

**Ewa Rzepecka-Woźniak, Marta Konieczna, Filip Bolechała**

**Niedotlenienie mięśnia sercowego u kierowcy przyczyną wypadku drogowego. Metoda immunohistochemiczna C9 w diagnostyce wczesnego zawału mięśnia sercowego**

**Myocardial ischemia of the driver as a cause of a road accident.**

**Immunohistochemical C9 staining method in diagnostics of early myocardial infarction.**

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej CM UJ  
Kierownik Katedry: prof. dr. hab. med. Małgorzata Kłys  
Kierownik Zakładu: dr hab. med. Jerzy Kunz

Przedstawiono przypadek weryfikowania zmian chorobowych jako przyczyny wypadku drogowego, w którym, wskutek obrażeń ciała, śmierć poniósł kierowca – sprawca wypadku. Przeprowadzono diagnostykę histopatologiczną wycinków mięśnia sercowego pobranych w czasie sekcji zwłok. Pobrane wycinki barwiono rutynowo hematoksyliną i eozyną (H/E), metodą Nielsena-Selye’go i metodą immunohistochemiczną C9 w celu poszukiwania zmian weryfikujących hipotezę o możliwym wczesnym niedotlenieniu mięśnia sercowego. Uzyskane wyniki w barwieniu rutynowym, a zwłaszcza w metodzie immunohistochemicznej wykazały obraz przemawiający za uszkodzeniem mięśnia sercowego, tym samym znajdując morfologiczny wykładnik tłumaczący przyczynę nieprawidłowego zachowania kierowcy.

The authors presented a case of verification of pathologic changes as a cause of traffic accident where the driver – culprit was a fatal victim due to multiple injuries. Histopathological examination of postmortem samples of myocardium was conducted, using haematoxylin-eosin, Nielsen-Selye and immunohistochemical C9 staining methods for the reason of verifying a hypothesis about possible myocardial ischemia triggering the accident. Results of “routine” (H&E) and – especially – immunohistochemical C9 staining showed myocardial

damage due to ischemia, which was a morphological piece of evidence showing the cause of “misbehaviour” of the driver.

**Słowa kluczowe:** immunohistochemia, układ dopełniacza, wczesne niedotlenienie mięśnia sercowego

**Key words:** immunohistochemistry, complement compound, early myocardial ischaemia

Wypadek drogowy jako zdarzenie losowe może być wynikiem różnych przyczyn, których poszukiwanie jest przedmiotem późniejszego, wielospecjalistycznego postępowania [1]. W klasyfikacjach przyczyny wypadków grupuje się w kategoriach np. zewnętrzne i wewnętrzne, bądź obiektywne i subiektywne [2]. W przypadku zdarzeń skutkujących śmiercią uczestniczącego lub uczestniczących w nim osób przeprowadzane jest badanie pośmiertne sądowno-lekarskie dla stwierdzenia przyczyny i mechanizmu śmierci. Istotnym, jeśli nie podstawowym, aspektem badania pośmiertnego jest także zgromadzenie wszystkich możliwych obserwacji ważnych dla rekonstrukcji danego zdarzenia.

Inne znaczenie tych obserwacji będzie w przypadku potrącenia, inne w przypadkach osób z wnętrza pojazdu [3, 4].

W znaczącej liczbie przypadków ofiar śmiertelnych wypadków drogowych, gdy obrażenia wielonarządowe w wystarczający sposób tłumaczą przyczynę zgonu, a makroskopowe zmiany chorobowe samoistne nie wskazują na ewentualność przyczynienia się do zaistnienia wypadku, badania dodatkowe, a w szczególności histopatologiczne nie są podejmowane. W praktyce naszego Zakładu wyjątek stanowią przypadki śmierci kierowców. Nawet, gdy obrażenia są bardzo rozległe, jako podstawowe obok badania toksykologicznego na obecność alkoholu etylowego, traktowane jest badanie histopatologiczne wycinków narządów wewnętrznych, a przede wszystkim mięśnia sercowego.

