

Установление прижизненности повреждений кожных покровов иммуногистохимическим методом с использованием маркера TNF-α

В.Н. Метр¹, Е.М. Кильдюшов², С.Н. Лихачева³, А.Ю. Крылов⁴

¹УО «Гомельский государственный медицинский университет», Гомель, Республика Беларусь

²ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Россия

³Управление судебно-гистологических экспертиз главного управления судебно-медицинских экспертиз центрального аппарата Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь, