

УДК [57.083.3:616.15]:57.017.68

## Изменение показателей клеточного и гуморального иммунитета в крови и уровня нитратов/нитритов в зависимости от давности наступления смерти

А.Г. Денисенко, Н.М. Данющенко

Витебский государственный медицинский университет, Витебск, Беларусь

## Change of cellular and humoral immunity in the blood and the level of nitrates/nitrites, depending on the time since of death

A.G. Denisenko, N.M. Danushenkova

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

### Аннотация

С целью установления давности наступления смерти (ДНС) определяли в динамике количество Т- и В-лимфоцитов методом розеткообразования с эритроцитарными CD3, CD4, CD8, CD22, CD25-диагностикумами и концентрации NO в плазме. Выявлены изменения количества Т- и В-лимфоцитов, экспрессирующих молекулы-маркеры CD3, CD4, CD8, CD22, CD25. В период времени 2-6 часов наблюдалось увеличение концентрации NO. В дальнейшем отмечалось снижение концентрации NO при ишемической болезни сердца (ИБС) в промежутке времени от 7 до 16 часов, а при смерти от механических травм – от 12 до 21 часа. Обнаруженные изменения иммунных показателей и концентрации NO в плазме могут быть использованы в судебно-медицинской практике для установления ДНС.

### Ключевые слова

Давность наступления смерти, Т-, В-лимфоциты, экспрессия молекул CD3, CD4, CD8, CD22, CD25, уровень нитратов/нитритов

Проблема диагностики давности наступления смерти (ДНС) разрабатывается на протяжении полутора столетий многими учёными мира. Одним из основных направлений в разработке данной проблемы являются исследования посмертных явлений, протекающих в органах, тканях и жидкостях [1].

### Summary

To establish the remoteness of death changes of leukocytes the amount of T- and B-lymphocytes were analyzed in dynamics by the method of rosetting with erythrocytic CD3, CD4, CD8, CD25, CD22 diagnosticum sets, and NO concentration in plasma was determined, as well. Disturbances of changes in the amount of T- and B-lymphocytes expressing molecules-markers CD3, CD4, CD8, CD25, CD22. Dramatic elevation of NO concentration in plasma was observed in 2-6 hours time interval. Further the decrease of NO concentration was recorded in 7-16 hours time interval in case of deaths due to CHD and in the time interval 12-21 hours in case of deaths due to mechanical traumas. The detected changes of immune indices and NO concentration in plasma may be used to establish the remoteness of death in medicolegal practice.

### Keywords

Time since of death, T- and B-lymphocytes, expression of molecules CD3, CD4, CD8, CD22, CD25, level of nitrates/nitrites

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

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

В последние годы с целью решения вопроса о ДНС судебно-медицинская наука и практика пошла путём поиска новых направлений, связанных с использованием более объективных лабораторных методов исследований. Установлена возможность применения реакции бласттрансформации, розеткообразования Т- и В-лимфоцитов и количественного содержания иммуноглобулинов для определения ДНС, а также сроков пригодности трупной крови для диагностики ДНС при хранении её в различных условиях [4].

Сравнительно недавно установлены уровни нарушения иммунного статуса, клеточного метаболизма и морфогенеза при внезапной кардиальной смерти, алкогольной кардиомиопатии, остром инфаркте миокарда. Изучены, описаны и проанализированы особенности цитокинового баланса при внезапной кардиальной смерти. Предложен алгоритм дифференциальной диагностики, алкогольной кардиомиопатии и атеросклеротической болезни сердца, основанный на комплексе иммунологических и биохимических показателей [3].

В литературе имеются единичные сообщения о роли нитратов/нитритов при определении давности повреждения. Так, исследователями [8] установлено, что в миокарде в первые 3 часа после травмы количество индуцибельной NO-синтазы изменялось незначительно. Через 12 часов отмечалось резкое уменьшение активности этого фермента.

Установлено участие нитропроизводных азота (производных нитратов и нитритов) при многих патологических процессах [6]. Показана важная модулирующая роль NO при стресс-реакции, каковыми являются многие тяжёлые неврологические (черепно-мозговая травма, острые нарушения мозгового кровообращения, прежде всего острая церебральная ишемия) и соматические заболевания (сепсис, шоки, политравма). Запуск стресс-реакции иммунонейроэндокринной системы происходит за счёт активации основных её стрессреализующих осей – гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой и симпатoadреналовой. Стрессор-

ная реакция, которая первично являлась адаптивной, вскоре начинает принимать участие в механизмах патологического процесса: избыточные гормональные изменения вызывают комплекс циркуляторных и метаболических нарушений и замыкают порочные круги патогенеза той или иной болезни [7].