W ramach prowadzonych w naszej Katedrze badań naukowych nad zastosowaniem metody immunohistochemicznej C9 w diagnostyce wczesnego zawału mięśnia sercowego, w pośmiertnym badaniu sądowo-lekarskim w przypadkach nagłych zgonów, zwróciliśmy uwagę na możliwość poszerzenia rutynowej diagnostyki histologicznej, także w przypadkach zgonów kierowców. Czynniki C9 wchodzi w skład układu dopełniacza. Układ dopełniacza stanowi zespół kaskadowo aktywowanych białek krążących w surowicy i należy do systemu obrony ustroju. Zasada metody immunohistochemicznej bazuje na fakcie aktywacji układu dopełniacza w niedokrwionym mięśniu sercowym we wczesnych fazach zawału, w mechanizmie niedokrwienia z następową reperfuzją [5]. W niedokrwionym mięśniu sercowym dochodzi nie tylko do aktywacji układu dopełniacza z powstaniem końcowego kompleksu C5b-9 i odkładania go we włóknach, ale także do tzw. pozawątrobowej syntezy różnych czynników dopełniacza w tym także czynnika C9 [6, 7, 8, 9].

Celem prowadzonych badań było określenie, czy możliwym jest uzyskanie wyników wskazujących na wczesne niedotlenienie mięśnia sercowego i wykazanie tego jako możliwej przyczyny zaistnienia wypadku. Ponadto porównaliśmy przydatność dotychczas stosowanej metody Nielsena-Selye'go w diagnostyce wczesnych zmian niedokrwienych mięśnia sercowego [10, 11].

W pracy prezentujemy jeden z przypadków śmierci kierowcy wskutek obrażeń odniesionych w wypadku drogowym, u którego zastosowana poszerzona diagnostyka immunohistochemiczna metodą C9 wykazała zmiany przemawiające za wczesnym niedotlenieniem mięśnia sercowego.

## OPIS PRZYPADKU

W listopadzie 2004 roku we wczesnych godzinach popołudniowych w miejscowości Murownia, na drodze krajowej pomiędzy Olkuszem a Krakowem, doszło do wypadku drogowego. Kierujący samochodem osobowym renault megane mężczyzna J. A. lat 73 w miejscu gdzie droga biegła łukiem w prawo, z nieustalonych przyczyn zjechał nagle na przeciwległy pas ruchu, wprost pod jadący z przeciwnego kierunku samochód dostawczy marki mercedes. W wyniku tego doszło do zderzenia czołowego pojazdów, a elementy karoserii uderzyły w jadący za mercedesem samochód ciężarowy scania. W trakcie wypadku jezdnia była sucha, czysta i gładka, a widoczność dobra. Zdarzenie miało miejsce w obszarze niezabudowanym w rozumieniu przepisów ustawy *Prawo o ruchu drogowym*. Na skutek odniesionych w wypadku obrażeń J. A. poniósł śmierć na miejscu. Badanie techniczne samochodu renault wykazało, że był on w pełni sprawny w chwili wypadku. Po analizie materiału dowodowego biegły do spraw rekonstrukcji wypadków drogowych ocenił, że prędkość zderzeniowa samochodu mercedes wynosiła około 70 km/h, a prędkość zderzeniowa samochodu renault około 80 km/h. Uznał, że zachowanie się kierującego samochodem renault, technika i taktyka jazdy, były jedyną przyczyną zaistnienia wypadku. Zarówno stan techniczny pojazdu jak i warunki drogowe oraz okoliczności zdarzenia nie tłumaczyły w żaden sposób przyczyny, dla której J. A. nagle zjechał na przeciwległy pas ruchu i doprowadził do zderzenia.

