

Ewa Rzepecka-Woźniak

Diagnostyka immunohistochemiczna wczesnego zawału mięśnia sercowego dla celów pośmiertnego badania sądowo-lekarskiego

Immunohistochemical diagnostic management of early stages of myocardial infarction for the purposes of postmortem medicolegal examinations

Z Katedry Medycyny Sądowej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum
Kierownik: prof. dr hab. med. M. Kłys

Pośmiertna diagnostyka zaawansowanego zawału mięśnia sercowego nie stanowi trudności. W przypadku jednak wczesnych faz martwicy na etapie badania makroskopowego niemożliwe jest odróżnienie strefy zawału od prawidłowego mięśnia. Ten fakt, przy podejrzeniu sercowej przyczyny zgonu, rzutuje na sposób pobrania i ilość materiału, a także determinuje dalsze badania. Diagnostyka histopatologiczna wczesnego zawału mięśnia sercowego z użyciem rutynowego barwienia jest również niewystarczająca. Konieczne jest zastosowanie dodatkowych technik specjalnych, mających na celu rozstrzygnięcie istniejących wątpliwości i ostateczną weryfikację rozpoznania. Celem pracy było wdrożenie techniki barwienia immunohistochemicznego C9, wykrywającego wczesny zawał mięśnia sercowego, dla celów pośmiertnej diagnostyki sądowo-lekarskiej, opracowanie zasad interpretacji wyników i porównanie z metodą Nielsena-Selye'go. Przedmiotem badań były wycinki pobrane z mięśnia sercowego podczas 90 sekcji zwłok. Przeprowadzone badania wykazały swoistość odczynu immunohistochemicznego C9 dla niedokrwiennego uszkodzenia mięśnia sercowego. Potwierdziły także większą wartość diagnostyki immunohistochemicznej nad dotychczas stosowaną metodą Nielsena-Selye'go.

A postmortem diagnosis of a "well developed" myocardial infarction is not difficult. In the initial stages of infarction, however, at the stage of gross examination it is impossible to discriminate between the infarcted zone and the undamaged cardiac muscle. When a cardiogenic cause of death is suspected, this fact determines the method of material collection and the amount to be collected, as well as further examinations to be performed. The histopathological

diagnosis of a "fresh" myocardial infarction employing a basic routine staining method (hematoxylin/eosin) is not sufficient either. This makes it necessary to use additional special staining techniques to resolve diagnostic problems, thus verifying the precise diagnosis. The aim of this research was to introduce the immunohistochemical C9 staining technique as a postmortem diagnostic method of detecting recent myocardial infarctions for the purpose of postmortem medicolegal examinations, to develop the principles of result interpretation and to compare the said technique with the previously used Nielsen-Selye staining method. The specimens examined were collected from the heart muscle in 90 autopsy cases: cases of myocardial infarction positively diagnosed during autopsies and verified by routine staining examination (5); clinically positively diagnosed cases of myocardial infarction, without autopsy verification and examined microscopically using the routine staining method (5); sudden deaths with symptoms of acute circulatory failure due to cardiac causes (50) and the controls (30). The investigation demonstrated the specificity of the immunohistochemical C9 staining method in cases of myocardial damage associated with focal ischemia. It also confirmed the higher usefulness of the immunohistochemical method as compared to the Nielsen-Selye staining method in postmortem diagnostics of recent stages of myocardial infarction.

Słowa kluczowe: zawał mięśnia sercowego, immunohistochemia, nagły zgon

Key words: myocardial infarction, immunohistochemistry, sudden death

WSTĘP

Z praktyki sądowo-lekarskiej wynika, że znaczną grupę wśród zgonów nagłych stanowią zgony w mechanizmie ostrej niewydolności krążenia na podłożu zmian chorobowych serca, najczęściej miażdżycy. Nagła śmierć sercowa jest przykładem nieoczekiwanej śmierci, która postępuje szybko, zwykle w przeciągu 1 godziny od momentu pojawienia się objawów lub może być wcale nie poprzedzona objawami. W części przypadków właśnie nagły zgon sercowy jest pierwszym objawem choroby niedokrwiennej mięśnia serca. Ostatecznym mechanizmem nagłej śmierci sercowej jest prawie zawsze arytmia (asystolia lub migotanie komór). Jedną z przyczyn wiodących ku temu może być zawał mięśnia sercowego [1, 2]. Diagnostyka makro- i mikroskopowa zaawansowanego zawału nie stanowi trudności, jednak jego wczesne fazy pozostają zwykle nieuchwytnie w ocenie makroskopowej, a także niejednokrotnie są niewidoczne mikroskopowo lub trudne do jednoznacznej interpretacji. Rutynowe barwienie hematoksyliną i eozyną, uwidaczniające zmiany zaawansowane, jest zwykle niewystarczające w ocenie zmian wczesnych. Wynika stąd konieczność zastosowania, w ramach poszerzenia diagnostyki mikroskopowej, innych metod barwienia [3, 4]. Istotne jest również to, aby zastosowana technika cechowała się specyficnością dla uszkodzenia niedokrwiennej komórki mięśnia sercowego i była przydatna w ocenie materiału pośmiertnego. Tym bardziej, że potrzebę poszerzenia diagnostyki pośmiertnej uzasadniają nie tylko wymóg precyzyjnego ustalenia przyczyny zgonu, ale i wynikające ze śmierci następstwa opiniodawcze. Najistotniejsze z nich to opiniowanie o wypadkach przy pracy, domniemanie błędu medycznego, kwestie ubezpieczeniowe lub rozstrzygnięcia w przypadkach śmierci za kierownicą. Zgodne z zasadami opiniowanie wymaga nie tylko przeprowadzenia pełnej sekcji zwłok, ale i wykonania badań dodatkowych: histopatologicznych i toksykologicznych (rutynowych – wykrywanie alkoholu etylowego, a w uzasadnionych przypadkach poszerzonych). Konieczne jest także zapoznanie się z okolicznościami śmierci i wywiadem chorobowym, co w wielu przypadkach determinuje kierunek badań. W praktyce sądowo-lekarskiej spotykamy się niekiedy z lekceważeniem przez niefachowców badania mikroskopowego i podważaniem jego celowości. Badanie histologiczne, pobranych w czasie sekcji zwłok wycinków narządów wewnętrznych, nie tylko w przypadkach nagłych zgonów bywa decydujące dla ostatecznych rozważań i to nie wyłącznie w ustalaniu przyczyny zgonu. Trzeba pamiętać także o tym, co typowe jest właśnie dla medycyny sądowej, że nawet negatywne

stwierdzenia wyływające z badań pośmiertnych mogą mieć znaczenie w opiniowaniu.

Jedną z metod, wykorzystywanych do poszerzonej diagnostyki mikroskopowej wczesnego zawału mięśnia sercowego, jest metoda Nielsena i Selye'go [5, 6], tj. wykrywania fuksynochłonności włókien mięśnia sercowego. Metoda ta została wprowadzona do praktyki Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej UJ CM na przełomie lat sześćdziesiątych i siedemdziesiątych [7, 8]. Już początki stosowania metody w praktyce, jak i późniejsze wieloletnie doświadczenia, wskazywały na brak swoistości odczynu dla wczesnego zawału mięśnia sercowego. Dodatkowo wyniki barwienia metodą Nielsena-Selye'go występowały nie tylko w niedokrwinnym uszkodzeniu mięśnia sercowego i przypadkach zgonów z przyczyn sercowych, ale także w przypadkach śmierci nagłej z przyczyn pozasercowych [9]. Co więcej rozległe obszary fuksynochłonności włókien, wyznaczające w metodzie Nielsena-Selye'go uszkodzenie komórek, spotykane były także w przypadkach zgonów gwałtownych z przyczyn zewnętrznych np. w zatruciu tlenkiem węgla [10]. Otrzymywane tak wyniki niejednokrotnie są niemiarodajne, mogą być błędnie interpretowane i nie pozwalają na potwierdzenie rozpoznania wczesnego zawału.