В работе [8] описано 19 случаев смерти пациентов в стационаре от септического шока, у которых отмечался апоптоз нейронов и клеток микроглии головного мозга, а также повышение уровня индуцибельной NO-синтазы и ФНО.

Отмечено, что NO может служить фактором, инициирующим запуск киназного распада основной регуляторной системы, контролирующей экспрессию ряда генов, ответственных за развитие апоптоза клеток [9]. На основании иммуногистохимического исследования изменений количества NO-синтазы в миокарде определены судебно-медицинские критерии давности образования повреждений вследствие механической травмы [5].

Следует отметить, что в литературе отсутствуют сведения о взаимосвязи ДНС, показателями клеточного и гуморального иммунитета и уровнем нитратов/нитритов.

Целью нашего исследования явилось изучение количества Т- и В- лимфоцитов, экспрессирующих молекулы – маркеры CD3, CD4, CD8, CD25, CD22 и уровня нитратов/нитритов в плазме в зависимости от ДНС.

### **Материалы и методы исследования**

Изменение экспрессии CD22 В-лимфоцитами, CD3, CD4, CD8, CD25 Т-лимфоцитами определяли методом розеткообразования с помощью соответствующих эритроцитарных антигенов, любезно предоставленными профессором Д.К. Новиковым [10]. Подсчитывали процент розеткообразующих лимфоцитов при обычной световой микроскопии, явно имевших не менее 3-х прикрепившихся эритроцитов к антигенам с анти-CD моноклональными антителами [10].

Уровень нитритов/нитратов определялся в плазме трупной крови по методике, основанной на восстановлении нитратов до нитритов цинковой пылью в щелочной среде в присутствии аммиачного комплекса сульфата меди с последующей фотометрией [11]. Плазму крови от трупов людей брали в динамике, через 2-6, 7-11, 12-16 и 17-21 час после наступления смерти. Исследовали плазму крови, взятую из правого отдела сердца и крупных сосудов у трупов людей,

умерших от множественных травм (11) и от ИБС (17). С целью депротеинизации к 1 мл плазмы добавляли 1 мл 6% раствора цинка сульфата. Оставляли на 1 час при температуре ниже 15°C. Центрифугировали при 6000 об/мин. После депротеинизации к 1 мл супернатанта добавляли эквивалентное количество гидроксида натрия. Затем опять проводили центрифугирование и 1 мл надосадочной жидкости переносили в соответствующую по нумерации пластиковую пробирку с предварительно добавленными туда 0,11 г цинковой пыли, 0,5 мл аммиачного буфера, 20 мкл аммиачного комплекса сульфата меди. Далее пробирки встряхивали в течение 30 минут. Цинковую пыль осаждали центрифугированием при 3000 об/мин – 10 минут. Из каждой пластиковой пробирки переносили по 1 мл супернатанта в соответствующую по нумерации стеклянную пробирку. В каждую пробирку добавляли по 1 мл сульфаниловой кислоты и оставляли в холодильнике на 10 минут до завершения реакции диазотирования. Затем в каждую пробирку вносили по 1 мл раствора ацетата натрия и 1 мл раствора 1-нафтиламина солянокислого. Измеряли оптическую плотность спустя 30 минут при длине волны 520 нм. Концентрацию нитритов/нитратов рассчитывали по уравнению калибровочного графика с учетом разведения при депротеинизации.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Pimer of Biostatistics. Так как распределение изучаемых величин отличалось от нормального, для описательного статистического анализа применяли показатель медианы, 25 и 75 перцентиль. При сравнении достоверности различий между группами был использован U-критерий Манна-Уитни [12]. Статистически достоверными считали различия при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

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

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

снижение показателя ( $p < 0,05$ ) получено в промежутке времени от 65 до 78 часов 23% [21;28] (табл. 1).

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

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

Снижение экспрессии рецептора на Т-лимфоцитах к ИЛ-2 (CD25) отмечалось в интервалах времени: от 7-16 часов 15,5% до 17-26 часов 13%, через 51-64 часов 5% [13,17;10,14;3,7] ( $p < 0,001$ ), спустя 27-36 часов 10%, 37-50 часов 8% [9,12;6,11] ( $p < 0,01$ ), и через 65-78 часов после наступления смерти 3% [2;5] ( $p < 0,05$ ).