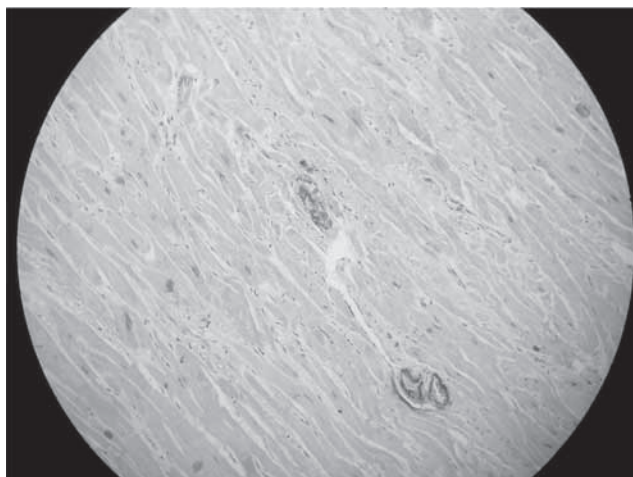
Następnego dnia w tut. Zakładzie przeprowadzono sekcję zwłok J. A. (1706/04). W wyniku badań pośmiertnych stwierdzono, że przyczyną zgonu były obrażenia klatki piersiowej skutkujące wylewami krwawymi do mięszu płuc, rozerwaniem worka osierdziowego, pęknięciem ściany przedniej prawej komory serca i całkowitym okrężnym rozerwaniem ściany aorty w obrębie łuku z następowym krwotokiem wewnętrznym. Warstwowe preparowanie powłok oraz mięśni przedniej powierzchni tułowia wykazało ślady obrażeń (układ podbiegnięć krwawych i złamań żeber) wskazujące na to, iż kierowca pojazdu był zapięty w pasy bezpieczeństwa. Poza zmianami urazowymi sekcja zwłok wykazała uogólnioną miażdżycę tętnic dość znacznego stopnia, bez istotnych zwężeń światła w obrębie tętnic wieńcowych serca, makroskopowo mięsień sercowy był brunatny, o zachowanej budowie włókienkowej i połysku. W badaniu toksykologicznym krwi i moczu zmarłego nie stwierdzono obecności alkoholu etylowego.

## MATERIAŁ

Przedmiotem badania były wycinki z mięśnia sercowego pobrane podczas sądowo-lekarskiej sekcji zwłok kierowcy. Ponieważ makroskopowy obraz mięśnia sercowego nie wykazywał zmian ogniskowych, wycinki zostały pobrane z pięciu różnych okolic mięśnia sercowego lewej komory serca. Nie pobierano materiału z rejonu pęknięcia serca w obrębie prawej komory.

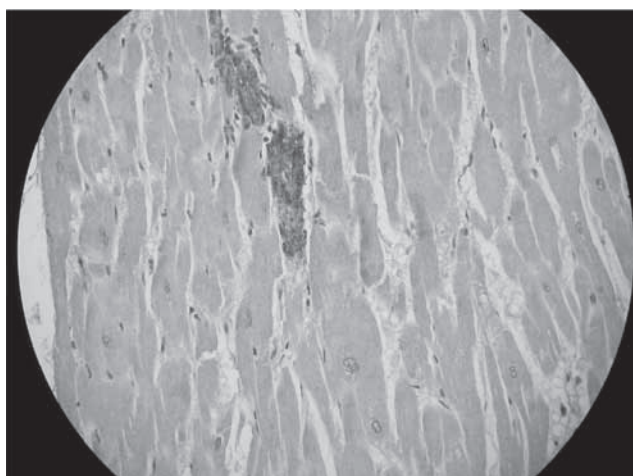
Ryc. 1. Dodatni odczyn immunohistochemiczny C9 w kardiomiocytach w rejonie włóknienia śródmiąższowego. Powiększenie 200 x.

Fig. 1. Positive result using C9 immunohistochemistry staining method of cardiomyocytes at the interstitial fibrosis region. Magnification 200 x.



Ryc. 2. Kardiomiocyty z obrazem dodatniego odczynu immunohistochemicznego C9. Powiększenie 400x.

Fig. 2. Positive result using C9 immunohistochemistry staining method. Magnification 400x.



