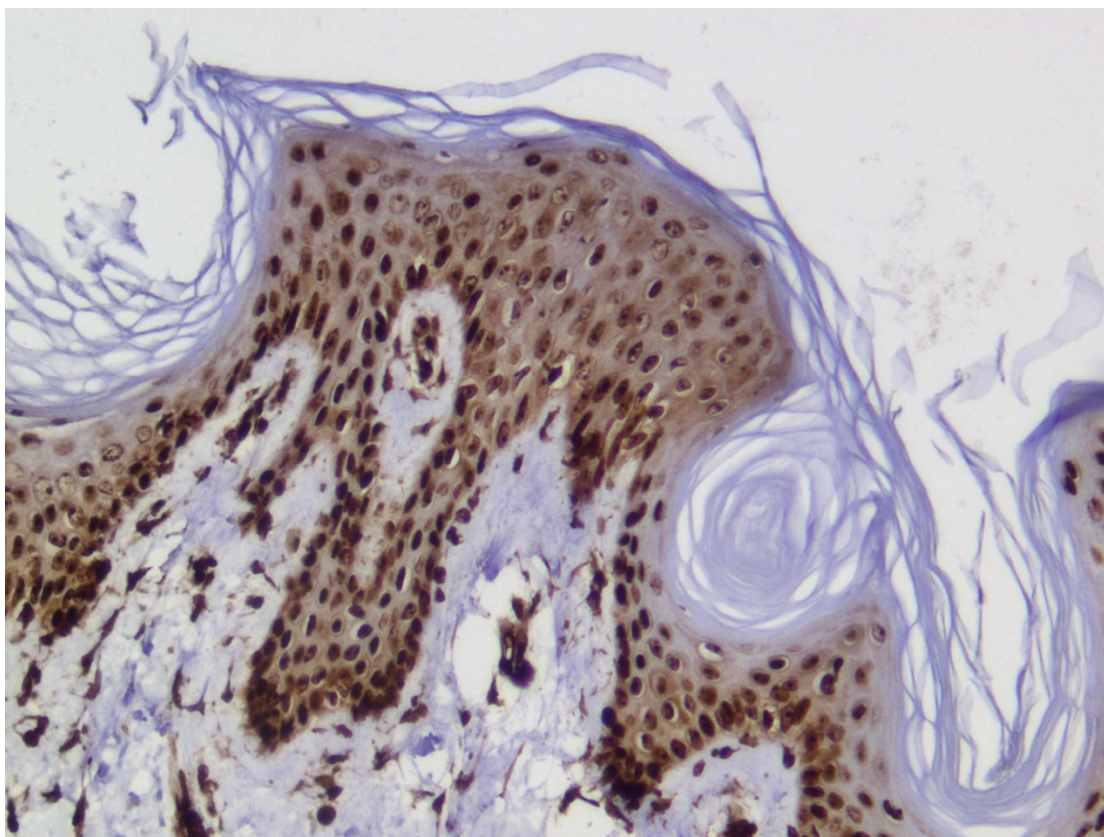


Рисунок 17 – Цитоплазматическая экспрессия HMGB1 1 балл в кератиноцитах эпидермиса. ИГХ с антителами к HMGB1. Ув. 200

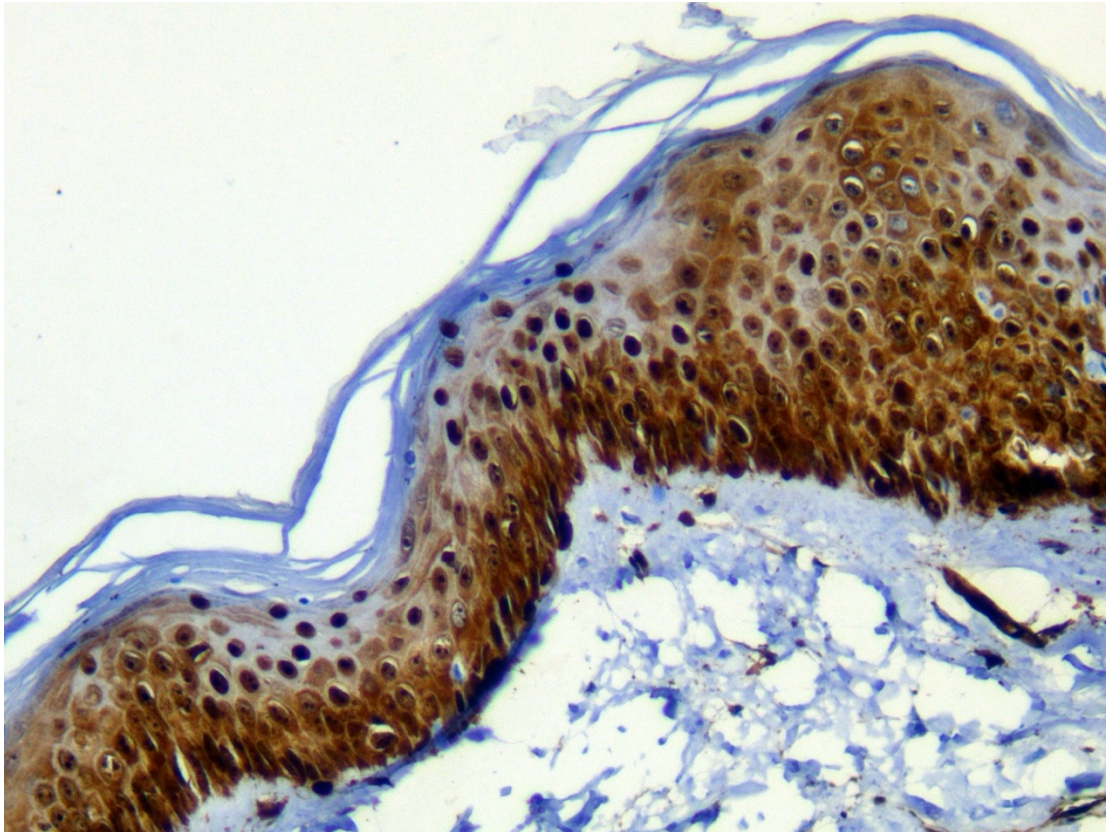


Рисунок 18 – Цитоплазматическая экспрессия HMGB1 2 балла (в базальном слое 3 балла) в кератиноцитах эпидермиса. ИГХ с антителами к HMGB1. Ув. 200

При повреждении или некрозе клеток HMGB1 высвобождается в межклеточное пространство, где он выступает как сигнал опасности (DAMP, Damage-Associated Molecular Pattern). Высвобождение HMGB1 сопровождается его перемещением из ядра в цитоплазму, что связано с модификацией белка, включая ацетилирование и окисление. В экстрацеллюлярном пространстве HMGB1 взаимодействует с рецепторами RAGE и Toll-like (TLR), активируя воспалительные и иммунные ответы [96, 107, 148]. Рядом исследователей HMGB1 рассматривается как системный маркер повреждения, воспаления и сепсиса.

Описано множество факторов (включая свободные радикалы, соединения азота, многие цитокины), влияющих на секрецию и высвобождение HMGB1 [67].

В экспериментальных работах судебно-медицинского направления была исследована возможность использования HMGB1 для оценки давности наступления смерти [98, 104, 108]. Согласно полученным результатам, цитоплазматическая экспрессия посмертно высвобожденного из ядра HMGB1

имеет наиболее высокие значения в интервале от 12 до 36 часов после наступления смерти [104]; 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 [98]. Локальные изменения ИГХ экспрессии HMGB1 в различных структурах кожи на протяжении первых суток постмортального периода описаны в экспериментальной работе [108].

Таким образом, согласно известным к настоящему времени из литературы данным, реакции HMGB1 как представителя молекулярных паттернов DAMP, связаны с множеством воздействий и являются системными; дополнительно, исследуются постмортальные колебания как локального (ИГХ экспрессия), так и системного (уровень в сыворотке крови) содержания HMGB1.

Тем не менее, несмотря на установленное влияние множества факторов на реакции HMGB1, в 2021 году S. Deacu и соавт. провели эксперимент, направленный на выяснение возможности использования ИГХ исследования HMGB1 для оценки прижизненности и повреждений; согласно полученным результатам, цитоплазматическая экспрессия HMGB1 в кератиноцитах отмечалась в большей части прижизненно причиненных повреждений кожи и в меньшей части контрольных образцов, а также была более выраженной в прижизненных повреждениях [97]. Именно данная работа, более подробно освещенная нами в главе 1, 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 7); в этой части наши результаты коррелировали с теми, которые получили S. Deacu и соавт. (Рисунок 19).

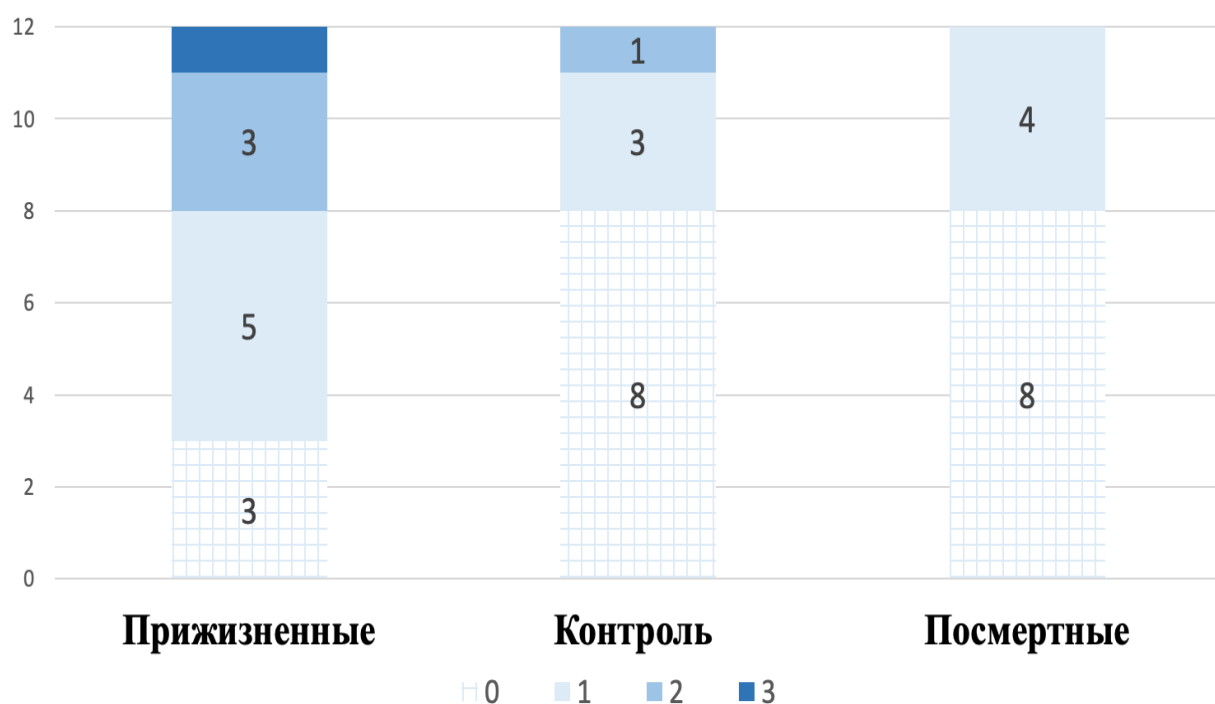


Рисунок 19 – Диаграмма выраженности экспрессии HMGB1 по группам образцов, данные из Таблицы 7.