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

Из представленных данных следует, что количество CD3-, CD4-, CD8-, CD25-лимфоцитов характеризуются наивысшей корреляцией с ДНС и силой влияния, что позволяет использовать эти показатели в судебно-медицинской практике (табл. 2).

Для CD3- и CD8-лимфоцитов график имел линейную зависимость, а для показателей CD4- и CD25-лимфоцитов использовалась регрессионная зависимость общего вида  $y = \sqrt{x}$ .

В результате анализа данных, для установления ДНС предлагается реакция с анти-CD3-диагностикумом.

Пример использования предложенного метода. Женщина, 29 лет, умерла от множественных повреждений. Исследовали кровь в промежутке времени от 27 до 32 часов после наступления смерти. Определяли содержание Т-лимфоцитов, экспрессирующих молекулу CD3 – 43%. Используя формулу, определили, что с момента наступления смерти прошло 27 часов.

Для удобства определения ДНС можно использовать графические зависимости показате-

**Таблица 1. Показатели Т-лимфоцитов, экспрессирующих молекулы CD3, CD4, CD8, CD25, CD22 (в %) у лиц (n=10), умерших от прочих причин смерти (механических травм и асфиксий в результате повешения)**

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

Примечание – \* p< 0,05, \*\* - p<0,01, \*\*\* - p<0,001;  
КГ – контрольная группа

**Таблица 2. Наиболее статистически значимые показатели Т-лимфоцитов, экспрессирующих молекулы CD3, CD4, CD8, CD25**

Наиболее значимые показатели CD25	Время наступления смерти		
	CD3	CD4	CD8
r	-0,99	-0,99	-0,99
р	p<0,001	p<0,001	p<0,001
Сила влияния	99,87%	99,40%	99,57%
Уравнения регрессии	t=192,1-25,167*√a	t=106,9-2,7*a	t=86-4,23*a
			t=120,15-

Примечание: t – ДНС в часах; a – процент CD-положительных клеток

лей стандартных эритроцитарных диагностикумов – CD3, CD4, CD8, CD22, CD25 выведенные с помощью регрессионного анализа.

Также установлено, что от множественных травм при оценке кинетики уровня нитритов/нитратов, отражающих нитрозативный стресс (Таблица 2), через 7-11 часов от момента наступления смерти составила 28[27;30], это оказалось выше, чем в контрольной группе доноров – 22[20,5;28,5]. Но через 12-16 часов после смерти уровень показателя нитратов/нитритов оказался ниже и составил 16[14;19](p<0,01), а через 17-21 час снизился до 5[3;8](p<0,001).

В связи с тем, что молекула NO является короткоживущей и не изученной в посмертном периоде, была поставлена задача – изучить изменение уровня нитратов/нитритов в плазме крови трупов, умерших от ИБС и механических травм в зависимости от ДНС (табл.3).

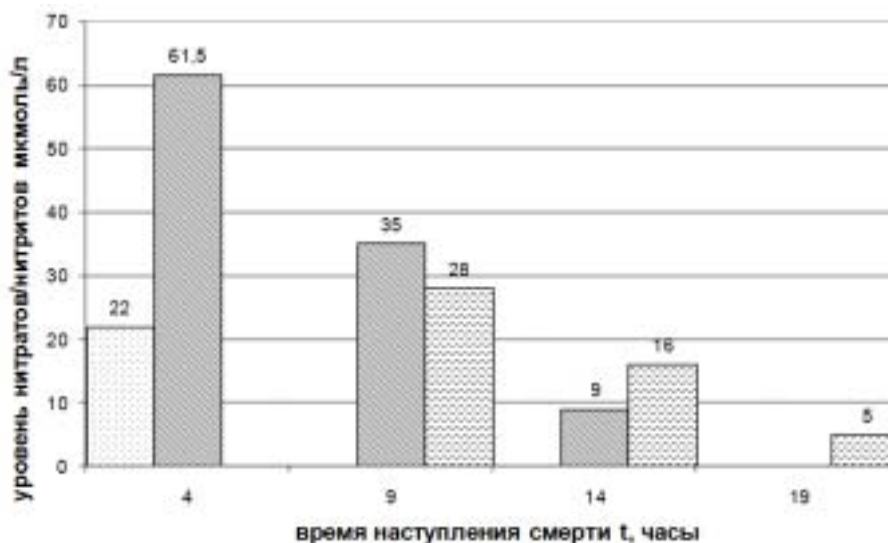
При оценке кинетики уровня нитритов/нитратов, отражающих нитрозативный стресс, через 2-6 часов в первой группе умерших от ИБС (n=17) уровень нитратов/нитритов составил 61,5 (59;66) мкмоль/л, что оказалось намного выше, чем в контрольной группе доноров – 22 (20,48;28,5) мкмоль/л. Далее показатели снижались через 9-11 часов и составили 35 (31;38) мкмоль/л (p<0,01), а через 12-16 часов происходило резкое снижение показателя до 9 (6;12) мкмоль/л (p<0,001).

При оценке динамики уровня нитратов/нитритов, отражающих нитрозативный стресс, установлено, что через 7-11 часов во второй группе умерших от механических травм (n=11) медиана (интерквартильная широта) уровень нитратов/нитритов составил 28 (27;30) мкмоль/л. Это оказалось достоверно выше по сравнению с контрольной группой доноров – 22

**Таблица 3. Зависимость уровня нитратов/нитритов в плазме крови от ДНС умерших от ИБС и механических травм**

Причина смерти	Время, прошедшее с момента наступления смерти (часы)		
	2-6	7-11	12-16
17-21			
ИБС (n=17)	61,5(59-66)	35(31-38)**	9(6-12)***
Механические травмы (n=11)	-	28(27-30)	16(14-9)**
5(3-8)***			
Контрольная группа (n=15)	22 (20,48-28,5) мкмоль/л		

Примечание – \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$



**Рис. 1. Зависимость уровня нитратов/нитритов в плазме крови от ДНС у умерших от ИБС и механических травм**

(20,5;28,5) мкмоль/л. Но через 12-16 часов после смерти уровень нитратов/нитритов в плазме оказался ниже и составил 16 (14;19) мкмоль/л ( $p < 0,01$ ), а через 17-21 час снизился до 5 (3;8) мкмоль/л ( $p < 0,001$ ).

Анализируя полученные данные, можно отметить, что в плазме умерших от ИБС в период времени от 2 до 6 часов после смерти происходило резкое повышение уровня нитратов/нитритов. Затем, начиная с 7 часов после наступления смерти, этот показатель достоверно снижался и к концу суток доходил до нуля (рис. 1).

Проведен регрессионный анализ полученных данных с использованием программы Statgraphics 2.1.

С учетом показателей уровня нитратов/нитритов определять ДНС можно по полученному уравнению (1):

$$t = 21,1 - 0,4345 \cdot a, \quad (1)$$

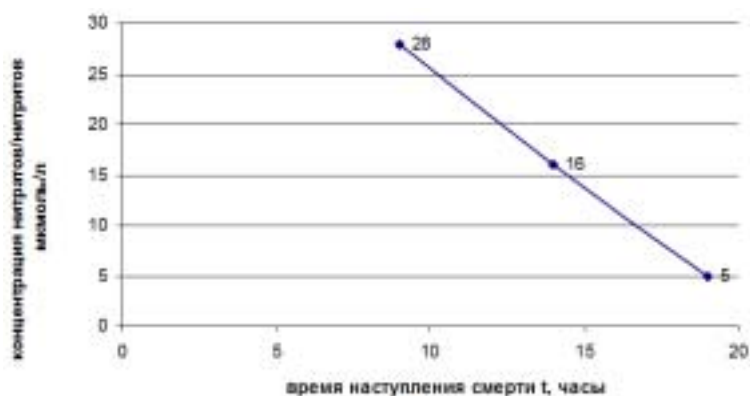
где  $t$  – ДНС;  $a$  – уровень нитратов/нитритов в плазме крови.

Построение осуществляли в линейной регрессионной зависимости. Коэффициент корреляции =  $-0,9996$ ;  $p < 0,001$ .

Приводим пример. Женщина, 29 лет, умерла от тупой сочетанной травмы при падении с высоты. Исследовали кровь через 12 часов после наступления смерти. Определили уровень нитратов/нитритов, который составил 16,25 мкмоль/л. Используя уравнение зависимости уровня нитратов/нитритов в плазме, определяем, что с момента наступления смерти прошло 14 часов.

Для удобства использования метода можно использовать один из графиков зависимости уровня нитратов/нитритов в плазме от ДНС у умерших в результате ИБС и механических травм (рис. 2).





**Рис. 2. Зависимость уровня нитратов/нитритов в плазме крови от ДНС у умерших в результате механических травм**

### Заключение

1. В группе умерших от прочих причин смерти количество Т- и В-лимфоцитов, экспрессирующих молекулы CD3, CD4, CD8, CD22, CD25, достоверно снижается во всех интервалах времени (до 65-78 часов).
2. При определении наиболее значимых показателей для установления ДНС существенных различий, характеризующих изменение фенотипа клеток иммунной системы (CD3-, CD4-, CD8-, CD22-, CD25-лимфоцитов) выявлено не было, что позволяет использовать любой из этих критериев для определения сроков ДНС.
3. Количество CD3-, CD4-, CD8-, CD22-, CD25-лимфоцитов характеризуется наивысшей корреляцией с ДНС и силой влияния, что позволяет использовать методы определения

этих показателей для оценки ДНС с момента и до трех суток после наступления смерти.

4. Определение CD-рецепторов на лимфоцитах при помощи стандартного эритроцитарного диагностикума с моноклональными антителами позволяет определять ДНС по содержанию соответствующих клеток в стандартных условиях.
5. ДНС можно установить по достоверному снижению уровня нитратов/нитритов в плазме умерших людей – до первых суток с момента наступления смерти.
6. Для установления ДНС и практического использования в судебной медицине, по изменениям иммунных показателей крови и уровня нитратов/нитритов в плазме, предложено использовать графики и уравнения, выведенные с помощью регрессионного анализа.

### Литература

1. Мельников Ю.Л., Жаров В.В. Судебно-медицинское определение времени наступления смерти. М.: Медицина; 1978.
2. Казарновская М.Л. Лимфоциты крови в условиях посмертного аутолиза. Репродукция лимфоцитов трупной крови. Кишинев: Штиинца; 1983.
3. Мішин М.Ю. Особливості процесів перекисного окислення при раптовій кардіальній смерті. Україн. суд.-мед. вісн. 2007; 1(20):40-42.
4. Костылев В.И. Зависимость иммунных показателей крови умерших от заболеваний в динамике раннего посмертного периода. Вopr. теории и практики суд.-мед. экспертизы. Запорожье; 1999: 76-77.
5. Соляний А.Н. Возможность судебно-медицинского определения давности повреждения по изменениям фер-

мента NO-синтазы в миокарде. Украин. морфол. альм. 2008; 11(4): 143-144.

6. Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. The Lancet. 1994; 343 (14): 1199-1206.

7. Голиков П.П., Николаева Н.Ю., Гавриленко И.А. Оксид азота и перекисное окисление липидов как факторы эндогенной интоксикации при неотложных состояниях. Пат. физиология и эксперим. терапия. 2000; 2: 6-9.

8. Sharshar T., Margentaler J.A., Landeros K. Apoptosis of neurons in cardiovascular autonomic centres triggered by inducible nitric oxide synthase after death from septic shock. The Lancet. 2003; 362 (9398): 1799-1805.

9. Dwivedi Y., Rizavi H.S., Roberts R.C., Conley R.C., Tammings C.A., Pandey G.N. Preduced activation an expression of ERK

MAP kinas in the post-mortem brain of depressed suicide subjects. *Journal of Neurochemistry*. 2001; 77 (3): 916-28.

10. Новиков Д.К., Новиков П.Д., Янченко В.Я. Методы определения Т- и В-лимфоцитов диагностикумами на основании моноклональных антител. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2000; 2: 31-33.

11. Солодков А.П., Веремей И.С., Осочук С.С., Щербинин И.Ю., Деюн Г.В., Дубровская А.В. Фотометрический метод определения нитратов и нитритов в биологических жидкостях: инструкция по применению. Утв. МЗ РБ., № 91-0008 от 19.03.2001.

12. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: Медиа Сфера; 2006.

#### Сведения об авторах:

Денисенко А.Г. ассистент кафедры судебной медицины ВГМУ. Витебск, ул. Чкалова, д. 11 к. 10, кв. 91.

Данющенко Н.М. доцент кафедры клинической микробиологии. Тел. 22-55-08.

Поступила 14.11.2012 г.