Odrębnym problemem dla diagnostyki sądowo-lekarskiej zwłaszcza histopatologicznej, a wręcz wyzwaniem dla niej, jest nieuchronnie postępujący proces autolizy, co ogranicza możliwości stosowania niektórych metod.

Powyższe rozważania uzasadniają konieczność wdrożenia nowej metody, która mogłaby zweryfikować dotychczas stosowaną, uzupełnić ją, a nawet zastąpić.

Współczesna diagnostyka histopatologiczna w znaczącej mierze opiera się na rutynowo już stosowanych metodach immunohistochemicznych. Odczyn oparty na zasadzie reakcji antygen-przeciwciała, stwarza możliwość precyzyjnej i czulej diagnostyki [11]. Znalazło to także zastosowanie w detekcji wczesnego zawału mięśnia sercowego. Dowodem na to są prace badawcze prowadzone przez liczne ośrodki [12, 13, 14].

Wśród opracowanych i proponowanych metod immunohistochemicznej diagnostyki wczesnego zawału mięśnia sercowego jest metoda wykrywania czynnika C9 dopełniacza. Układ dopełniacza należy do systemu obrony ustroju. Krążące w surowicy nieczynne formy kolejnych czynników układu zostają kaskadowo aktywowane z chwilą zadziałania mechanizmu aktywującego. Dowiedziono, że w niedokrwionym mięśniu sercowym nie tylko dochodzi do aktywacji istniejącego dopełniacza i „odkładania” kompleksu w komórkach mięśnia sercowego [15], ale także do

tw. pozawątrobowej produkcji różnych czynników dopełniacza, w tym i czynnika C9 [16, 17]. Istotą proponowanego odczynu jest wykrywanie czynnika C9 przy użyciu specyficznych przeciwciał.

O wyborze metody w podjętym opracowaniu zdecydowały jej zalety tj. specyficzność dla niedokrwienego uszkodzenia mięśnia sercowego, duża „oporność” na procesy autolityczne, stosunkowo późno występujące artefakty powstałe wskutek czynności reanimacyjnych.

Dowodów na aktywację układu dopełniacza w niedokrwieniu mięśnia sercowego dostarczyły doniesienia z badań Hill i Ward już w 1971 roku [18]. Od tamtej pory nadal trwają prace nad wyjaśnieniem zawiłości i zrozumieniem tego procesu [19, 20]. Począwszy od sposobu aktywacji układu, przez jego regulację w procesie niedokrwienia i reperfuzji, pozostaje wiele nie wyjaśnionych zagadnień [21, 22, 23].

Sam mechanizm aktywacji dopełniacza stanowi jeden z przykładów nie do końca poznanych zjawisk. Ostatecznym produktem aktywacji układu dopełniacza jest, jak w każdym przypadku, kompleks końcowy C5b-9, którego obecność można wykazać immunohistochemicznie w komórkach mięśnia sercowego. Dodatkowym efektem aktywacji i regulacji dopełniacza jest ponadto synteza czynników układu dopełniacza od C1 do C9 w mięśniu sercowym. Potwierdzenie tego uzyskano zarówno w modelu zwierzęcym oraz w komórkach ludzkich [24]. Fakt pozawątrobowej, sercowej produkcji czynników dopełniacza wymaga szczególnego podkreślenia [25]. Głównym bowiem narządem stanowiącym w organizmie źródło osoczowych białek jest wątroba. Wykrycie, że w niedokrwionym mięśniu sercowym wytwarzane są składowe dopełniacza, jest istotnym elementem, którego znaczenie wzrasta szczególnie w momencie stwierdzenia specyficzności tego zjawiska dla niedokrwienia. Argument ten zyskuje zwłaszcza na znaczeniu w badaniach materiału pośmiertnego o różnym stopniu autolizy, kiedy to metody z użyciem specyficznych przeciwciał, bazujące na wykrywaniu białek kurczliwych komórki, mogą wykazywać wyniki fałszywie dodatnie.

Istotną sprawą dla strategii badań jest ustalenie, w jakim czasie od inicjacji zawału dochodzi do aktywacji dopełniacza, jak szybko produkty aktywacji są wykrywane oraz czy są specyficzne tylko dla niedokrwienego uszkodzenia mięśnia sercowego.

Badania potwierdzają specyficzność metody z wykrywaniem kompleksu C5b-9 zarówno dla martwicy (nawet pojedynczych komórek), a także użyteczność metody w diagnostyce pośmiertnej materiału z cechami autolizy. Możliwość detekcji kompleksu z użyciem specyficznych przeciwciał występuje już po 40 minutach [26, 27] od wystąpienia niedotlenienia

i utrzymuje się przez długi czas – o czym świadczy silnie dodatni odczyn w ogniskach kilkudniowych zawałów. Liczne obserwacje potwierdzają stosunkowo późne pojawienie się dodatniego odczynu w związku z działaniami reanimacyjnymi zarówno mechanicznymi jak i farmakologicznymi.

Istotne dla czasu pojawienia się aktywacji dopełniacza jest wystąpienie reperfuzji danego obszaru. Im szybsza reperfuzja tym aktywacja wcześniejsza. W zawałach bez reperfuzji – aktywacja występuje także, ale dopiero po kilku godzinach (wg doniesień czas ten oceniany jest na 5-6 godzin) [28]. Sam zaś fakt aktywacji dopełniacza w przypadkach zawału uznawany jest jako jedno z wyjaśnień destrukcyjnego wpływu reperfuzji w zawałe mięśnia sercowego.

Na uwagę zasługuje natomiast wykazany znaczący statystycznie wzrost aktywacji C5b-9 u pacjentów z chorobą niedokrwinną serca korelujący w okresie 6 miesięcy (w badanej grupie) z progresywnymi zmianami w postaci: pogorszenia wydolności z koniecznością hospitalizacji, transplantacji lub zgonem [29].

Opracowane metody diagnostyki obejmują odczyn z wykorzystaniem przeciwciał przeciwko całemu kompleksowi, jak i przeciwko czynnikowi C9. W badaniach porównawczych obu metod uzyskiwano wyniki podobne w przeciwieństwie do porównania metody z przeciwciałem przeciwko kompleksowi C5b-9 i przeciwko innemu czynnikowi, kiedy to odczyny wykazywały wyraźne różnice [30, 31, 32].

MATERIAŁ I METODY

Badaniami objęto wycinki mięśnia sercowego pobrane w czasie 85 sądowo-lekarskich sekcji zwłok i 5 sekcji patomorfologicznych. Sekcje sądowo-lekarskie przeprowadzone zostały w Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej UJ CM, sekcje patomorfologiczne w Katedrze Patomorfologii UJ CM. Diagnostykę prowadzono w co najmniej 3 wycinkach pobranych rutynowo z lewej komory (ściana przednio-przegrodowa, tylna i rejon koniuszka) ewentualnie wycinki dodatkowe – celowane z ognisk podejrzanych makroskopowo. W każdym przypadku zestawiano obserwacje z badania makroskopowego i mikroskopowego oraz dane z wywiadu.

Badany materiał ujęto w grupy przypadków:

Grupy badane:

1. Zawały rozpoznane w badaniu sekcyjnym i potwierdzone w diagnostyce rutynowej – 5 przypadków.
2. Zawały rozpoznane klinicznie, nie potwierdzone w badaniu sekcyjnym i diagnostyce rutynowej – 5 przypadków.

3. Nagłe zgony wskazujące na ostrą niewydolność krążenia z przyczyn sercowych – 50 przypadków.

Grupy kontrolne:

1. Zgony gwałtowne spowodowane przyczynami zewnętrznymi: wypadki drogowe, upadki z wysokości, postrzały z broni palnej – 10 przypadków.
2. Zgony w mechanizmie ogólnoustrojowego niedotlenienia: powieszona, utonięcia, zatrucia tlenkiem węgla – 15 przypadków.
3. Zgony, w których wystąpiło mechaniczne uszkodzenie struktury mięśnia sercowego: rany klute, urazy narzędziem tęnym – rozerwania, stłuczenia – 5 przypadków.