С другой стороны, поскольку, в отличие от упомянутых авторов, нами были взяты для эксперимента прижизненно поврежденные и контрольные образцы от одних и тех же субъектов, то мы провели индивидуальное сопоставление результатов в образцах трех групп по каждому субъекту. При этом нами 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 в 6 случаях из 12; таким образом, эффективность метода составила лишь 50%.

Поскольку причиной смерти всех субъектов, материал которых был нами использован, являлись 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, что выходит за рамки данного диссертационного исследования.

Глава 4. ХАРАКТЕРИСТИКА ДИНАМИКИ ПЛОТНОСТИ И ДЕГРАНУЛЯЦИИ ДЕРМАЛЬНЫХ ТУЧНЫХ КЛЕТОК

4.1. Оценка дегрануляции тучных клеток в области повреждений кожи

Исследовали микропрепараты, окрашенные толуидиновым синим / азуром-II и эозином; коэффициент дегрануляции тучных клеток рассчитывали, проводя подсчет 100 тучных клеток в дерме, в полях зрения большого увеличения (400х) микроскопа, расположенных последовательно в 2 ряда вдоль дермо-эпидермальной границы; количество дегранулировавших тучных клеток выражали в процентах.

В 6 случаях механической травмы мягких тканей дегрануляция тучных клеток колебалась в пределах 52–100% в образцах прижизненных повреждений и 45–82% – в контрольных образцах без повреждений (Рисунок 20).

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.

Кроме описанных выше, были исследованы образцы кожи со странгуляционными бороздами от 3 трупов лиц мужского пола в возрасте 22–30 лет, скончавшихся вследствие механической асфиксии при повешении. В 2 из 3 случаев механической асфиксии 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 [1], что подтверждает гипотезу о

возможности иммунонезависимой активации тучных клеток посредством нервной регуляции [62].

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 [37].

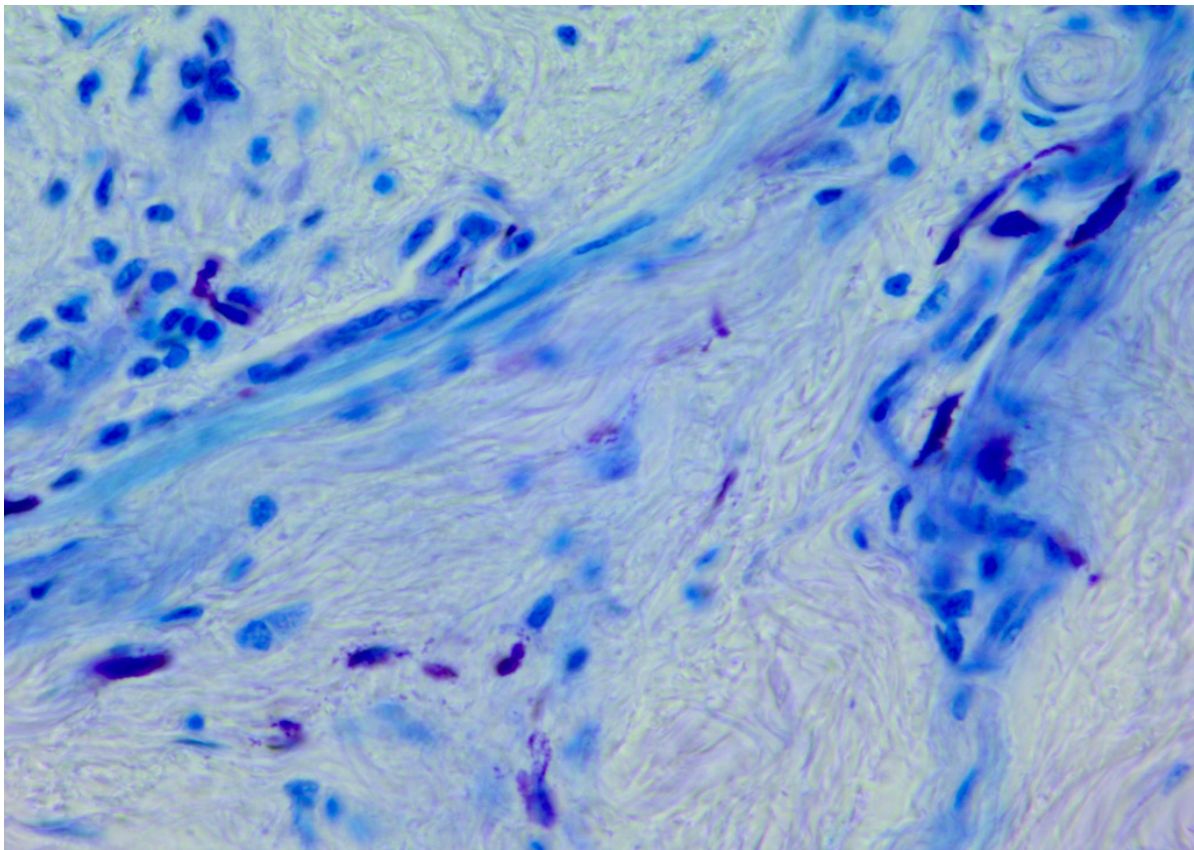


Рисунок 20 – Дегрануляция дермальных тучных клеток в области прижизненного повреждения. Окраска азуром-II и эозином. Ув. 630

4.2. Характеристика динамики плотности дермальных тучных клеток в исследованных образцах кожи

Исследовали микропрепараты, окрашенные ИГХ-методом антителами к триптазе тучных клеток.

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 [15].

Полученный результат привел нас к пересмотру применяемой методики эксперимента: увеличению глубины и площади исследуемого участка кожи, а также применению цифровых технологий при подсчете плотности. Вследствие этого, с помощью компьютерной обработки данных с полноформатных сканов гистологических препаратов (см. главу 2 «Материалы и методы») на 2-м этапе эксперимента на расширенном объеме материала (40 трупов) 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).

Анализируя разброс полученных значений, необходимо отметить, что высокая индивидуальная вариабельность плотности дермальных тучных клеток вносила помехи при статистической обработке (см. точки «выбросов» на графике, Рисунок 21). Тем не менее, 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 ($p < 10^{-5}$) [16].

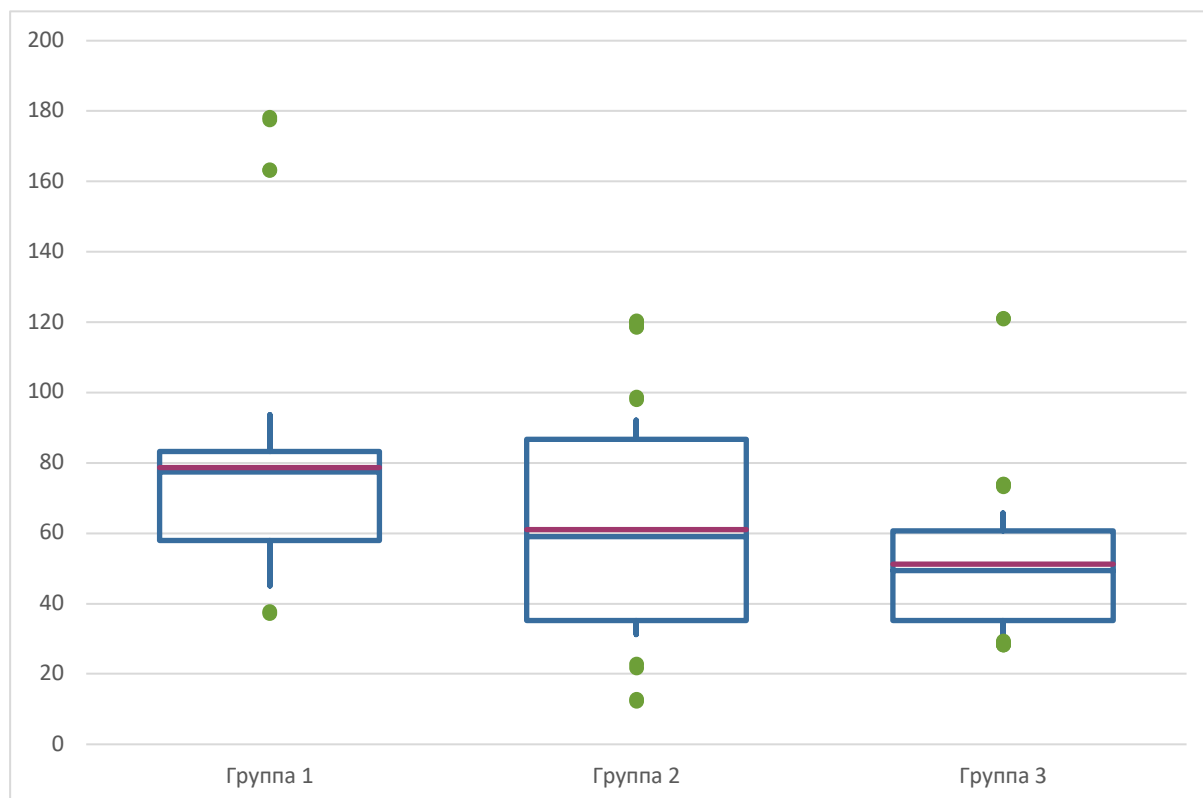


Рисунок 21 – Плотность дермальных тучных клеток в образцах 1, 2, 3 групп, клеток/мм², n=40, $p < 10^{-5}$

Тучные клетки (mast cells, MC) известны уже более ста лет, со времени, когда их в 1878 году обнаружил Р. Ehrlich, используя анилиновые красители. Долгие годы исследователи связывали роль тучных клеток исключительно с содержащимся в них гистамином, при участии которого реализуются аллергические реакции немедленного типа. В последнее время, благодаря продолжающимся широким исследованиям, выявляются все новые сведения о составе и функциях тучных клеток, их многообразном влиянии на гомеостаз,

тканевой иммунитет, ремоделирование и воспалительно-репаративные процессы в тканях, а также об участии тучных клеток в патогенезе различных заболеваний, в том числе новообразований [62, 85, 121, 122, 124, 128, 137, 164].

Происходя из CD34-положительных стволовых клеток костного мозга, через кровотоков тучные клетки попадают незрелыми в ткани практически всех органов, где, в зависимости от микроокружения, происходит их окончательная дифференцировка. Зрелые тучные клетки обладают выраженной гетерогенностью фенотипа; основанием их классификации послужило содержание протеаз – химазы и триптазы. Все тучные клетки, включая незрелые, содержат триптазу (тип МСТ). Некоторая часть тучных клеток содержит дополнительно химазу (тип МСТс); такие клетки, содержащие обе протеазы, превалируют в коже, где мастоциты вообще содержатся в большом количестве, локализуясь преимущественно вблизи сосудов, придатков кожи и нервных окончаний.

Благодаря мембранным рецепторам многих типов тучные клетки реагируют на воздействие различных веществ, в частности, иммуноглобулинов Е, фактора стволовых клеток SCF, факторов роста нервов NGF, интерлейкинов, нейротрансмиттеров.

Помимо протеаз и гистамина, тучные клетки содержат множество предварительно сформированных вазоактивных и хемотаксических медиаторов, таких как гепарин, VEGF, TNF α и другие, которые при высвобождении на начальных стадиях раневой реакции влияют на кровотоечение, последующее свертывание крови и развитие воспалительной реакции. Триптаза тучных клеток способна активировать TGF β из латентной формы. Выделяемые тучными клетками пептидные факторы роста, цитокины и хемокины (VEGF, PDGF, TGF, интерлейкины IL-4, IL-8 и другие) способствуют неоангиогенезу, фибриногенезу и реэпителизации во время репаративного процесса. Показано, что тучные клетки двунаправленно регулируют образование фибринового свертка, обладая возможностью как ингибировать свертывающую активность фибриногена, так и увеличивать экспрессию фактора свертывания крови XIIIa, усиливая коагуляцию [120].

На ранних стадиях воспаления доказано влияние медиаторов тучных клеток на миграцию лейкоцитов; некоторые вещества, выделяемые тучными клетками, обладают собственной антимикробной активностью [166].

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. [106]; в то же время, 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. Такой разброс значений плотности, возможно, связан с различиями в методике исследования, поскольку А. Bonelli и соавт. проводили свои подсчеты при помощи микроскопии (ручной подсчет, как и на первом этапе нашего исследования), не используя технологии полноформатного сканирования и исследования цифровых изображений; кроме того, авторы не сообщили о том, как они определяли исследуемую область в коже [16].

Вопрос нормальной плотности дермальных тучных клеток освещен в работах А. Janssens и соавт. [123], Петрова В.В. и соавт. [5]. В первой упомянутой работе исследовано распределение тучных клеток по коже различных областей тела; средняя плотность дермальных тучных клеток составила $79,5 \pm 31,8$ клеток/мм²; отмечено увеличение плотности по направлению к дистальным отделам конечностей. Вторая работа была посвящена возрастным и обусловленным различными факторами колебаниям плотности дермальных тучных клеток; отмечено возрастание плотности с возрастом, а приведенные в источнике нормальные значения составили 200–460 клеток/мм².

Таким образом, полученные нами значения плотности дермальных тучных клеток по масштабу близки к приведенным в исследованиях А. Janssens и соавт. [123], Петрова В.В. и соавт. [5].

Необходимо было принять во внимание, что в практической экспертной деятельности возможность получения экспериментального образца кожи с посмертным повреждением минимальной давности отсутствует, поэтому на практике возможности исследования динамики плотности дермальных тучных клеток ограничены сравнением исследуемого повреждения и контрольного образца неповрежденной кожи. Исходя из указанного ограничения, мы выстроили дальнейший анализ полученных результатов.

Для того, чтобы выявить различия в плотности дермальных тучных клеток, которые гипотетически могли бы указывать на прижизненность повреждений, анализ и сопоставление значений в образцах групп 1,2 и 3 были нами проведены по каждому субъекту индивидуально. Поскольку, в отличие от А. Bonelli и соавт., мы получали образцы прижизненно поврежденной, посмертно поврежденной и интактной кожи от одних и тех же субъектов, возможность такового сопоставления у нас имелась. В результате 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 многократно 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.

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 (Рисунки 22, 23).

Результаты наших экспериментов позволили нам принять участие в дискуссии, которая ведется в специальной литературе о том, изменяется ли плотность дермальных тучных клеток в областях прижизненных повреждений, и является ли достоверным метод диагностики прижизненности, основанный на этом явлении.

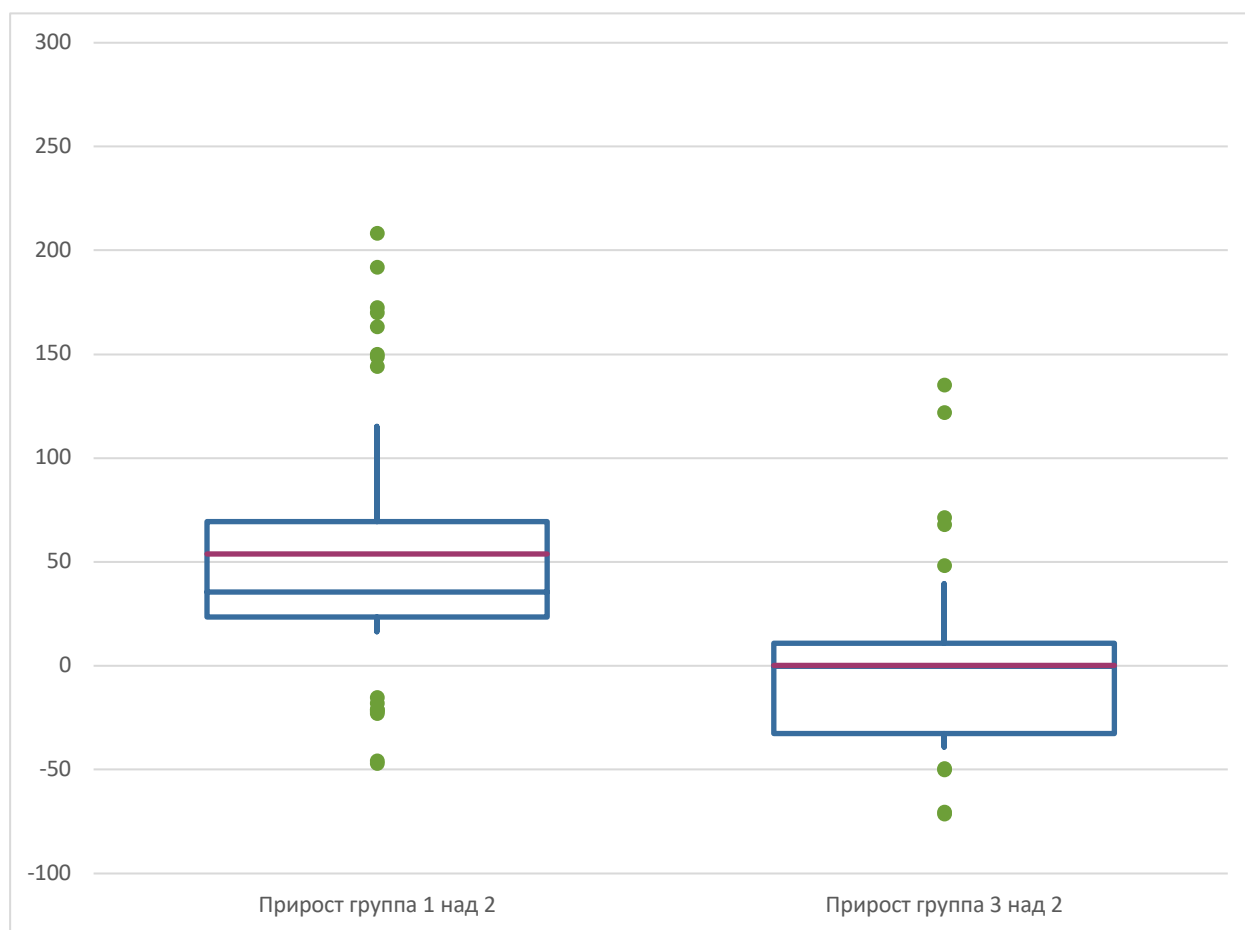


Рисунок 22 – Прирост плотности тучных клеток в образцах 1 и 3 групп над 2 группой, %, $n=40$, $p<10^{-5}$

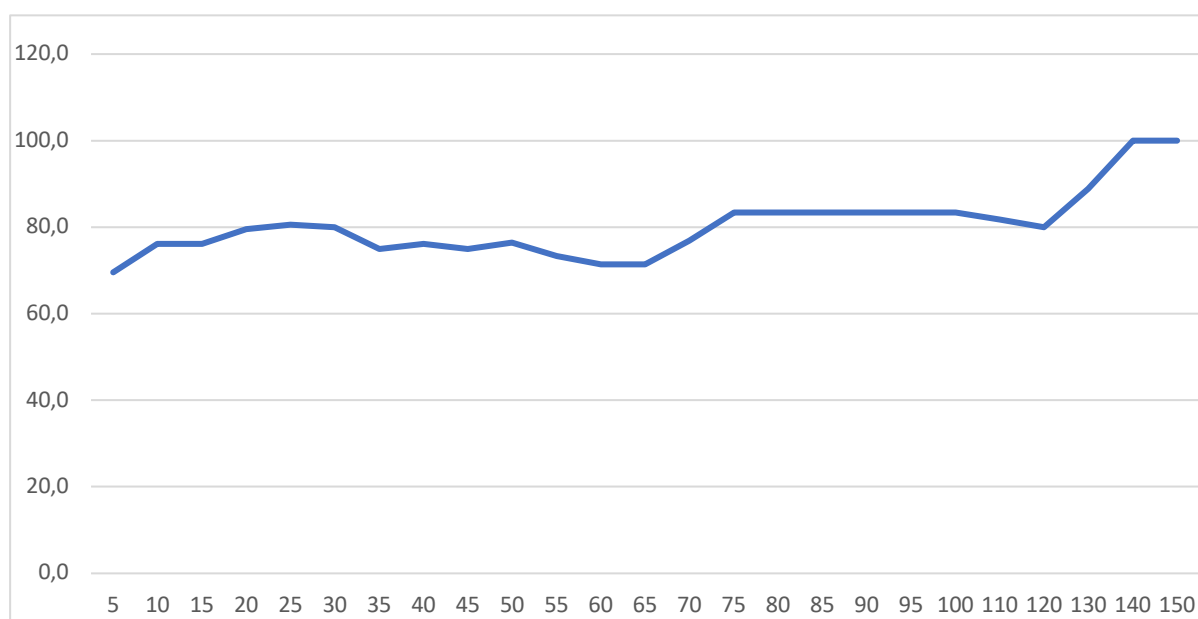


Рисунок 23 – Зависимость вероятности правильного обнаружения (ось Y, %) прижизненного повреждения от величины прироста плотности (ось X, %)

С учетом проведенного анализа 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, поскольку метод с вероятностью правильной диагностики прижизненности, составляющей от 2 к 1 до 3 к 1 вряд ли приемлем для целей судебно-медицинской экспертизы и, как максимум, может служить для весьма приблизительной оценки вероятности прижизненности, будучи использован совместно с другими, более достоверными методами [16].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Актуальность проблемы достоверной гистологической диагностики прижизненности механических повреждений и повсеместное вмешательство фактора переживаемости тканей как основное препятствие для ее решения наглядно обнаруживаются в практической деятельности судебно-медицинских экспертных учреждений – во множестве экспертиз, в том числе повторных, выполненных широкими составами комиссий экспертов, тем не менее, не давших однозначного ответа на вопрос о прижизненности травмы или давших его без должного обоснования и критического отношения к комплексу выявленных признаков, что в особенной степени касается повреждений с давностью причинения до 30–40 минут.