## METODYKA

Wycinki utrwalone w 10% roztworze formaliny zostały przeprowadzone według techniki parafinowej i zatopione w bloczki histologiczne. Następnie skrojone na skrawki grubości  $4\mu\text{m}$ , 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 Poleya [12], 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 stopni C. Następnie, po przepłukaniu w wodzie bieżącej, bejcowano w roztworze B, w temperaturze 36 stopni C około 20 minut. Po tym czasie, preparaty płukano w wodzie bieżącej, a następnie impregnowano w roztworze C, w temperaturze 50 stopni C około 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] 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% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w buforze PBS. Po wypłukaniu inkubowano z I przeciwciałem przygotowanym w rozcieńczeniu 1:500 w komorze wilgotnej około 18 godzin w temperaturze 4 stopni C. Po wypłukaniu w buforze PBS inkubowano z II przeciwciałem przygotowanym w rozcień-

czeniu 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

W barwieniu metodą rutynową (H/E) stwierdzono: cechy przerostu kardiomiocytów, włóknienie okołonaczyniowe i nasilonie, rozległe włóknienie śródmiąższowe, pojedyncze kardiomiocyty w rejonie ognisk włóknienia miąższowego z zatarciem rysunku prążkowania, pomnożenie komórek w podścielisku oraz pogrubienie ścian naczyń ze zwężeniem światła.

W barwieniu metodą Nielsena-Selye'go (w modyfikacji Poley'a) otrzymano wynik ujemny we wszystkich barwionych preparatach.

W barwieniu metodą immunohistochemiczną C9 stwierdzono dodatni odczyn w rozsianych kardiomiocytach w dwóch preparatach w rejonie ognisk włóknienia śródmiąższowego.

## DYSKUSJA

Przyczyną zgonu kierowcy w prezentowanym przypadku były nie budzące wątpliwości obrażenia ciała, skutkujące gwałtowną, natychmiastową śmiercią na miejscu zdarzenia. Z ustaleń biegu do spraw rekonstrukcji wypadków drogowych wynikało, że przyczyną wypadku było zachowanie się kierowcy. Wy tłumaczeniem takiego zachowania mogło być wiele powodów. Wśród rozważanych przez nas, zainspirowanych zwłaszcza prowadzonymi badaniami w przypadkach nagłych zgonów wskazujących na sercowy mechanizm śmierci, były na pierwszym miejscu zaburzenia rytmu serca, w znaczącym procencie mające swe podłoże w niedokrwinnym uszkodzeniu mięśnia sercowego. Podjęte przez nas badania histopatologiczne w zakresie diagnostyki mięśnia sercowego miały na celu poszukiwanie uchwytnej morfologicznie, ewentualnej przyczyny chorobowej, tłumaczącej nieprawidłowe zachowanie kierowcy.

Badanie rutynowe mięśnia sercowego z zastosowaniem barwienia hematoksyliną i eozyną wykazało przewlekłe, zaawansowane zmiany w mięśniu sercowym, z przerostem kardiomiocytów, pogrubie-

niem ścian naczyń i nasilonym włóknieniem. Jakkolwiek pojedyncze kardiomiocyty wykazywały zmiany w strukturze, to jednak nie było to wystarczające do określenia genezy tych zmian, a w szczególności do diagnozowania wczesnego niedotlenienia.

Poszerzeniem diagnostyki było zastosowanie metody Nielsena-Selye'go, jednakże w badaniu pobranych wycinków uzyskano wynik ujemny, który, zważywszy na ograniczenia tej metody [14], także nie weryfikował hipotezy o możliwym niedokrwieniu mięśnia sercowego.

W badaniu immunohistochemicznym metodą C9 uzyskano natomiast wyniki dodatnie, przemawiające, zgodnie z przedstawionymi wcześniej podstawami biochemicznymi wykrywania aktywacji układu dopełniacza we wczesnym zawałe mięśnia sercowego, za niedokrwinnym, wczesnym charakterem zmian. Tym samym uzyskany wynik potwierdził naszą hipotezę o chorobowym podłożu nieprawidłowego zachowania.