We wszystkich przypadkach zastosowano trójstopniową diagnostykę dla skrawków parafinowych.

1. Barwienie rutynowe hematoksyliną i eozyną.
2. Barwienie metodą Nielsena-Selye'go.
3. Barwienie metodą immunohistochemiczną.

Wycinki utrwalone w 10% roztworze formaliny zostały przeprowadzone według techniki parafinowej i zatopione w bloczki histologiczne. Następnie skrojone na skrawki grubości 4µm, tak aby wykonać trzy rodzaje barwień. W kolejności wykonano barwienie rutynowe hematoksyliną i eozyną (H/E), następnie barwienie metodą Nielsena-Selye'go i barwienie metodą immunohistochemiczną C9.

Barwienie metodą Nielsena-Selye'go w modyfikacji Poley, wykonano z użyciem następujących odczynników: 0,2% fioletu krezyłu oraz 1% roztworów: kwaśnej fuksyny, oranżu G, zieleni metylowej, kwasu szczawiowego, kwasu fosforo-wolframowego. Przygotowano kolejne roztwory: roztwór A: fiolet krezyłu – 10 ml, woda destylowana – 40 ml, kwas szczawiowy – 0,2 ml; roztwór B: kwas fosforo-wolframowy, roztwór C: kwaśna fuksyna – 0,2 ml, oranż G – 0,15 ml, zieleń metylowa – 0,15 ml, kwas szczawiowy – 0,2 ml, woda destylowana – 50 ml. Roztwory A i C przygotowano w dniu barwienia. Po odparafinowaniu i nawodnieniu, preparaty barwiono przez około 25 minut w roztworze A, w temperaturze 36°C. Następnie, po przepłukaniu w wodzie bieżącej, bejcowano w roztworze B, w temperaturze 36°C około 20 minut. Po tym czasie, preparaty płukano w wodzie bieżącej, a następnie impregnowano w roztworze C, w temperaturze 50°C od 2 do 3 godzin. Po zabarwieniu, wycinki utrwalano w 1% kwasie octowym, odwodniono i zamknięto w balsamie kanadyjskim.

Barwienie metodą immunohistochemiczną przeprowadzono na bazie schematu podanego przez Dorana i wsp. [13, 33] nieco go modyfikując. W metodzie wykorzystano następujące przeciwciała: I – przeciwciało owcy przeciwko ludzkiemu czynnikowi C9 (Sheep anti-human C9 IgG, firmy Binding Site,

UK), II – przeciwciało osła przeciwko owcy znakowane peroksydazą (Donkey anti-sheep peroxidase conjugated IgG, firmy Jackson Immunoresearch, USA). Do rozcieńczania przeciwciał zastosowano roztwór firmy DAKOCytomation – Antibody Diluent with Background Reducing Components. Do wykrywania peroksydazy wykorzystano zestaw firmy DAKOCytomation system chromogenu Liquid DAB Substrate. Po nawodnieniu preparatów zablokowano endogenną peroksydazę roztworem 3% H₂O₂ w buforze PBS. Po wypłukaniu inkubowano z I przeciwciałem przygotowanym w rozcieńczeniu 1:500 w komorze wilgotnej około 18 godzin w temperaturze 4°C. Po wypłukaniu w buforze PBS inkubowano z II przeciwciałem przygotowanym w rozcieńczeniu 1:100 w komorze wilgotnej około 45 minut w temperaturze pokojowej. Ponownie wypłukano w buforze PBS. W następnym etapie przeprowadzono reakcję wykrywania peroksydazy – barwienie zestawem DAB według schematu zalecanego przez producenta. Przepłukano w wodzie destylowanej dwa razy, następnie podbarwiono hematoksyliną Meyer'a, wypłukano, odwodniono i zamknięto balsamem.

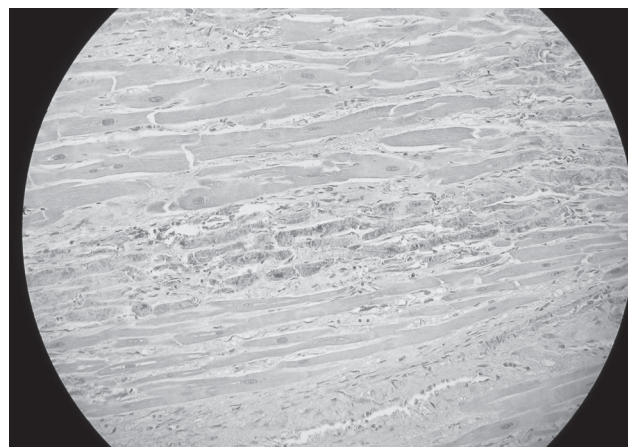
WYNIKI

Grupy badane

Do pierwszej grupy zakwalifikowano zgony z rozpoznaniem makroskopowo i potwierdzonym w badaniach mikroskopowych zawalem mięśnia sercowego. W barwieniu rutynowym hematoksyliną i eozyną występował obraz martwicy na różnym etapie zaawansowania, nie budzący wątpliwości diagnostycznych. We wszystkich przypadkach w badaniu immunohistochemicznym uzyskano wynik dodatni w postaci ogniskowego wybarwienia się licznych włókien w strefie martwicy.

Ryc. 1. Ogniskowo dodatni odczyn immunohistochemiczny C9 w zawale mięśnia sercowego. Pow. 200x.

Fig. 1. Focal positive immunohistochemistry C9 in the area of myocardial infarction. x 200.



Dodatni odczyn występował w obrębie włókien, głównie w strefie obwodowej na pograniczu zaawansowanych zmian z rozpadem włókien. W centrum martwicy tylko pojedyncze włókna wybarwiały się dodatnio, były to włókna w początkowych fazach martwicy, nie wykazujące destrukcji. Obserwowano natomiast miejscami dodatnie wybarwienie się „pozostałości” pomartwicznych głównie tam, gdzie procesy odczynowe były najaktywniejsze (masywne nacieki komórkowe). Tylko w 1 przypadku stwierdzono poza rejonem martwicy dodatnio barwiące się pojedyncze włókna. Preparaty z rejonów martwicy z dodatnim odczynem immunohistochemicznym były wykorzystywane także jako kontrola (dodatnia i ujemna) w procesie barwienia. Wyniki barwienia metodą Nielsena-Selye'go również wykazały ogniskową fuksynochłonność włókien o typie grudkowym, tylko w 1 z przypadków z pojedynczymi pasmami. Uzyskane wyniki były w obu metodach barwień zgodne. Jednakże wynik badania immunohistochemicznego, w każdym z badanych przypadków, był intensywniejszy – nie pozostawiający żadnych wątpliwości interpretacyjnych. Ponadto wykrywał rozleglejsze rejony objętych zmianami włókien, co ukazywało rzeczywisty zasięg zmian. Jakkolwiek w przypadkach tych zgonów diagnostyka rutynowa jest wystarczająca dla postawienia prawidłowego rozpoznania, a w wielu przypadkach jest tylko potwierdzeniem obserwacji makroskopowych, to poszerzenie jej o badanie immunohistochemiczne pozwoliło na ocenę aktywności procesu i rozległości obszaru objętego zawałem.

W drugiej grupie zgonów znalazły się przypadki zawałów rozpoznanych klinicznie i nie potwierdzonych w badaniu sekcyjnym i w diagnostyce rutynowej. Były to zgony osób, które z objawami wskazującymi na niedotlenienie mięśnia sercowego trafiły do szpitala. Tam w trakcie wstępnej diagnostyki, po krótkim leczeniu, osoby te zmarły wśród objawów ostrej niewydolności krążenia. Wobec tych osób podjęto czynności reanimacyjne – brak danych na temat ich czasu trwania. Badanie makroskopowe, jak i rutynowa diagnostyka z zastosowaniem barwienia hematoksyliną i eozyną, były niewystarczające do pozytywnej weryfikacji postawionego rozpoznania. Odczyn immunohistochemiczny we wszystkich przypadkach był ogniskowo dodatni. Tylko w jednym z nich poza ogniskowym wybarwieniem się włókien wystąpił dodatni odczyn w pojedynczych włóknach w innym preparacie. Zgodność z barwieniem metodą Nielsena-Selye'go uzyskano w 3 przypadkach, przy czym obserwowano w nich pasmowaty typ fuksynochłonności włókien, aż w dwóch z nich, co najmniej w 2 preparatach, ale o ogniskowym nasileniu i z zajęciem obszaru wycin-

ka. W 2 natomiast przypadkach barwienie metodą Nielsena-Selye'go było ujemne. Metoda immunohistochemiczna pozwoliła na stwierdzenie martwicy włókien we wszystkich przypadkach, potwierdzając tym samym obserwacje kliniczne.

Te dwie przebadane grupy wykazały przydatność i swoistość metody immunohistochemicznej C9 dla wykrywania świeżej martwicy włókien zarówno ogniskowej, obejmującej grupy włókien jak i ograniczonej do pojedynczych włókien. Wyniki barwienia metodą Nielsena-Selye'go były niejednoznaczne do interpretacji, zwłaszcza w drugiej grupie zgonów. Porównanie wyraźnie wykazało tu większą czułość metody immunohistochemicznej. W pierwszej grupie potwierdzone zostały obserwacje o grudkowej fuksynochłonności włókien w ogniskach świeżej martwicy [34]. Wyraźnie silniejsza fuksynochłonność w 2 przypadkach w grupie zgonów z potwierdzonym klinicznie zawałem mogła wynikać z podjętych czynności reanimacyjnych.

W najliczniejszej badanej grupie zgonów nagłych w 50 przypadkach wskazujących na sercową przyczynę zgonu dodatni wynik barwienia metodą immunohistochemiczną uzyskano w 31 przypadkach. W 21 z nich dodatni odczyn był ogniskowy. Wyróżnił się wśród nich 1 przypadek ogniskowego odczynu w dwóch preparatach. Były to wycinki ze ściany tylnej i rejonu koniuszka także ściany tylnej, a zatem z dwóch sąsiadujących ze sobą okolic, co przy możliwych rozmiarach zawału (mierzonych w centymetrach), jak najbardziej może tłumaczyć taki wynik i nie sprzeciwia się przyjęciu rozpoznania wczesnego zawału. W 9 przypadkach ogniskowy odczyn wystąpił tylko w jednym z barwionych preparatów, a w 11 – ogniskowości towarzyszyły pojedyncze „dodatnie” włókna w innym z preparatów. W 10 przypadkach dodatni odczyn immunohistochemiczny wystąpił w pojedynczych włóknach mięśnia sercowego, przy czym w 8 tylko w jednym z preparatów, a w 2 co najmniej w dwóch preparatach. Barwienie metodą Nielsena-Selye'go było dodatnie w 26 przypadkach. Zdecydowanie dominował grudkowy typ fuksynochłonności włókien. Zgodność obu odczynów w zakresie wyników dodatnich wystąpiła natomiast w 15 przypadkach. W 11 przypadkach z dodatnim wynikiem barwienia metodą Nielsena-Selye'go wynik barwienia metodą immunohistochemiczną C9 był ujemny. Odwrotna sytuacja natomiast miała miejsce w 16 przypadkach, kiedy to wynik barwienia metodą immunohistochemiczną C9 był dodatni, w drugiej natomiast metodzie uzyskany wynik był ujemny. Analizując tę grupę szczegółowo stwierdzić należy, że w zbiorze tych 16 przypadków, w 9 wystąpił ogniskowo we włóknach dodatni odczyn immunohistochemiczny,

a w 7 dodatkowo barwiły się tylko pojedyncze włókna. Zgodność obu metod barwienia w zakresie wyników ujemnych wystąpiła w 8 przypadkach.

W 7 przypadkach badanie makroskopowe tętnic wieńcowych wykazało obecność zmian świeżych, charakter których został zweryfikowany badaniem mikroskopowym. Aż w 5 z nich badanie metodą immunohistochemiczną ujawniło dodatni ogniskowo odczyn we włóknach mięśnia sercowego. Natomiast w pozostałych 2 przypadkach badanie było ujemne. Barwienie metodą Nielsena-Selye'go w 6 przypadkach było dodatnie, a tylko w 1 ujemne. Tylko w jednym przypadku stwierdzono wyraźne ogniskowe nasilenie fuksynochłonności włókien.

Badanie makroskopowe jest wstępem diagnostyki, obserwacje wówczas poczynione często determinują dalszą diagnostykę i jakkolwiek decydujące znaczenie ma obraz mikroskopowy, to obserwacje te dostarczają wiedzy na temat przeszłości danej osoby, wyznaczanej choćby przez obecność blizn. Włóknienie zastępcze, jak w przypadku blizn pozawałowych, czy nawet rozsiane w postaci małych ognisk bądź uchwytnie dopiero w badaniu mikroskopowym, jako włóknienie śródmiąższowe, jest elementem ważnym w diagnostyce nagłych zgonów. Przebyty zawał mięśnia jest czynnikiem znacznie obciążającym. Badanie immunohistochemiczne jest precyzyjniejsze w tym zakresie. Daje możliwość weryfikacji aktywności zmian, wskazując tym samym na ich znaczenie w mechanizmie śmierci sercowej.

Jedną ze zmian morfologicznych włókien, ujawnianą często u osób po przebytych zawałach mięśnia sercowego, jest tzw. miocytoliza włókien. Włókna mięśniowe są zwakuolizowane, z jasnym, „pustym” przejaśnieniem centrum, co wskazuje na utratę białek kurczliwych. W barwieniu immunohistochemicznym wycinka z takiego rejonu uzyskano wynik ujemny.

Grupy kontrolne

Grupy kontrolne dobrano tak, aby sprawdzić, czy badanie immunohistochemiczne wykazuje swą specyficzność tylko do ischemicznego uszkodzenia mięśnia sercowego, typowego dla wczesnych faz zawału mięśnia sercowego. W grupach uszeregowano różne przypadki zgonów dobierając je według ich przyczyn.

Do grupy kontrolnej zgonów gwałtownych wskutek urazu mechanicznego wybrano przypadki zgonów z przyczyn zewnętrznych, takich jak postrzały, wypadki komunikacyjne, upadki z wysokości. Tylko wobec jednej z tych osób podejmowano czynności reanimacyjne. W grupie ujęto także przypadek zgonu w terminie kilku tygodni od

zaistnienia obrażeń, u osoby hospitalizowanej od dnia zdarzenia. Tylko w 4 z 10 przypadków uzyskano zgodność obu odczynów (ujemne wyniki badań). Badanie immunohistochemiczne tylko w 1 z przypadków było dodatnie, jako pojedyncze włókna w jednym z preparatów. Barwienie metodą Nielsena-Selye'go było w tym przypadku ujemne. Dane dotyczące tego przypadku wskazują, że był to zgon 43-letniego mężczyzny, chorego na cukrzycę i padaczkę alkoholową, który doznał obrażeń czaszkowo-mózgowych, będąc w stanie zatrucia alkoholowego (wysokie stężenie alkoholu etylowego we krwi), u którego w badaniu mikroskopowym wykazano ogniskowy przerost włókien oraz włóknienie okołonacyniowe i śródmiąższowe. Wyniki barwienia metodą Nielsena-Selye'go były bardziej zróżnicowane, w 5 przypadkach były ujemne, w 4 z nich zgodne z wynikiem odczynu immunohistochemicznego, w pięciu przypadkach natomiast uzyskano wynik dodatni. Zwraca uwagę przeważający pasmowaty typ fuksynochłonności włókien, przy pojawiającej się zaledwie w 1 przypadku jako jedynej formie – grudkowej. Nie obserwowano zależności fuksynochłonności włókien od przyczyny zgonu. W grupie postrzałów z broni palnej w głowę w 2 przypadkach stwierdzono fuksynochłonność włókien, w 2 natomiast nie występowała.

W grupie zgonów, w których nastąpiło ogólnoustrojowe niedotlenienie wybrano 5 przypadków zgonów wskutek powieszenia, 5 przypadków zgonów wskutek utonięcia i 5 przypadków zgonów wskutek ostrego zatrucia tlenkiem węgla. Tylko w 1 przypadku z tej grupy barwienie immunohistochemiczne wykazało wynik dodatni – pojedyncze włókna w jednym z barwionych preparatów. Było to w przypadku zgonu 73-letniej kobiety, leczonej neurologicznie i psychiatrycznie, z zaawansowaną, zwężającą miażdżycą tętnic wieńcowych, z rozsianymi, drobnymi bliznami w mięśniu sercowym, z obrazem włóknienia okołonacyniowego i śródmiąższowego. Wytłumaczeniem dodatniego odczynu w tym przypadku mogłaby być zarówno choroba samoistna – niedokrwienność serca (tak jak i w przypadku z poprzedniej grupy kontrolnej), jak również wynikające z niej ograniczone możliwości adaptacyjne serca do niedotlenienia, związane z mechanizmem samej śmierci przez powieszenie [35]. Natomiast wyniki barwienia metodą Nielsena-Selye'go tylko w 3 przypadkach były ujemne i równocześnie zgodne z barwieniem immunohistochemicznym. Aż w 12 przypadkach uzyskano dodatnie wyniki barwienia metodą Nielsena-Selye'go. Najwięcej – 5 było ich w utonięciach, 4 w powieszeniach, 3 w ostrych zatruciach tlenkiem węgla. Przeważał tak jak w poprzedniej grupie pa-

smowaty typ fuksynochłonności włókien, częściej jednak towarzyszył jej typ grudkowy.

W ostatniej zakwalifikowanej do badań grupie zgonów gwałtownych znalazły się te przypadki, gdzie wskutek urazu doszło do uszkodzeń mięśnia sercowego. Do grupy włączono przypadki ran kłutych, jak i rozerwań oraz stłuczeń wskutek urazów tępych. Zgodność obu metod barwienia wystąpiła w 2 przypadkach – rany kłutej serca u 2 letniego chłopca, gdzie w obu metodach uzyskano wynik ujemny oraz u 31 letniego mężczyzny z obrażeniami ciała, ze stłuczeniem serca, przysypanego lawiną, gdzie w obu metodach uzyskano wynik dodatni. Barwienie immunohistochemiczne było tylko w tym jednym przypadku dodatnie. Odczyn dodatni w pojedynczych włóknach stwierdzono w wycinku ze ściany przednio-przegrodowej, poza rejonem uszkodzenia. Wystąpienie odczynu wskazuje tu raczej nie tyle na przyżyciowość stłuczenia serca, ile na czas przeżycia samego narządu. Być może istotnym czynnikiem było tu oziębienie – hypotermia (hibernacja mięśnia, spowolnienie procesów życiowych, mniejsze zapotrzebowanie na tlen, a tym samym dłuższe przeżycie samego narządu).

Barwienie metodą Nielsena-Selye'go było dodatnie aż w 4 przypadkach z równym rozkładem typów fuksynochłonności włókien.

Podsumowując porównanie wyników dwóch metod barwienia stwierdzić należy, że wyniki uzyskane we wszystkich badanych przypadkach potwierdzają większą czułość metody immunohistochemicznej C9 dla celów diagnostyki wczesnych zmian niedokrwiennych mięśnia sercowego. W uzyskiwanych odczynach obserwowano zarówno ogniskową formę odczynu – ograniczoną do grupy włókien danego rejonu, jak i formę rozsianą, gdy dodatni odczyn występował tylko w pojedynczych włóknach w jednym lub wielu preparatach. Wskazuje to, że metoda immunohistochemiczna C9 jest przydatna do wykrywania uszkodzeń nawet pojedynczych włókien. Podkreślić przy tym należy, że każdy uzyskany wynik wymaga interpretacji i samo sformułowanie odczyn dodatni nie jest jednoznaczne z rozpoznaniem zawału.

Osobnego omówienia wymaga uwzględniony we wszystkich badanych grupach, jako jeden z parametrów opisujących dane ogólne, fakt prowadzenia czynności reanimacyjnych. Zarówno defibrylacja, jak i czynności mechaniczne (masaż pośredni serca), a przede wszystkim działania farmakologiczne – podaż amin katecholowych – mogą wpłynąć na mięsień sercowy powodując nie tylko obraz martwicy z węzłami skurczu [36, 37, 38, 39, 40, 41], ale także zmiany o typie przyćmienia mięęszowego (zwyrodnienia mięęszowego) włókien stwierdzane

w rutynowym badaniu mikroskopowym. Ze zmian uchwytnych w badaniu makroskopowym, jako efekt reanimacji, mogą wystąpić podwsięrdziowe wybroczyny krwawe [42]. Istotny pozostaje nie tylko zakres prowadzonych czynności, ale i czas ich trwania.

W badanej grupie 90 przypadków czynności reanimacyjne podejmowano w 23 przypadkach. W grupie zgonów z rozpoznaniem i potwierdzonym zawałem mięęsznia sercowego znalazł się 1 taki przypadek. W grupie zawałów rozpoznanych klinicznie i nie potwierdzonych w badaniu sekcyjnym i diagnostyce rutynowej wszystkie osoby były poddane czynnościom reanimacyjnym. W badanej grupie nagłych zgonów w 14 przypadkach odnotowano w skierowaniu zwłok na sekcję informację o resuscytacji (reanimacji). Tylko w 4 przypadkach czynności reanimacyjne zostały w całości udokumentowane w skierowaniu, w 3 informacja obejmowała także czas prowadzonych czynności. W 6 przypadkach odnotowano jedynie sformułowanie „próba reanimacji” bez szczegółowego opisu czynności i czasu ich trwania. W 4 przypadkach zanotowano tylko sam fakt przeprowadzenia takich czynności. W 2 przypadkach barwienie immunohistochemiczne było ujemne, w 1 z nich przy trwającej 50 minut akcji reanimacyjnej. W obu tych przypadkach barwienie metodą Nielsena-Selye'go było dodatnie, o wyraźnej nasilonej ogniskowości. W pozostałych 12 przypadkach, w których wystąpiła reanimacja, wyniki barwienia metodą immunohistochemiczną C9 były dodatnie. Inaczej natomiast przedstawiały się wyniki barwienia metodą Nielsena-Selye'go, które w 7 z nich były ujemne, a w 5 dodatnie. W wymienionej grupie 7 przypadków znalazły się wszystkie przypadki opatrzone adnotacją „próba reanimacji”.

W grupach kontrolnych znalazły się 3 przypadki zgonów osób, wobec których podejmowano czynności reanimacyjne. We wszystkich tych przypadkach barwienie metodą immunohistochemiczną było ujemne. Natomiast barwieniem metodą Nielsena-Selye'go uzyskano wyniki przeciwne, tj. dodatnie.

Poczynione obserwacje wskazują, że czynności reanimacyjne nie wpłynęły na uzyskanie dodatnich wyników barwienia metodą immunohistochemiczną C9 w grupie kontrolnej zgonów gwałtownych spowodowanych różnymi czynnikami. Także w grupie zgonów nagłych w 1 z przypadków, przy trwającej 50 minut reanimacji, uzyskany wynik barwienia immunohistochemicznego był ujemny. W drugim z ujemnych przypadków czas czynności reanimacyjnych nie był znany. Nie można natomiast odnieść się do przypadków osób reanimowanych, u których

wykazano dodatni odczyn immunohistochemiczny. U osób tych wystąpiło nagłe zatrzymanie krążenia zwykle poprzedzone objawami prodromalnymi, co przemawia za wcześniejszym początkiem zmian i wykrycie dodatniego odczynu wskazuje raczej na istniejące wcześniej niedotlenienie niż na artefakt związany z podjętymi czynnościami.

DYSKUSJA

Barwienia z użyciem technik immunohistochemicznych otworzyły nowy rozdział w diagnostyce nagłych zgonów [43]. Szybko zorientowano się, że możliwości immunohistochemii stwarzają nowe, dotąd nieznane perspektywy diagnostyki wczesnego zawału [44]. Zaowocowało to opracowaniem szerokiego panelu badań z użyciem różnego rodzaju przeciwciał i możliwością detekcji reakcji na wiele sposobów. Oceniana zostaje przydatność nowych metod immunohistochemicznych, weryfikacji podlegają już funkcjonujące [12]. Taki schemat obowiązuje przy każdej wprowadzanej metodzie. Opracowania najnowsze uwzględniają najczęściej porównanie kilku technik immunohistochemicznych i sprawdzenie ich w różnych przypadkach i dla różnych celów [45].

Diagnostyka sądowo-lekarska jest diagnostyką pośmiertną, która wymaga od wybranej metody spełnienia specyficznych warunków. Po pierwsze dlatego, że materiał pośmiertny charakteryzuje zawsze mniejszy lub większy stopień autolizy. Tak zatem bardzo ważną staje się możliwość weryfikacji zmian nawet przy zaawansowanym procesie autolizy. Ważne jest ponadto odróżnienie charakteru zmian – przyżyciowe czy pośmiertne [46, 47]. Istotny aspekt, który determinuje przydatność metody w diagnostyce pośmiertnej stanowi też możliwość odróżnienia artefaktów, jakie mogą występować w przypadkach podjęcia i prowadzenia przez długi czas czynności resuscytacyjno-reanimacyjnych. W sposób uproszczony można argumentować, że im dłużej dana metoda pozostaje „oporna” na czynniki zewnętrzne, tym dla ostatecznej oceny lepiej. Niesie to jednak za sobą pewne ograniczenia, z doświadczenia wynika bowiem, że metody te nie są tak czułe w najwcześniejszych fazach niedokrwienia. Wydaje się jednak, że pewność odczynu dla danego przypadku jest istotniejsza niż możliwość detekcji większej liczby przypadków we wcześniejszych fazach zawału, jednakże o utrudnionej, bo niejednoznacznej interpretacji. Warto podkreślić także, że przydatność metody określa też sposób „obróbki”, tj. przygotowania materiału do jej wykonania oraz aspekt finansowy badania (koszt przeciwciał i tzw. koszty pośrednie).

Wybrana metoda immunohistochemiczna C9 jest metodą dobrze już poznaną. Podkreśla się jej przydatność w badaniu materiału zautolizowanego, nawet przy znacznym zaawansowaniu zmian [48, 49]. Podobnie wykazano przydatność tej metody dla oceny serc płodów (nawet zmacerowanych) i noworodków martwo urodzonych [50].

Metoda immunohistochemiczna C9 jako jedna z weryfikujących metod jest brana pod uwagę w różnicowaniu zmian pośmiertnych od przyżyciowych [51, 52]. Dość długo także pozostaje ujemna nawet przy długotrwałej resuscytacji. W badaniach Ortmana i wsp. dodatni odczyn w pojedynczych komórkach uzyskano u 17-letniego powieszonoego mężczyzny, który był po 10 minutach „odcięty” i reanimowany przez 80 minut [45].

Sprawą do rozstrzygnięcia pozostaje interpretacja wyniku. Problem ten jest ściśle związany z zasadami opiniowania w sprawach nagłego zgonu z powodu wczesnego zawału mięśnia sercowego. Przede wszystkim ostateczne wnioski winny być formułowane po uzyskaniu pewności, że odczyn odzwierciedla rzeczywisty stan mięśnia sercowego. W sytuacji zmian makroskopowo niewidocznych badanie winno obejmować reprezentatywną liczbę wycinków z mięśnia sercowego. Tak zatem tylko w nielicznych przypadkach można się ograniczyć do badania rejonu trzech wycinków. W przypadku zmian ogniskowych (zblednięcie, przekrwienie) jest oczywistą koniecznością dodatkowej celowanej diagnostyki. Jednakże przy braku zmian makroskopowych uzasadnione jest zwiększenie liczby pobranych wycinków. Postuluje się w przypadkach kardiomiopatii [53], a także zmian niedokrwienych [54] badanie wycinków z wielu lokalizacji, w tym i z prawej komory, a także z uwzględnieniem stref podwiersdziejowej i podnasierdziejowej. Liczbę wycinków reprezentatywną diagnostycznie ocenia się na 8 do 10. Najczęściej decyzja o ilości i rodzaju wycinków jest podejmowana w czasie badania sekcyjnego przez obducenta. Decyduje tu zarówno jego doświadczenie, jak i całościowy obraz sekcji. Możliwe jest także zabezpieczenie do badań całego narządu i późniejsze pobranie wycinków z utrwalonego preparatu narządowego. W schemacie pobierania wycinków z całego serca, zaproponowanym przez Próchnicką i Jaegermanna, liczba wycinków wynosi 12. I tak są to 2 wycinki z prawej komory: 1 obejmujący całą ścianę od warstwy nasierdza przez mięsień i wsierdzie oraz 1 tylko z mięśnia. Reprezentacja lewej komory jest liczniejsza i obejmuje 10 wycinków z 5 lokalizacji z uwzględnieniem strefowości, tj. z 1 lokalizacji 2 wycinki – podnasierdziejowej i podwiersdziejowej. Oczywiście wykonywanie odczynu immunohistochemicznego we wszystkich

preparatach znacznie obciążąłoby procedurę czasowo, a przede wszystkim ekonomicznie. Możliwe jest natomiast wykonanie barwienia rutynowego wszystkich sporządzonych preparatów i poddaniu ich ocenie także w ramach wstępnej kwalifikacji do poszerzenia diagnostyki. W przypadku wykazania zmian podejrzanych w strukturze włókien o typie zwyrodnienia mięższowego, martwicy z węzłami skurczu czy niejednorodnej barwności włókien, istnieją wskazania do poszerzenia diagnostyki o barwienie immunohistochemiczne. Z obserwacji własnych po analizie badania 90 przypadków wynika, że najbardziej praktycznym i reprezentatywnym dla mięśnia jest badanie 5 wycinków z rejonów lewej komory, stanowiących rejon pośredni pomiędzy strefami podwierzdiową i nadwierzdiową, a w przypadku dużego przerostu komory celowe jest sporządzenie wycinków przez całą grubość ściany serca.

Kolejną kwestią jest zinterpretowanie wyniku uzyskanego w zakwalifikowanych do przeprowadzenia odczynu preparatach. W barwieniu immunohistochemicznym metodą C9 możemy uzyskać wyniki dodatnie i ujemne. Odczyn charakteryzuje się możliwością detekcji C9 nawet w pojedynczej komórce. Przez pojęcie odczynu dodatniego ogniskowo rozumie się wybarwienie skupisk włókien w preparacie.