Ставя перед собой амбициозную цель участвовать в поиске методов достоверной диагностики прижизненности повреждений, мы лишь отчасти представляли себе, насколько объемным является поднимаемый пласт научной информации. Множественные взаимосвязанные механизмы тканевых и клеточных реакций, постоянно расширяющийся в ходе научного поиска список участвующих в них веществ-медиаторов, разнонаправленность действия одних и тех же веществ на различные структуры в различное время после причинения повреждения – вот далеко не полный список тем, изучение которых не только увлекло нас в диссертационном исследовании, но займет в будущем еще многие научные ресурсы как в фундаментальных дисциплинах (в первую очередь, патофизиологии и биохимии), так и в судебной медицине, чтобы продвинуться к подробному пониманию механизмов реактивных процессов в поврежденных тканях и обеспечить их практическое применение для повышения достоверности диагностики прижизненности.

Список медиаторов, исследованных отечественными и зарубежными авторами в плане ИГХ диагностики прижизненности, который мы вывели при обзоре литературы, является далеко не полным, а проанализированные нами исследования зачастую представляют собой лишь «вершину айсберга», поскольку, являясь прикладными, оценивают конкретную возможность диагностического

применения того или иного ИГХ маркера, но далеко не всегда простираются на всю длину цепи биохимических и патофизиологических событий, приводящих к его появлению в исследуемых структурах.

Отбор ИГХ маркеров и ИГХ-детектируемых явлений для собственного исследования нами был произведен, по сути, эмпирически, основываясь на полученных из литературы данных о механизмах их возникновения и проявления в поврежденных тканях, а также на результатах проанализированных нами исследований.

Механизмы участия тучных клеток в воспалительно-репаративных процессах были достаточно подробно исследованы и освещены в печати еще в эру классической гистологии, за десятилетия до разработки ИГХ методов. Гипотеза о возможности использования реакций тучных клеток для диагностики прижизненности, широко и противоречиво отраженная в изученной литературе, занимала диссертанта задолго до начала работы над собственно диссертационным исследованием, к тому же, на первый взгляд, подкреплялась экспериментальными данными ряда авторов. Тем не менее, наши собственные исследования убедительно показали, что дермальные тучные клетки, хотя и отвечают на механическое повреждение дегрануляцией и статистически достоверным повышением плотности (в полном соответствии с изученными нами литературными данными), но в значительной мере подвержены влиянию переживаемости тканей. Последнее сводит к минимуму различие в показателях плотности (хотя и статистически доказанное!) и практически устраняет различие в коэффициенте дегрануляции в прижизненных и посмертно причиненных повреждениях, что делает нецелесообразной попытку разработки какого-либо основанного на этом метода диагностики прижизненности.

P-селектин (CD62p) и аквапорин-3 (AQP3) изначально являются спорными ИГХ маркерами диагностики прижизненности, поскольку, исходя из теоретических и практических данных, их экспрессия в норме наблюдается в неповрежденных тканевых структурах. Мы взяли эти маркеры для экспериментальной разработки, преимущественно основываясь на

опубликованных данных некоторых авторов об их реакциях в максимально короткие сроки после причинения повреждения. В собственных исследованиях нам не удалось выявить какие-либо диагностически значимые различия в экспрессии названных маркеров в прижизненно и посмертно поврежденной коже, а также в интактных образцах, в связи с чем мы прекратили эксперименты с ними, ограничившись достаточно малой серией исследованного материала.

HMGB1 как представитель группы DAMP, в силу наличия множества активирующих факторов, также в данный момент является спорным ИГХ маркером диагностики прижизненности и требует детального дальнейшего изучения, как теоретического, так и экспериментального.

Следует отметить, что применимость для судебно-гистологической диагностики прижизненности тех ИГХ маркеров, которые экспрессируются в норме, нам представляется весьма спорной с позиции общих принципов метода ИГХ исследования. Необходимо обратить внимание, что в смежной дисциплине – патологической анатомии, имеющей несомненный приоритет и существенный накопленный опыт в применении и развитии методов ИГХ диагностики, подавляющее большинство методов основывается на качественном обнаружении ИГХ маркеров в тканевых и клеточных структурах, с результатом оценки «обнаружен/не обнаружен». Количественные градации экспрессии типа «1+ 2+ 3+» применяются для диагностики весьма ограниченного спектра патологий, поскольку сама методология количественной оценки является оператор-зависимой, вносит существенный элемент субъективности в получаемый результат и является нередким источником диагностических ошибок. В судебно-медицинской сфере, где к достоверности результатов предъявляются особые требования, попытки ИГХ диагностики путем количественной оценки экспрессии, на наш взгляд, должны восприниматься с осторожностью.

TGF β 1, взятый для экспериментального исследования с учетом известных данных о его участии в воспалительно-репаративных реакций и раннем проявлении в поврежденных тканях, оказался наиболее перспективным и интересным из исследованных нами ИГХ маркеров.

Экспрессия TGFβ1 отчетливо проявлялась в эпидермисе и дерме в области прижизненных повреждений во всех случаях; оказалась наименее подверженной явлению переживаемости тканей – лишь в единичных случаях очень слабо проявлялась в базальном слое эпидермиса в области посмертно причиненных повреждений и в неповрежденной коже. Различия в экспрессии TGFβ1 в прижизненно поврежденных образцах по сравнению с интактными и посмертно поврежденными оказались выраженными и статистически достоверными.

Учитывая, что эпидермис, как разновидность многослойного плоского эпителия, не относится к высоко васкуляризованным тканям и состоит из достаточно плотно связанных между собой клеток, к тому же отделен от дермы базальной мембраной, мы гипотетически не связываем наличие активной формы TGFβ1 в кератиноцитах с выбросом из тромбоцитарных гранул, а полагаем его как собственный «запас» кератиноцитов, активирующийся тканевыми медиаторами (в первую очередь, плазмином, обладающим заодно способностью к деградации базальной мембраны) из поврежденной дермы. В пользу этой гипотезы может говорить также тот факт, что в случаях слабой экспрессии TGFβ1 (1 балл) она всегда отмечалась именно в базальном слое эпидермиса (ближайшем к дерме), и лишь в случаях более выраженной экспрессии (2–3 балла) распространялась на шиповатый слой, при этом не отмечаясь в самой дерме.

В свою очередь, обнаруженный нами в некоторых случаях прижизненных повреждений дермальный компонент экспрессии TGFβ1 (которому при этом всегда сопутствовала экспрессия в эпидермисе, с общей оценкой 4 балла) наиболее вероятно, имеет тромбоцитарное происхождение.

Таким образом, результаты наших исследований позволили нам достичь поставленной цели исследования и решить следующие задачи:

- установить практическую возможность использования TGFβ1 для диагностики прижизненности механических повреждений кожи и разработать метод ИГХ диагностики прижизненности повреждений с его использованием;
- предложить с учетом имеющихся литературных данных гипотезу двунаправленной активации TGFβ1 в структурах поврежденной кожи;

- подтвердить в эксперименте данные о реакциях дермальных тучных клеток на повреждение, выражающихся в повышении плотности и дегрануляции, в то же время, с учетом сильного влияния переживаемости тканей, статистически обосновать нецелесообразность разработки каких-либо основанных на этом диагностических методов;
- подтвердить в эксперименте данные о более частой и выраженной цитоплазматической экспрессии HMGB1 в кератиноцитах прижизненно поврежденной кожи, в то же время, на данном этапе не утверждая о возможности его практического применения;
- отклонить гипотезу о возможности применения CD62p и AQP3 для ИГХ диагностики прижизненности повреждений кожи тупыми твердыми предметами.

Перспективы дальнейшей разработки темы

В дальнейшем научном поиске методов диагностики прижизненности механических повреждений, придерживаясь пути «каскада» патофизиологических реакций, приводящих к активации $TGF\beta 1$ и проявлению его экспрессии в кератиноцитах поврежденной кожи, мы видим возможные перспективы исследования в изучении возможности ИГХ и других способов детекции медиаторов, вызывающих активацию $TGF\beta 1$ (плазмина 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.

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 Р-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 его было возможно использовать в основе метода диагностики прижизненности повреждений. На основании данных результатов разработка соответствующих методов 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 $TGF\beta 1$ с использованием для оценки экспрессии полуколичественной шкалы.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Метод ИГХ диагностики прижизненности механических повреждений кожи с использованием антител к TGF β 1, разработанный нами на основе проведенных экспериментов, опубликован в соответствующих методических рекомендациях [38].

Показанием к применению метода является проведение судебно-гистологической экспертизы (исследования) образцов кожи с повреждениями тупыми твердыми предметами (кровоподтеки) давностью до 30–40 минут (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 TGF β 1, 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 (Таблица 3 на с. 58, Рисунки 5–8 на с. 59–60). 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 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.

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

В случае, когда экспрессия TGFβ1 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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арташян, О. С. Система тучных клеток при действии на организм экстремальных факторов : автореферат дис. ... кандидата биологических наук : 03.00.13 / Ин-т иммунологии и физиологии УрО РАН. — Екатеринбург, 2006. — 23 с.
2. Атлас по судебной медицине / [Пиголкин Ю. И. и др.] ; под ред. Ю. И. Пиголкина. — Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2010. — 376 с.
3. Берг, О. Ю. К вопросу о прижизненности и давности причинения повреждений при механической травме / О. Ю. Берг, М. В. Пикулева, Ю. С. Исаев // Актуальные вопросы судебной и клинической медицины. — Ханты-Мансийск, 2008. — В.10. — С. 17–18.
4. Бихерт, Е. А. К вопросу посмертного хемотаксиса лейкоцитов / Е. А. Бихерт, О. Н. Демчук, И. В. Власюк // Избранные вопросы судебно-медицинской экспертизы, Хабаровск, 04 декабря 2018 года / Под редакцией А. И. Авдеева, И. В. Власюка, А. В. Нестерова. Том Выпуск 17. — Хабаровск: Дальневосточный государственный медицинский университет, 2018. — С. 47–50.
5. Возрастные изменения числа тучных клеток и эозинофилов в коже человека / В. В. Петров, О. В. Васильева, Н. К. Корнилова, А. Г. Гунин // Онтогенез. — 2013. — Т. 44, № 3. — С. 179.
6. Диагностика прижизненности странгуляционной асфиксии иммуногистохимическим методом : методические рекомендации / Д. В. Богомоллов, В. А. Путинцев, О. П. Денисова, А. З. Павлова ; Рекомендовано к изданию Ученым советом ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России (протокол № 1 от 15 марта 2018 года). — Москва : ООО "Принт", 2018. — 12 с.
7. Зербино, Д. Д. Гистохимические методы окраски / Д. Д. Зербино, Л. Л. Лукасевич // Архив патологии. — 1984.
8. Иммуногистохимический анализ динамики заживления кожных ран / Г. М. Харин, Ю. А. Челышев, Т. Р. Джорджикия [и др.] // Альманах судебной медицины — 2001. — №2. — С. 125–127.

9. Иммуноморфологическое исследование внеклеточного матрикса при хроническом панкреатите / П. Н. Никитин, О. В. Паклина, Е. Л. Туманова, Г. Р. Сетдикова // Вестник Российского государственного медицинского университета. — 2010. — № 4. — С. 67–70.

10. К судебно-медицинской оценке кровоизлияний / В. Д. Исаков, Г. П. Лаврентюк, В. Е. Сысоев, М. Т. Исмаилов // Судебно-медицинская экспертиза. — 2009. — Т. 52, № 3. — С. 3–4.

11. Карпенко, Т. А. Гистологическая оценка давности ушибленных ран различной локализации по состоянию фибрина в сочетании с клеточными реакциями / Т. А. Карпенко // Избранные вопросы судебно-медицинской экспертизы, Хабаровск, 04 декабря 2018 года / Под редакцией А.И. Авдеева, И.В. Власюка, А.В. Нестерова. Том Выпуск 17. — Хабаровск: Дальневосточный государственный медицинский университет, 2018. — С. 117–119.

12. Киреева, Е. А. Судебно-медицинское определение давности переломов ребер : диссертация ... кандидата медицинских наук : 14.00.24 / Киреева Елена Андреевна; [Место защиты: ГУ "Российский центр судебно-медицинской экспертизы"]. — Москва, 2008. — 196 с.

13. Крыжановская, И. В. Судебно-медицинское определение давности ран морфологическими методами : Автореферат дисс. на соискание ученой степени доктора медицинских наук. (14.774) / И. В. Крыжановская [Место защиты: Киевский мед. ин-т им. А. А. Богомольца]. — Киев, 1969. — 39 с.

14. Кулик, А. Ф. Гистохимические и морфометрические показатели давности нанесения ссадин и ран кожи различных областей тела : Автореферат дисс. канд. мед. наук / А. Ф. Кулик. — Москва, 1985. — 28 с.

15. 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.

16. 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.

17. Лаптева, М. И. Судебно-медицинское установление давности тупой механической травмы мягких тканей (морфометрическое исследование) : диссертация ... кандидата медицинских наук : 14.00.24 / Лаптева Мария Игоревна; [Место защиты: ГУ "Российский центр судебно-медицинской экспертизы"]. — Москва, 2007. — 283 с.

18. Лунева, З. М. Влияние некоторых факторов на выраженность реактивных изменений кровоподтеков. / З. М. Лунева, В. В. Телюк, А. А. Теньков // Всероссийский съезд судебных медиков: «Перспективы развития и совершенствования судебно-медицинской науки и практики» (посвященный 30-летию Всероссийского общества судебных медиков), 6-й : Материалы. — Москва, Тюмень : Академия, 2005.

19. Меджидов, М. Н. Данные иммуногистохимического исследования заживления экспериментальных ран десны как критерий установления давности повреждения слизистой оболочки полости рта / М. Н. Меджидов, Д. В. Богомолов // Материалы научно-практической конференции, посвященной 200-летию систематического преподавания судебной медицины в ММА им. И.М. Сеченова. — Москва, 2004. — С. 44–46.

20. Науменко, В. Г. Гистологический и цитологический методы исследования в судебной медицине : (руководство) / В. Г. Науменко, Н. А. Митяева. — Москва : Медицина, 1980. — 304 с.

21. Некоторые иммуногистохимические маркеры прижизненности странгуляционной механической асфиксии / Д. В. Богомолов, В. А. Путинцев, Ю. В. Збруева, О. П. Денисова // Судебно-медицинская экспертиза. — 2017. — Т. 60, № 1. — С. 8–10.

22. Новоселов, В. П. Иммуногистохимическое исследование при определении давности травмы двухмоментных разрывов селезенки / В. П. Новоселов, С. В. Савченко, М. В. Чернова // Всероссийский съезд судебных медиков: «Перспективы развития и совершенствования судебно-медицинской

науки и практики» (посвященный 30-летию Всероссийского общества судебных медиков), 6-й : Материалы. — Москва, Тюмень : Академия, 2005.

23. Основные и дополнительные иммуногистохимические маркеры прижизненности странгуляционной механической асфиксии / Д. В. Богомолов, В. А. Фетисов, О. П. Денисова [и др.] // Судебно-медицинская экспертиза. — 2018. — Т. 61, № 2. — С. 11–13.

24. Остробородов, В. В. К вопросу о давности нанесения повреждений по наличию клеточной реакции в кровоизлияниях / В. В. Остробородов, С. А. Фоминых, В. Э. Янковский // Актуальные вопросы судебной медицины и экспертной практики : К 50-летию кафедры судебной медицины с основами права АГМУ / Межрегиональная Ассоциация "Судебные медики Сибири"; Алтайский государственный медицинский университет; Новосибирский государственный медицинский университет. Том Выпуск 14. — Барнаул-Новосибирск : Межрегиональная Ассоциация "Судебные медики Сибири", 2008. — С. 136–139.

25. Пермяков, А. В. Судебно-медицинская гистология : Рук. для врачей / А.В. Пермяков, В.И. Витер, Н.И. Неволин. — [2. изд., перераб. и доп.]. — Ижевск; Екатеринбург : [Экспертиза], 2003 — 214 с.

26. Перспективы использования методов иммуногистохимии для установления прижизненности и давности механических повреждений в судебно-медицинской практике / Д. В. Богомолов, И. Н. Богомолова, Л. Э. Завалишина [и др.] // Судебно-медицинская экспертиза. — 2014. — Т. 57, № 5. — С. 35–39.

27. Роль трансформирующего -фактора роста в развитии некоторых заболеваний печени / К. Л. Райхельсон, В. Е. Карев, Н. В. Марченко [и др.] // Терапевтический архив. — 2014. — Т. 86, № 2. — С. 44–48.

28. Руководство по судебной медицине : учебное пособие по специальности 14.03.05 "Судебно-медицинская экспертиза" / [Ардашкин А. П. и др.] ; под ред. В. Н. Крюкова, И. В. Буромского. — Москва : Норма : ИНФРА-М, 2014. — 655 с.

29. Современный взгляд на методы определения давности повреждений в практике судебно-медицинского эксперта / А. А. Халиков, К. О. Кузнецов, Г. А.

Канзафарова [и др.] // Судебно-медицинская экспертиза. — 2022. — Т. 65, № 1. — С. 57–61.

30. Судебная медицина / [Болдарян А. А., Буромский И. В., Власюк И. В. [и др.]] ; под редакцией члена-корреспондента РАН Ю. И. Пиголкина. — 2-е изд., перераб. и доп. — Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2021. — 671 с.

31. Судебно-медицинская диагностика давности повреждений мягких тканей и внутренних органов гистологическими методами : Методические рекомендации / Д. В. Богомолов, И. Н. Богомолова, В. А. Фетисов, Е. А. Киреева ; Министерство здравоохранения и социального развития Российской Федерации, Федеральное государственное учреждение "Российский центр судебно-медицинской экспертизы". — Москва : Федеральное государственное учреждение "Российский центр судебно-медицинской экспертизы" Минздравсоцразвития России, 2010. — 24 с.

32. Судебно-медицинская диагностика прижизненности странгуляционной борозды морфологическими методами / Д. В. Богомолов, Ю. В. Збруева, В. А. Путинцев, О. П. Денисова // Судебно-медицинская экспертиза. — 2016. — Т. 59, № 2. — С. 40–43.

33. Сундуков, Д. В. Судебно-медицинская оценка сосудистых реакций при тупой сочетанной травме различной давности / Д. В. Сундуков, М. Н. Ларина // Материалы IV Всероссийского съезда судебных медиков : тезисы докладов. — Владимир, 1996. — №1. — С. 94-95.

34. Суркова, Е. И. Определение давности механических повреждений иммуногистохимическим методом / Е. И. Суркова // Проблемы экспертизы в медицине. — 2014. — Т. 56, № 4. — С. 12–14.

35. 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.

36. 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.

37. 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.

38. Федулова, М. В. Применение антител к TGFβ1 для иммуногистохимического установления прижизненности повреждений кожи тупыми твердыми предметами : Методические рекомендации / М. В. Федулова, Д. Д. Куприянов. — Москва : «РЦСМЭ» Минздрава России, 2024. — 16 с.

39. Фролова, И. А. Определение давности повреждения мягких тканей при механической травме по морфологическим критериям : Информационное письмо / И. А. Фролова, Н. Д. Асмолова, Р. А. Назарова. — Москва, ГУ «Бюро судебно-медицинской экспертизы» Министерства здравоохранения Московской области. — 2007.

40. Халиков, А. А. Современное состояние вопроса диагностики давности механической травмы / А. А. Халиков, Д. А. Еникеев, А. Н. Шарафутдинов // Медицинский вестник Башкортостана. — 2011. — Т. 6, № 5. — С. 154–159.

41. Хасанянова, С. В. Судебно-медицинское определение давности образования прижизненных кожных ран : автореферат дис. ... кандидата медицинских наук : 14.00.24 / С. В. Хасанянова. — Ижев. гос. мед. акад. — Ижевск, 2002. — 21 с.

42. Хромова, А. М. Р-селектин как маркёр ранней прижизненной реакции в поврежденных мягких тканей / А. М. Хромова // Проблемы экспертизы в медицине. — 2002. — Т. 2, № 2(6). — С. 48.

43. Хромова, А. М. Использование иммуногистоцитохимии для целей судебной медицины (предварительное сообщение) / А. М. Хромова, Ю. П.

Калинин // Проблемы экспертизы в медицине. — 2003. — Т. 3, № 2(10). — С. 34–36.

44. Чихиржина, Е. В. Внеядерные функции негистонового белка HMGB1 / Е. В. Чихиржина, А. М. Поляничко, Т. Ю. Старкова // Цитология. — 2020. — Т. 62, № 10. — С. 716-725.

45. Шишкин, И. П. Травматические кровоподтеки прижизненные и посмертные : Микроскоп. исслед. : Дис. на степ. д-ра мед. Ивана Павловича Шишкина / И. П. Шишкин. — Из Судеб.-мед. лаб. акад. Н.П. Ивановского. — Санкт-Петербург : тип. Штаба Отд. корп. жанд., 1895. — 32 с.