Rozważenia wymaga jednak zagadnienie poszerzenia diagnostyki. Czy nie wystarczające dla wysnucia podanych wniosków, byłoby samo badanie rutynowe (H/E). Otóż w naszym przekonaniu, opierając się na wynikach własnych obserwacji, a także danych z piśmiennictwa, istotne poza genezą zmian jest także rozróżnienie zmian przyżyciowych od pośmiertnych, czy też jak w tym wypadku urazowych. Właśnie metoda immunohistochemiczna C9 wskazywana jest jako jedna z weryfikujących, różnicujących charakter zmian [15, 16]. Oczywiście zwrócić przy tym należy uwagę na istotny czynnik czasu ujawniania się „dodatniego” odczynu. W praktycznym zastosowaniu pewność detekcji wczesnego zawału mięśnia sercowego, metodą immunohistochemiczną C9, wzrasta z upływem czasu od zainicjowania objawów do śmierci, a kryterium 1 h podawane jest za realny czas wykrywania zmian [17]. Przyjęcie takich założeń daje nam pewność, że wykazane odczynem zmiany powstały wcześniej przed wypadkiem drogowym, w czasie co najmniej 1 godziny, co kategorycznie wyklucza możliwość ich powstania zarówno w chwili wypadku drogowego, jak i w odpowiedzi na urazowe uszkodzenie mięśnia, gdyż z uwagi na rozległość obrażeń czas przeżycia był na to zdecydowanie za krótki.

W prezentowanym przypadku zatem tylko dzięki badaniu immunohistochemicznemu metodą C9 mogliśmy zdiagnozować niedokrwenny charakter zmian w mięśniu sercowym, tym samym znajdując morfologiczny, chorobowy czynnik mogący tłumaczyć przyczynę wypadku drogowego.

## PIŚMIENNICTWO

1. Bialik Z.: Zespołowe, interdyscyplinarne opiniowanie w wypadkach drogowych w świetle dotychczasowej praktyki. *Arch. Med. Sąd. Kryminol.* 1981, 31, 211-215.
2. Jaegermann K., Nasiłowski W.: Wypadkowość drogowa, PZWL, Warszawa 1975.
3. Teresiński G., Mądro R.: Ewolucja metod sądowo-lekarskiej rekonstrukcji okoliczności potrażeń pieszych przez pojazdy mechaniczne – możliwości poszerzenia zakresu wnioskowania. *Arch. Med. Sąd. Kryminol.* 2001, 51, 259-272.
4. Teresiński G., Mądro R.: Historia badań w dziedzinie wypadkowości drogowej. *Arch. Med. Sąd. Kryminol.* 2001, 51, 249-257.
5. Ito W., Schafer H. J., Bhakdi S., Klask R., Hansen S., Schaarschmidt S., Schofer J., Hugo F., Hamdoch T., Mathey D.: Influence of the terminal complement - complex on reperfusion injury, no – reflow and arrhythmias: a comparison between C6 – complement and C6 – deficient rabbits. *Cardio-vasc. Res.* 1996, 32(2), 294-305.
6. 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.
7. Thomsen H., Schulz A., Bhakdi S.: Immunohistochemical C5b-9 – complement complex demonstration in early stages of myocardial necroses using paraffin sections. *Z. Rechtsmed.*, 1990, 103(3), 199-206.
8. 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.
9. 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.
10. Marek Z.: Diagnostyka sekcyjna i mikroskopowa świeżych zawałów mięśnia sercowego i ostrej niewydolności krążenia. *Pat. Pol.*, 1968, 19, 433-436.
11. 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.
12. Poley R. W. Forbes C. D., Hall M. J.: Fuchsinophilia in early myocardial infarction. *Arch. Pathol.* 1964, 77, 325-329.
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. Vargas S. O., Sampson B. A., Schoen F. J.: Pathologic detection of early myocardial infarction: A critical review of the evolution and usefulness of modern techniques. *Mod. Pathol.* 1999, 2, 635-645.
15. 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.
16. Fechner G., Bajanowski T., Brinkmann B.: Immunohistochemical alterations after muscle trauma. *Int. J. Leg. Med.* 1993, 105, 203-207.
17. Piercecchi-Marti M. D., Lepidi H., Leonetti G., Vire O., Cianfarani F., Pellissier J. F.: Immunostaining by complement C9: a tool for early diagnosis of myocardial infarction and application in forensic medicine. *J. Forensic Sci.*, 2001, 46(2), 328-334.

Praca powstała w ramach prowadzonych w latach 2004-2005 badań własnych WŁ/213/P/L.