Uzyskane w barwieniu immunohistochemicznym wyniki pozwalają na wnioskowanie:

- 1) pewne – rozpoznanie zawału mięśnia sercowego możliwe jest tylko w wypadku stwierdzenia w jednym z pobranych wycinków dodatniego odczynu ogniskowego, tzn. obejmującego grupę sąsiadujących włókien. Rozpoznanie nie wyklucza obecności pojedynczych dodatnio barwiących się włókien w pozostałych wycinkach.
- 2) z wysokim prawdopodobieństwem – stwierdzenie w badanym materiale tylko w jednym z wycinków rozsianych, dodatnio wybarwionych włókien z wysokim prawdopodobieństwem może wskazywać na niedokrwienny mechanizm śmierci wskutek zawału mięśnia sercowego.
- 3) niejednoznaczne – obecność w co najmniej dwóch lub we wszystkich barwionych wycinkach (trzech, czterech lub pięciu) rozsianych pojedynczych włókien nie pozwala na wnioskowanie o wczesnym zawale, a przy zgodnych obserwacjach makroskopowych i mikroskopowych (blizna po przebytych zawale, włóknienie śródmiąższowe) może wskazywać na przewlekłe, postępujące uszkodzenie włókien w mechanizmie niedotlenienia, typowego dla niedokrwiennej choroby serca.

- 4) niemożliwe – obecność dodatniego odczynu w pojedynczym włóknie we wszystkich barwionych preparatach lub ujemny odczyn w badanych wycinkach nie pozwala na wnioskowanie o wczesnej martwicy. Zarówno nie wyklucza zawału – zwłaszcza przy badaniu tylko trzech wycinków, ale też nie jest potwierdzeniem przyczyny zgonu wskutek ostrego niedokrwienia.

Zasadnym pozostaje w tym miejscu zwrócić uwagę, że diagnostyka pośmiertna nagłych zgonów jest konfrontowaniem wyników badania mikroskopowego poszerzonego o barwienia specjalne, w tym wypadku immunohistochemiczne C9, z całością informacji dotyczących danego przypadku, a obejmujących zarówno badanie makroskopowe, jak i wywiad dotyczący ewentualnych zmian chorobowych i objawów poprzedzających śmierć. W zasadzie każdy etap diagnostyki może dostarczyć ważnych informacji, mających znaczenie dla ostatecznych wniosków. W badaniu makroskopowym szczególną uwagę poświęca się ocenie tętnic wieńcowych, zarówno w aspekcie zmian miażdżycowych przewlekłych, jak i zmian świeżych – ostrych. Weryfikacja histologiczna charakteru zmian w konfrontacji z całokształtem obserwacji może być kluczowym argumentem w sporządzaniu opinii [55, 56]. Potwierdzają to także przeprowadzone badania.

Stwierdzenia powyższe uzasadniają sformułowanie wskazań do poszerzenia diagnostyki mikroskopowej o badanie immunohistochemiczne.

Wskazania do przeprowadzenia odczynu immunohistochemicznego:

- I. Makroskopowe:
 1. wynikające z wywiadu zarówno w aspekcie okoliczności poprzedzających zgon, tj. objawów przed zgonem, jak i rozpoznanych chorób, w szczególności układu krążenia,
 2. wynikające z badania sekcyjnego: cechy ostrej niewydolności krążenia, brak ewidentnej przyczyny śmierci, miażdżycy tętnic wieńcowych, obecność „podejrzanych” zmian ogniskowych w mięśniu sercowym lub ich brak,
- II. Mikroskopowe:
 1. stwierdzenie w barwieniu rutynowym jakichkolwiek niemożliwych do jednoznacznej interpretacji zmian zarówno w barwności jak i strukturze włókien, np. niejednorodnej barwności włókien, falistości włókien, zwyrodnienia mięższowego czy obrazu martwicy włókien z węzłami skurczu.

Warto uwzględnić fakt, że współczesna diagnostyka wczesnego zawału mięśnia sercowego dla potrzeb pośmiertnego badania sądowo-lekarskiego wymaga nie tylko poszerzenia zakresu badań o odczyn immunohistochemiczny, taki jak wykrywający czynnik C9, ale także w wątpliwych przypadkach celowe byłoby zastosowanie i innego odczynu, a w ostatecznym etapie porównanie dwóch czułych i swoistych metod.

PIŚMIENNICTWO

1. Cotran R. S., Kumar V., Robbins S. L.: Pathologic basis of disease. 5th edition Saunders 1994. The heart: Myocardial infarction. 528-540.
2. Jaegermann K., Marek Z., Kołodziej J.: Uwagi o mechanizmie nagłej śmierci sercowej w wybranych przypadkach. Arch. Med. Sąd. Kryminol., 1969, 19 (2), 25-27.
3. Rzepecka-Woźniak E., Próchnicka B.: Próba oceny przydatności oznaczania apoptozy kardiomiocytów w nagłych zgonach sercowych. Arch. Med. Sąd. Kryminol., 2000, 50(3), 261-266.
4. Rzepecka-Woźniak E., Próchnicka B., Trela F.: Apoptoza kardiomiocytów w diagnostyce immunohistochemicznej nagłych zgonów sercowych. Arch. Med. Sąd. Kryminol., 2003, 53, 109-115.
5. Nielsen K., Renaud S., Lemire Y., Selye H.: Fuchsinophilic degeneration of myocardial fibers. Meet. Canad. Fed. Biol. Soc., Kingston, 9-11 June 1958.
6. Poley R. W. Forbes C. D., Hall M. J.: Fuchsinophilia in early myocardial infarction. Arch. Pathol. 1964, 77, 325-329.
7. Marek Z.: Diagnostyka sekcyjna i mikroskopowa świeżych zawałów mięśnia sercowego i ostrej niewydolności krążenia. Pat. Pol., 1968, 19, 433-440.
8. Próchnicka B. Jaegermann K.: Przydatność makroskopowego badania mięśnia sercowego dla wykrywania świeżych ognisk niedotlenienia. Pat. Pol., 1977, 28, 3, 311-320.
9. Jaszcz W., Kawecka-Jaszcz K.: O przydatności metody Nielsena-Selye'go w wykrywaniu wczesnych zmian martwiczych mięśnia sercowego. Pat. Pol. 1971, 22, 2, 335-345.
10. Próchnicka B., Marek Z.: Obraz histologiczny mięśnia sercowego w ostrym zatruciu CO. Arch. Med. Sąd. Kryminol., 1973, XXIII(2), 289-293.
11. Bancroft J. D., Gamble M.: Theory and practice of histological techniques. Miller K.: Immunohistochemical techniques. Churchill – Livingstone, 2002, 421-434.
12. Brinkmann B., Sepulchre M. A., Fechner G.: The application of selected histochemical and immunohistochemical markers and procedures to the diagnosis of early myocardial damage. Int. J. Leg. Med. 1993, 106, 135-141.
13. Doran J. P., Howie A. J., Townend J. N., Bonser R. S.: Detection of myocardial infarction by immunohistological staining for C9 on formalin fixed, paraffin wax embedded sections. J. Clin. Pathol., 1996, 49(1), 34-37.
14. Ribeiro-Silva A., Martin C. C., Rossi M. A.: Is immunohistochemistry a useful tool in the postmortem recognition of myocardial hypoxia in human tissue with no morphological evidence of necrosis? Am. J. Forensic Med. Pathol., 2002, 23 (1), 72-77.
15. Hugo F., Hamdoch T., Mathey D., Schafer H., Bhakdi S.: Quantitative measurement of SC5b-9 and C5b-9(m) in infarcted areas of human myocardium. Clin. Exp. Immunol., 1990, 81, 132-136.
16. Yasojima K., Schwab C., McGeer E. G., McGeer P. L.: Human heart generates complement proteins that are upregulated and activated after myocardial infarction. Circ. Res., 1998, 83, 860-869.
17. Yasojima K., Kilgore K. S., Washington R. A., Lucchesi B. R., McGeer P. L.: Complement gene expression by rabbit heart. Circ. Res., 1998, 82, 1224-1230.
18. Hill J. H., Ward P. A.: The phlogistic role of C3 leukotactic fragments in myocardial infarcts in rats. J. Exp. Med., 1971, 133, 885-900.
19. Pinckard R. N., Olson M. S., Giclas P. C., Terry R., Boyer J. T., O'Rourke R. A.: Consumption of classical complement components by heart subcellular membranes in vitro and in patients after acute myocardial infarction. J. Clin. Invest., 1975, 56(3), 740-750.
20. Vlaicu R., Rus H. G., Niculescu F.: Immunohistochemical localization of the terminal C5b-9 complement complexes associated to S-protein and macrophage immunoreactive deposits in human damaged myocardial areas. Med. Int., 1988, 26(1), 21-27.
21. Montalescot G., Drobinski G., Maclouf J., Maillet F., Salloum J., Ankri A., Kazatchkine M., Eugene L., Thomas D., Grosogeat Y.: Evaluation of thromboxane production and complement activation during myocardial ischaemia in patients with angina pectoris. Circulation. 1991, 84(5), 2054-2062.
22. Oren S., Maslovsky I., Schlesinger M., Reisin L.: Complement activation in patients with acute myocardial infarction treated with streptokinase. Am. J. Med. Sci., 1998, 315(1), 24-29.
23. Seifert P. S., Kazatchkine M. D.: The complement system in atherosclerosis. Atherosclerosis., 1988, 73(2-3), 91-104.
24. Amsterdam E. A., Stahl G. L., Pan H. L., Rending S. V., Fletcher M. P., Longhurst J. C.: Limitation of