46. A local uPAR-plasmin-TGF β 1 positive feedback loop in a qualitative computational model of angiogenic sprouting explains the in vitro effect of fibrinogen variants / S. E. M. Boas, J. Carvalho, M. van den Broek [et al.] // PLOS Computational Biology. — 2018. — 2003. Vol. 14, № 7. — e1006239.

47. 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 / F. R. Van de Goot, H. I. Korkmaz, J. Fronczek [et al.] // Forensic Science International. — 2014. — Vol. 244. — P. 128–135.

48. Algood, H. M. Helicobacter pylori persistence: an overview of interactions between H. pylori and Host Immune Defenses / H. M. Algood, L. C. Timothy // Clinical Microbiology Reviews. — 2006. — Vol. 19, № 4. — P. 597–613.

49. Analysis of inflammatory cells and mediators in skin wound biopsies to determine wound age in living subjects in forensic medicine / J. Fronczek, R. Lulf, H. I. Korkmaz [et al.] // Forensic Science International. — 2015. — Vol. 247. — P. 7–15.

50. Analysis of morphological characteristics and expression levels of extracellular matrix proteins in skin wounds to determine wound age in living subjects in forensic medicine / J. Fronczek, R. Lulf, H. I. Korkmaz [et al.] // Forensic Science International. — 2015. — Vol. 246. — P. 86–91.

51. Aquaporin 1 and 3 as local vitality markers in mechanical and thermal skin injuries / J. Prangenberg, E. Doberentz, A.-L. Witte, B. Madea // International Journal of Legal Medicine. — 2021. — Vol. 135, № 5. — P. 1837–1842.

52. Aquaporin-3 in Cancer / S. Marlar, H. H. Jensen, F. H. Login, L. N. Nejsum // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2017. — Vol. 18. — P. 2106–2117.
53. Aquaporin-3 in keratinocytes and skin: its role and interaction with phospholipase D2 / H. Qin, X. Zheng, X. Zhong [et al.] // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. — 2011. — Vol. 508, № 2. — P. 138–143.
54. Aquaporin-Targeted Therapeutics: State-of-the-Field / L. Tradtrantip, B.-J. Jin, X. Yao [et al.] // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. — 2017. — Vol. 969. — P. 239–250.
55. Aquaporins in the Skin / R. Patel, L. Kevin Heard, X. Chen, W. B. Bollag // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. — 2017. — Vol. 969. — P. 173–191.
56. Are mast cells implicated in asphyxia? / B. Muciaccia, C. Sestili, S. De Grossi [et al.] // *International Journal of Legal Medicine*. — 2016. — Vol. 130, № 1. — P. 153–161.
57. Ashika Riswana, N. Role of growth factors in wound healing / N. Ashika Riswana, K. R. Don // *Drug Invention Today*. — 2019. — Vol. 11, № 2. — P. 458–464.
58. Autophagy in skin wounds: a novel marker for vital reactions / A. Kimura, Y. Ishida, M. Nosaka [et al.] // *International Journal of Legal Medicine*. — 2015. — Vol. 129, № 3. — P. 537–541.
59. Benga, G. Water channel proteins (later called aquaporins) and relatives: past, present, and future / G. Benga // *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*. — 2009. — Vol. 61, № 2. — P. 112–133.
60. Bennett, N. T. Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors / N. T. Bennett, G. S. Schultz // *The American Journal of Surgery*. — 1993. — Vol. 165, № 6. — P. 728–737.
61. Bennett, N. T. Growth factors and wound healing: Part II. Role in normal and chronic wound healing. / N. T. Bennett, G. S. Schultz // *The American Journal of Surgery*. — 1993. — Vol. 166, № 1. — P. 74–81.
62. Benyon, R. C. The human skin mast cell / R. C. Benyon // *Clinical and Experimental Allergy*. — 1989. — Vol. 19, № 4. — P. 375–387.

63. Betz, P. Immunohistochemical parameters for the age estimation of human skin wounds. A review / P. Betz // *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*.— 1995. — Vol. 16, № 3. — P. 203–209.
64. Brown, D. The Discovery of Water Channels (Aquaporins) / D. Brown // *Annals of Nutrition and Metabolism*.— 2017. — Vol. 70 suppl. 1. — P. 37–42.
65. Capatina, C. O. Usefulness of Fibronectin and P-selectin as markers for vital reaction in uncontrolled conditions / C. O. Capatina, M. Ceașu, S. Hostiuc // *Romanian Journal of Legal Medicine*.— 2013. — Vol. 21, № 4. — P. 281–286.
66. Cecchi, R. Estimating wound age: looking into the future / R. Cecchi // *International Journal of Legal Medicine*. — 2010. — Vol. 124, № 6. — P. 523–536.
67. Chen, R. The mechanism of HMGB1 secretion and release / R. Chen, R. Kang, D. Tang // *Experimental & Molecular Medicine*. — 2022. — Vol. 54. — P. 91–102.
68. Clark, R. A. Fibrin and wound healing / R. A. Clark // *Annals of the New York Academy of Sciences*. — 2001. — Vol. 936. — P. 355–367.
69. Current view of the role of transforming growth factor beta 1 in skin carcinogenesis / A. G. Li, S.-L. Lu, G. Han, M. Kulesz-Martin, X.-J. Wang // *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. — 2005. — Vol. 10, № 2. — P. 110–117.
70. Cytokines as new biomarkers of skin wound vitality / P. -A. Peyro, S. Colomb, D. Becas [et al.] // *International Journal of Legal Medicine*. — 2021. — Vol. 135, № 6. — P. 2537–2545.
71. Dajani, S. Water transport proteins-aquaporins (AQPs) in cancer biology / S. Dajani, A. Saripalli, N. Sharma-Walia // *Oncotarget*. — 2018. — № 9. — P. 36392–36405.
72. Detection of the Timing of Human Skin Wounds by Immunohistochemical Analysis of CD14 / A. A. Fouad, F. M. M. B. El Dine, H. M. K. El Dine Menesy // *Arab Journal of Forensic Sciences and Forensic Medicine*. — 2019. — Vol. 1, № 10. — P. 1346–1357.

73. Dettmeyer, R. B. Forensic histopathology. Fundamentals and perspectives / R. B. Dettmeyer. — Berlin–Heidelberg : Springer-Verlag, 2011.
74. Diegelmann, R. F., Evans, M. C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing / R. F. Diegelmann, M.C. Evans // *Frontiers in Bioscience*. — 2004. — № 9. — P. 283–289.
75. Endothelial selectins regulate skin wound healing in cooperation with L-selectin and ICAM-1 / T. Yukami, M. Hasegawa, Y. Matsushita [et al.] // *Journal of Leukocyte Biology*. — 2007. — Vol. 82, № 3. — P. 519–531.
76. Enhanced expression of selectins in human skin wounds / J. Dressler, L. Bachmann, R. Koch, E. Müller // *International Journal of Legal Medicine*. — 1998. — Vol. 112, № 1. — P. 39–44.
77. Erban, J. K. P-selectin and wound healing / J. K. Erban // *Behring Institute Mitteilungen*. — 1993. — Vol. 92. — P. 248–57.
78. Estimation of wound age and VCAM-1 in human skin / J. Dressler, L. Bachmann, R. Koch, E. Müller // *International Journal of Legal Medicine*. — 1999. — Vol. 112, № 3. — P. 159–162.
79. Expression of fibronectin suicidal in gunshot wounds / J. Balazic, A. Grajn, E. Kralj [et al.] // *Forensic Science International*. — 2005. — Vol. 147 Suppl. — P. S5–S7.
80. Expression of adhesion molecules in skin wounds: diagnostic value in legal medicine / J. Dressler, L. Bachmann, P. Strejc [et al.] // *Forensic Science International*. — 2000. — Vol. 113, № 1-3. — P. 173–176.
81. Fatal trauma to the neck: immunohistochemical study of local injuries / A. Fieguth, D. Franz, R. Lessig, W. J. Kleemann // *Forensic Science International*. — 2003. — Vol. 135, № 3. — P. 218–225.
82. Forensic application of epidermal AQP3 expression to determination of wound vitality in human compressed neck skin. / Y. Ishida, Y. Kuninaka, M. Nosaka [et al.] // *International Journal of Legal Medicine*. — 2018. — Vol. 132, № 5. — P. 1375–1380.

83. Forensic diagnosis of ante- and postmortem burn based on aquaporin-3 gene expression in the skin / H. Kubo, T. Hayashi, K. Ago [et al.] // *Legal Medicine* (Tokyo). — 2014. — Vol. 16, № 3. — P. 128–134.

84. FVIIIra, CD15, and tryptase performance in the diagnosis of skin stab wound vitality in forensic pathology / G. Gauchotte, M.-P. Wissler, J.-M. Casse [et al.] // *International Journal of Legal Medicine*. — 2013. — Vol. 127, № 5. — P. 957–965.

85. Gilfillan, A. M. Regulation of mast cell responses in health and disease / A. M. Gilfillan, M. A. Beaven // *Critical ReviewsTM in Immunology*. — 2011. — Vol. 31, № 6. — P. 475–529.

86. Gillitzer, R. Chemokines in cutaneous wound healing / R. Gillitzer, M. Goebeler // *Journal of Leukocyte Biology*. — 2001. — Vol. 69, № 4. — P. 513–521.

87. Grellner, W. Immunohistochemical detection of fibronectin in postmortem incised wounds of porcine skin / W. Grellner, S. Dimmeler, B. Madea // *Forensic Science International*. — 1998. — Vol. 97, № 2–3. — P. 109–116.

88. Grellner, W. Quantitative analysis of proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α) in human skin wound / W. Grellner, T. Georg, J. Wilske // *Forensic Science International*. — 2000. — Vol. 113, № 1–3. — P. 251–264.

89. Grellner, W. Time-dependent immunohistochemical detection of proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α) in human wounds / W. Grellner // *Forensic Science International*. — 2002. — Vol. 130, № 2–3. — P. 90–96.

90. Grellner, W. Transforming growth factors (TGF- α and TGF- β 1) in the determination of vitality and wound age: immunohistochemical study on human skin wounds / W. Grellner, S. Vieler, B. Madea // *Forensic Science International*. — 2005. — Vol. 153, № 2–3. — P. 174–180.

91. Grellner, W. Demands on scientific studies: Vitality of wounds and wound age estimation / W. Grellner, B. Madea // *Forensic Science International*. — 2007. — Vol. 165, № 2–3. — P. 150–154.

92. Hara-Chikuma, M. Aquaporin-3 functions as a glycerol transporter in mammalian skin / M. Hara-Chikuma, A. S. Verkman // *Biology of the Cell*. — 2005. — Vol. 97, № 7. — P. 479–486.