reperfusion injury by a monoclonal antibody to C5a during myocardial infarction in pigs. *Am. J. Physiol.*, 1995, 268(1Pt 2), H448-457.

25. Laufer J., Katz Y., Passwell J. H.: Extrahepatic synthesis of complement proteins in inflammation – review. *Mol. Immunol.*, 2001, 38, 221-229.

26. Hohmeister J. W., Satoh P., Lucchesi B. R.: Effects of complement activation in the isolated heart – role of the terminal complement components. *Circ. Res.*, 1992, 71, 303-319.

27. Thomsen H., Held H.: Susceptibility of C5b-9(m) to postmortem changes. *Int. J. Legal Med.*, 1994, 106(6), 291-293.

28. Mathey D., Schofer J., Schafer H. J., Hamdoch T., Joachim H. C., Ritgen A., Hugo F., Bhakdi S.: Early accumulation of the terminal complement – complex in the ischaemic myocardium after reperfusion. *Eur. Heart J.*, 1994, 15(3), 418-423.

29. Clark D. J., Cleman M. W., Pfau S. E., Rollins S. A., Ramahi T. M., Mayer C., Caulin-Glaser T., Daher E., Kosiborod M., Bell L., Setaro J. F.: Serum complement activation in congestive heart failure. *Am. Heart J.*, 2001, 141(4), 684-690.

30. Edston E., Kawa K.: Immunohistochemical detection of early myocardial infarction. An evaluation of antibodies against the terminal complement complex (C5b-9). *Int. J. Legal Med.*, 1995, 108, 27-30.

31. Robert-Offerman S. R., Leers M. P., van Suylen R. J., Nap M., Daemen M. J., Theunissen P. H.: Evaluation of the membrane attack complex of complement for the detection of a recent myocardial infarction in man. *J. Pathol.*, 2000, 191(1), 48-53.

32. Schafer H., Mathey D., Hugo F., Bhakdi S.: Deposition of terminal C5b-9 complement complex in infarcted areas of human myocardium. *J. Immunol.*, 1986, 137(6), 1945-1949.

33. Howie A. J.: C9 immunology in detection of myocardial infarction. *J. Pathol.*, 2001, 193(3), 421-429.

34. Marek Z.: Uwagi na temat nagłego i niespodziewanego zgonu z punktu widzenia medycyny sądowej. *Pat. Pol.*, 1980, 31, 2, 245-254.

35. Ikeda N., Harada A., Suzuki T.: The course of respiration and circulation in death due to typical hanging. *Int. J. Legal Med.*, 1992, 104, 313-315.

36. Baroldi G., Mittleman R. E., Parolini M., Silver M., Fineschi V.: Myocardial contraction bands – definition, quantification and significance in forensic pathology. *Int. J. Legal Med.*, 2001, 115, 142-151.

37. Karch S. B.: Resuscitation-induced myocardial necrosis: catecholamines and defibrillation. *Am. J. Forensic Med. Pathol.*, 1987, 8, 3-8.

38. Karch S. B., Billingham M. E.: Myocardial contraction bands revisited. *Hum. Pathol.*, 1986, 17, 9-13.

39. Venance S. L., Burns K. L., Veinot J. P., Walley W. M.: Contraction bands in visceral and vascular smooth muscle. *Hum. Pathol.*, 1996, 27, 1035-1041.

40. Virmani R., Farb A., Burke A.: Contraction band necrosis: new use for an old friend. *Lancet*, 1996, 347, 1710-1711.

41. Yoshida K., Ogura Y., Wakasugi Ch.: Myocardial lesions induced after trauma and treatment. *Forensic Sci. Int.*, 1992, 54, 181-189.

42. Harruff R. C.: Subendocardial hemorrhages in forensic pathology autopsies. *Am. J. Forensic Med. Pathol.*, 1993, 4, 284-288.

43. Leadbetter S., Wawman J. M., Jasani B.: Immunohistochemical diagnosis of early myocardial ischemia/hypoxic damage. *Forensic Sci. Int.*, 1989, 40, 171-180.

44. Leadbetter S., Wawman J. M., Jasani B.: Further evaluation of immunocytochemical staining in the diagnosis of early ischaemic/hypoxic damage. *Forensic Sci. Int.*, 1990, 45, 135-141.

45. Ortmann C., Pfeiffer H., Brinkmann B.: A comparative study on the immunohistochemical detection of early myocardial damage. *Int. Legal Med.*, 2000, 113, 215-220.

46. Edston E.: Evaluation of agonal artifacts in the myocardium using a combination of histological stains and immunohistochemistry. *Am. J. Forensic Med. Pathol.*, 1997, 18(2), 163-167.

47. Ortmann C., Pfeiffer H., Brinkmann B.: Immunohistochemical alterations after intravital and post-mortem traumatic myocardial damage. *Int. J. Legal Med.*, 2001, 115, 23-28.

48. Fechner G., Sivaloganathan S.: Demonstrations of myocardial infarction in putrefying bodies. *J. Clin. Pathol.*, 1987, 40, 922-929.

49. Ortmann C., Pfeiffer H., Brinkmann B.: Demonstration of myocardial necrosis in the presence of advanced putrefaction. *Int. J. Leg. Med.*, 2000, 114, 50-55.

50. Lazda E. J., Batchelor W. H., Cox P. M.: Immunohistochemical detection of myocardial necrosis in stillbirth and neonatal death. *Ped. Dev. Pathol.*, 2000, 3(1), 40-47.

51. Fechner G., Bajanowski T., Brinkmann B.: Immunohistochemical alterations after muscle trauma. *Int. J. Leg. Med.*, 1993, 105, 203-207.

52. Thomsen H., Held H.: Immunohistochemical detection of C5b-9(m) in myocardium: an aid in distinguishing infarction – induced ischemic heart muscle necrosis from other forms of lethal myocardial injury. *Forensic Sci. Int.*, 1995, 71, 87-95.

53. Davies M. J.: The investigation of sudden cardiac death. *Histopathology*, 1999, 34, 93-98.

54. Próchnicka B., Jaegermann K.: Sposoby poszukiwania wczesnych ognisk niedotlenienia

w mięśniu sercowym. Pat. Pol., 1980, 31, 2, 255-262.

55. Farb A., Tang A. L., Burke A. P., Sessums L., Liang Y., Virmani R.: Sudden coronary death: frequency of active coronary lesions, inactive coronary

lesions, and myocardial infarction. Circulation, 1995, 92, 1701-1709.

56. Marek Z., Jaegermann K.: Aspekty patomorfologiczne nagłej śmierci krążeniowej. Pol. Arch. Med. Wewn., 1973, 50, 981-986.