93. Hara-Chikuma, M. Roles of Aquaporin-3 in the Epidermis / M. Hara-Chikuma, A. S. Verkman // *Journal of Investigative Dermatology*. — 2008. — Vol. 128, № 9. — P. 2145–2151.
94. Hausmann, R. The time-related expression of p53 protein in human skin wounds--a quantitative immunohistochemical analysis / R. Hausmann, A. Nerlich, P. Betz // *International Journal of Legal Medicine*. — 1998. — Vol. 111, № 4. — P. 169–172.
95. Hernández-Cueto, C. Advances in the diagnosis of wound vitality: a review / C. Hernández-Cueto, E. Girela, D. J. Sweet // *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*. — 2000. — Vol. 21, № 1. — P. 21–31.
96. High Mobility Group Box 1 (HMGB1): Molecular Signaling and Potential Therapeutic Strategies / S. Datta, M. A. Rahman, S. Koka, K. M. Boini // *Cells*. — 2024. — Vol. 13, № 23. — P. 1946.
97. HMGB1-RAGE, A Useful Partnership in Vital Response? / S. Deacu, L. Neculai-Câdea, P. Ștefan [et al.] // *ARS Medica Tomitana*. — 2021. — Vol. 27, № 2. — P. 99–105.
98. HMGB1: A new marker for estimation of the postmortem interval / K. Kikuchi, K. I. Kawahara, K. K. Biswas // *Experimental and Therapeutic Medicine*. — 2010. — Vol. 1, № 1. — P. 109–111.
99. Immunohistochemical analysis of P-Selectin as a possible marker of vitality in human cutaneous wounds / J. A. Ortiz-Rey, J. M. Suárez-Peñaranda, P. San Miguel [et al.] // *Journal of Forensic and Legal Medicine*. — 2008. — Vol. 15, № 6. — P. 368–372.
100. Immunohistochemical analysis on cyclooxygenase-2 for wound age determination / Y. Ishida, A. Kimura, M. Nosaka [et al.] // *International Journal of Legal Medicine*. — 2012. — Vol. 126, № 3. — P. 435–440.
101. Immunohistochemical analysis on MMP-2 and MMP-9 for wound age determination / Y. Ishida, Y. Kuninaka, M. Nosaka [et al.] // *International Journal of Legal Medicine*. — 2015. — Vol. 129, № 5. — P. 1043–1048.

102. Immunohistochemical detection of CD14 and combined assessment with CD32B and CD68 for wound age estimation / Y. Yagi, T. Murase, S. Kagawa [et al.] // *Forensic Science International*. — 2016. — Vol. 262. — P. 113–120.

103. Immunohistochemical detection of intrathrombotic IL-6 and its application to thrombus age estimation / M. Nosaka, Y. Ishida, A. Kimura [et al.] // *International Journal of Legal Medicine*. — 2015. — Vol. 129, № 5. — P. 1021–1025.

104. Immunohistochemical expression of HMGB1 and related proteins in the skin as a possible tool for determining post-mortem interval: a preclinical study / F. De-Giorgio, E. Bergamin, A. Baldi, R. Gatta, V. L. Pascali // *Forensic science, medicine, and pathology*. — 2024. — Vol. 20, № 1. — P. 149–165.

105. Immunohistochemical localization of fibronectin as a tool for the age determination of human skin wounds / P. Betz, A. Nerlich, J. Wilske [et al.] // *International Journal of Legal Medicine*. — 1992. — Vol. 105, № 1. — P. 21–26.

106. Immunohistochemical localization of mast cells as a tool for the discrimination of vital and postmortem lesions / A. Bonelli, S. Bacci, G. B. Vannelli, G. A. Norelli // *International Journal of Legal Medicine*. — 2003. — Vol. 117, № 1. — P. 14–18.

107. Immunological Significance of HMGB1 Post-Translational Modification and Redox Biology / M. S. Kwak, H. S. Kim, B. Lee [et al.] // *Frontiers in Medicine*. — 2020. — Vol. 10, № 11. — P. 1189.

108. Implication of High-mobility group box-1 and skin post mortem changes in estimation of time passed since death: Animal and human study / E. Ahmed Alaa El-Din, S. Mohamed Ahmed, D. Abdallah El Shafei, H. El-Sayed Mostafa // *Legal medicine (Tokyo, Japan)*. — 2021. — Vol. 53. — P. 101949.

109. Ishida, Y. Bone Marrow-Derived Cells and Wound Age Estimation / Y. Ishida, M. Nosaka, T. Kondo // *Frontiers in Medicine*. — 2013. — Vol. 33, № 2. — P. 822572.

110. Khalil, N. TGF-beta: from latent to active / N. Khalil // *Microbes and Infection*. — 1999. — Vol. 1, № 15. — P. 1255–1263.

111. Kim, W. J. Cellular signaling in tissue regeneration / W. J. Kim // *Yonsei Medical Journal*. — 2000. — Vol. 41, № 6. — P. 692–703.
112. Kiritsi, D. The role of TGF β in wound healing pathologies / D. Kiritsi, A. Nyström // *Mechanisms of Ageing and Development*. — 2018. — Vol. 172. — P. 51–58.
113. Kondo, T. Timing of skin wounds / T. Kondo // *Legal Medicine (Tokyo)*. — 2007. — Vol. 9, № 2. — P. 109–114.
114. Kondo, T. Molecular pathology of wound healing / T. Kondo, Y. Ishida // *Forensic Science International*. — 2010. — Vol. 203, № 1–3. — P. 93–98.
115. Lawrence, W. T. Growth factors in wound healing / W. T. Lawrence, R. F. Diegelmann // *Clinics in Dermatology*. — 1994. — Vol. 12, № 1. — P. 157–169.
116. Ley, K. The role of selectins in inflammation and disease / K. Ley // *Trends in Molecular Medicine*. — 2003. — Vol. 9, № 6. — P. 263–268.
117. Liu, H. Aquaporins in development -- a review / H. Liu, E. M. Wintour // *Reproductive Biology and Endocrinology*. — 2005. — № 3. — P. 18.
118. Looking for new biomarkers of skin wound vitality with a cytokine-based multiplex assay: preliminary study / P.-A. Peyron, É. Baccino, N. Nagot [et al.] // *Annales de Biologie Clinique*. — 2017. — Vol. 75, № 1. — P. 53–60.
119. Martin, P. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly / P. Martin, S. J. Leibovich // *Trends in Cell Biology*. — 2005. — Vol. 15, № 11. — P. 599–607.
120. Mast cells and their mediators in cutaneous wound healing--active participants or innocent bystanders? / M. Artuc, B. Hermes, U. M. Steckelings [et al.] // *Experimental Dermatology*. — 1999. — Vol. 8, № 1. — P. 1–16.
121. Mast Cells Are Critical Regulators of Bone Fracture–Induced Inflammation and Osteoclast Formation and Activity / J. Kroner, A. Kovtun, J. Kemmler [et al.] // *Journal of Bone and Mineral Research*. — 2007. — Vol. 12, № 32. — P. 2431–2444.
122. Mast cells as sources of cytokines, chemokines, and growth factors / K. Mukai, M. Tsai, H. Saito, S. J. Galli // *Immunological Reviews*. — 2018. — Vol. 282, № 1. — P. 121–150.

123. Mast cell distribution in normal adult skin / A. S. Janssens, R. Heide, J. C. den Hollander [et al.] // *Journal of Clinical Pathology*. — 2005. — Vol. 58, № 3. — P. 285–289.
124. Mast cells in health and disease / C. L. Weller, S. J. Collington, T. Williams, J. R. Lamb // *Clinical Science*. — 2011. — Vol. 120, № 11. — P. 473–484.
125. Mast cell reactivity at the margin of human skin wounds: An early cell marker of wound survival? / M. Oehmichen, T. Gronki, C. Meissner [et al.] // *Forensic Science International*. — 2009. — Vol. 191, № 1–3. — P. 1–5.
126. Moosavi, M.-S. Aquaporins 1, 3 and 5 in Different Tumors, their Expression, Prognosis Value and Role as New Therapeutic Targets / M.-S. Moosavi, Y. Elham // *Pathology & Oncology Research*. — 2020. — Vol. 26. — P. 615–625.
127. Myeloperoxidase and CD15 With Glycophorin C Double Staining in the Evaluation of Skin Wound Vitality in Forensic Practice / G. Gauchotte, A. Bochnakian, P. Campoli [et al.] // *Frontiers in Medicine*. — 2022. — Vol. 9. — P. 910093.
128. Ng, M.F.Y. The role of mast cells in wound healing / M.F.Y. Ng // *International Wound Journal*. — 2010. — Vol. 7, № 1. — P. 55–61.
129. Oehmichen, M. Mononuclear cells in subcutaneous haemorrhage with special consideration of myeloid precursor cells / M. Oehmichen, A. Windisch, C. Meissner // *Medicine, Science and the Law*. — 2000. — Vol. 40, № 4. — P. 286–292.
130. Oehmichen, M. Vitality and time course of wounds / M. Oehmichen // *Forensic Science International*. — 2004. — Vol. 144, № 2–3. — P. 221–231.
131. Papadopoulos, M. C. Aquaporins and cell migration / M. C. Papadopoulos, S. Saadoun, A. S. Verkman // *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. — 2007. — Vol. 456. — P. 693–700.
132. Plasma transforming growth factor-beta1 level in inflammatory bowel disease / Z. M. Y. Kiliç, S. Ayaz, Y. Ozin [et al.] // *Turkish Journal of Gastroenterology*. — 2009. — Vol. 20, № 3. — P. 165–170.
133. Polek, A. P-selectin and its role in some diseases / A. Polek, W. Sobiczewski, J. Matowicka-Karna // *Advances in Hygiene and Experimental Medicine*. — 2009. — Vol. 63. — P. 465–470.

134. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis / P. Bankhead, M. B. Loughrey, J. A. Fernández [et al.] // *Scientific Reports*. — 2017. — Vol. 7, № 1. — P. 16878.
135. Raekallio, J. Determination of the age of wounds by histochemical and biochemical methods / J. Raekallio // *Forensic Science*. — 1972. — № 1. — P. 3–16.
136. Raekallio J. Histochemical and biochemical estimation of the age of injuries / J. Raekallio // *Zeitschrift für Rechtsmedizin*. — 1973. — Vol. 73, № 2. — P. 83–102.
137. Rao, K. N. Mast cells: multifaceted immune cells with diverse roles in health and disease / K. N. Rao, M. A. Brown // *Annals of the New York Academy of Sciences*. — 2008. — Vol. 1143. — P. 83–104.
138. Revisiting the regulatory roles of the TGF- β family of cytokines / K. Fujio, T. Komai, M. Inoue [et al.] // *Autoimmunity Reviews*. — 2016. — Vol. 15, № 9. — P. 917–922.
139. Roberts, A. B. TGF-beta: regulation of extracellular matrix // A. B. Roberts, B. K. McCune, M. B. Sporn // *Kidney International*. — 1992. — Vol. 41. — P. 557–559.
140. Role of Endothelial Selectins in Wound Repair / M. Subramaniam, S. Saffaripour, L. Van De Water [et al.] // *The American Journal of Pathology*. — 1997. — Vol. 150, № 5. — P. 1701–1709.
141. Scaffidi, P. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation / P. Scaffidi, T. Misteli, M. E. Bianchi // *Nature*. — 2002 Jul — Vol. 11, № 418(6894). — P. 191–195.
142. Schiller, M. TGF-beta-induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing / M. Schiller, D. Javelaud, A. Mauviel // *Journal of Dermatological Sciences*. — 2004. — Vol. 35, № 2. — P. 83–92.
143. Schmidt, S. The molecular basis of leukocyte recruitment and its deficiencies / S. Schmidt, M. Moser, M. Sperandio // *Molecular Immunology*. — 2013. — Vol. 55, № 1. — P. 49–58.

144. Schultz, G. EGF and TGF- α in wound healing and repair / G. Schultz, D. S. Rotatori, W. Clark // *Journal of Cellular Biochemistry*. — 1991. — Vol. 45, № 4. — P. 346–352.
145. Skin aquaporins: function in hydration, wound healing, and skin epidermis homeostasis / M. Boury-Jamot, J. Daraspe, F. Bonté [et al.] // . — 2009. — Vol. 190. — P. 205–217.
146. Stem cells and growth factors in wound healing / M. Pikuła, P. Langa, P. Kosikowska, P. Trzonkowski // *Advances in Hygiene and Experimental Medicine*. — 2015. — Vol. 69. — P. 874–885.
147. Sulaiman, W. Transforming growth factor beta 1, a cytokine with regenerative functions / W. Sulaiman, D.H. Nguyen // *Neural Regeneration Research*. — 2016. — Vol. 11, № 10. — P. 1549–1552.
148. The cytokine activity of HMGB1 / H. Yang, H. Wang, C. J. Czura, K. J. Tracey // *Journal of Leukocyte Biology*. — 2005. — Vol. 78, № 1. — P. 1–8.
149. The markers of wound vitality in forensic pathology / G. Gauchotte, L. Martrille, F. Plénat, J.-M. Vignaud // *Annales de Pathologie*. — 2022. — Vol. 9.— P. 93–101.
150. Time-dependent pericellular expression of collagen type IV, laminin, and heparan sulfate proteoglycan in myofibroblasts / P. Betz, A. Nerlich, J. Wilske [et al.] // *International Journal of Legal Medicine*. — 1992. — Vol. 105, № 3. — P. 169–172.
151. Time dependence of the expression of ICAM-1 (CD 54) in human skin wounds / J. Dressler, L. Bachmann, M. Kasper [et al.] // *International Journal of Legal Medicine*. — 1997. — Vol. 110, № 6. — P. 299–304.
152. Transforming growth factor β 1 (TGF β 1) in physiology and pathology / D. Kajdaniuk, B. Marek, H. Borgiel-Marek, B. Kos-Kudła // *Endokrynologia Polska*. — 2013. — Vol. 64, № 5. — P. 384–396.
153. Transforming growth factor beta-dependent sequential activation of Smad, Bim, and caspase-9 mediates physiological apoptosis in gastric epithelial cells / M. Ohgushi, S. Kuroki, H. Fukamachi [et al.] // *Molecular and Cellular Biology*. — 2005. — Vol. 25, № 22. — P. 10017–10028.

154. Tryptase, CD15 and IL-15 as reliable markers for the determination of soft and hard ligature marks vitality / E. Turillazzi, G. Vacchiano, A. Luna-Maldonado // *Histology and Histopathology*. — 2010. — Vol. 25, № 12. — P. 1539–1546.

155. Van de Goot, F.R. , Fronczek J. The dating of injury; the five step approach. A clinical method to enlighten forensic aspects / F.R. Van de Goot, J. Fronczek. // Rutty, G. N. *Essentials of Autopsy Practice: Reviews, Updates, and Advances* / G. N. Rutty. — London : Springer International Publishing AG, 2017.

156. Van Der Laan, N. Immunohistopathological appearance of three different types of injury in human skin / N. Van Der Laan, L. F. de Leij, H. J. ten Duis // *Inflammation Research*. — 2001. — Vol. 50, № 7. — P. 350–356.

157. Van Mourik, J. A. Biogenesis and exocytosis of Weibel-Palade bodies / J. A. van Mourik, T. Romani de Wit, J. Voorberg // *Histochemistry and Cell Biology*. — 2002. — Vol. 117, № 2. — P. 113–122.

158. Verkman, A. S. More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins / A. S. Verkman // *Journal of Cell Science*. — 2005. — Vol. 118. — P. 3225–3232.

159. Verkman, A. S. Aquaporins: translating bench research to human disease / A. S. Verkman // *Journal of Experimental Biology*. — 2009. — Vol. 212. — P. 1707–1715.

160. Verkman, A. S. Aquaporins—new players in cancer biology / A. S. Verkman, M. Hara-Chikuma, M. C. Papadopoulos // *Journal of Molecular Medicine*. — 2008. — Vol. 86, № 5. — P. 523–529.

161. Vitality and wound-age estimation in forensic pathology: review and future prospects / N. Li, Q. Du, R. Bai, J. Sun // *Forensic Sciences Research*. — 2018. — Vol. 5, № 1. — P. 15–24.

162. Werner S. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines / S. Werner, R. Grose // *Physiological Reviews*. — 2003. — Vol. 83. — P. 836–870.

163. Werner S. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing / S. Werner, T. Krieg, H. Smola // *Journal of Investigative Dermatology*. — 2007. — Vol. 127, № 5. — P. 998–1008.

164. What is the physiological function of mast cells? / M. Maurer, T. Theoharides, R. D. Granstein [et al.] // *Experimental Dermatology*. — 2003. — Vol. 12, № 6. — P. 886–910.

165. Wound age estimation by simultaneous detection of 9 cytokines in human dermal wounds with a multiplex bead-based immunoassay: an estimative method using outsourced examinations / M. Takamiya, H. Biwasaka, K. Saigusa [et al.] // *Legal Medicine (Tokyo)*. — 2009. — Vol. 11, № 4. — P. 186–190.

166. Wulff, B. C. Mast cell activity in the healing wound: More than meets the eye? / B. C. Wulff, T. A. Wilgus // *Experimental Dermatology*. — 2013. — Vol. 22, № 8. — P. 507–510.

167. Zarzynska, J. M. Two faces of TGF-beta1 in breast cancer / J. M. Zarzynska // *Mediators of Inflammation*. — 2014. — 141747.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

1. Рисунок 1 – Вид участка кожи для автоматического распознавания в программе QuPath с. 52
2. Рисунок 2 – Результат автоматического распознавания тучных клеток в программе QuPath с. 52
3. Рисунок 3 – Прижизненное кровоизлияние; спазм мелкой артерии. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200 с. 56
4. Рисунок 4 – Посмертное кровоизлияние; полнокровие паретичной вены. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200 с. 56
5. Рисунок 5 – Экспрессия TGFβ1 в эпидермисе 1 балл. ИГХ с антителами к TGFβ1. Ув. 400 с. 58
6. Рисунок 6 – Экспрессия TGFβ1 в эпидермисе 2 балла. ИГХ с антителами к TGFβ1. Ув. 400 с. 58
7. Рисунок 7 – Экспрессия TGFβ1 в эпидермисе 3 балла. ИГХ с антителами к TGFβ1. Ув. 400 с. 59
8. Рисунок 8 – Экспрессия TGFβ1 в эпидермисе 4 балла. ИГХ с антителами к TGFβ1. Ув. 200..... с. 59
9. Рисунок 9 – Экспрессия TGFβ1 в образцах 1, 2, 3 групп, баллы, $n=29$, $p<10^{-5}$ с. 60
10. Рисунок 10 – Схема активации и воздействия TGFβ1 с. 63
11. Рисунок 11 – Экспрессия CD62p в эндотелии сосуда рядом с мелкоочаговым кровоизлиянием во фрагменте кожи с посмертно причиненным повреждением. ИГХ с антителами к CD62p. Ув. 200 с. 65
12. Рисунок 12 – Экспрессия AQP3 средней выраженности в кератиноцитах эпидермиса, прижизненное повреждение. ИГХ с антителами к AQP3. Ув. 200 с. 69

13. Рисунок 13 – Выраженная экспрессия AQP3 в кератиноцитах эпидермиса, посмертное повреждение. ИГХ с антителами к AQP3. Ув. 200 с. 69
14. Рисунок 14 – Фрагмент кожи с прижизненной странгуляционной бороздой, выраженная экспрессия AQP3 в кератиноцитах эпидермиса. ИГХ с антителами к AQP3. Ув. 200 с. 73
15. Рисунок 15 – Фрагмент кожи с посмертной ссадиной, незначительно менее выраженная (чем на рисунке 14) экспрессия AQP3 в кератиноцитах эпидермиса. ИГХ с антителами к AQP3. Ув. 200 с. 73
16. Рисунок 16 – Отсутствие цитоплазматической экспрессии HMGB1 в кератиноцитах эпидермиса. ИГХ с антителами к HMGB1. Ув. 200..... с. 75
17. Рисунок 17 – Цитоплазматическая экспрессия HMGB1 1 балл в кератиноцитах эпидермиса. ИГХ с антителами к HMGB1. Ув. 200..... с. 75
18. Рисунок 18 – Цитоплазматическая экспрессия HMGB1 2 балла (в базальном слое 3 балла) в кератиноцитах эпидермиса. ИГХ с антителами к HMGB1. Ув. 200..... с. 76
19. Рисунок 19 – Диаграмма выраженности экспрессии HMGB1 по группам образцов..... с. 78
20. Рисунок 20 – Дегрануляция дермальных тучных клеток в области прижизненного повреждения. Окраска азуром-II и эозином. Ув. 630..... с. 81
21. Рисунок 21 – Плотность дермальных тучных клеток в образцах 1, 2, 3 групп, клеток/мм², n=40, p<10⁻⁵ с. 83
22. Рисунок 22 – Прирост плотности тучных клеток в образцах 1 и 3 групп над 2 группой, %, n=40, p<10⁻⁵..... с. 88

23.	Рисунок 23 – Зависимость вероятности правильного обнаружения (ось Y, %) прижизненного повреждения от величины прироста плотности (ось X, %)	с. 88
24.	Таблица 1 – ИГХ маркеры ранней реакции на повреждение (данные литературы)	с. 43
25.	Таблица 2 – Количество исследованного материала в серийном эксперименте	с. 45
26.	Таблица 3 – Оценка экспрессии TGF β 1 в эпидермисе	с. 57
27.	Таблица 4 – Результаты исследования экспрессии TGF β 1	с. 60
28.	Таблица 5 – Результаты исследования экспрессии CD62p	с. 65
29.	Таблица 6 – Результаты исследования экспрессии AQP3	с. 68
30.	Таблица 7 – Результаты исследования экспрессии HMGB1.....	с. 74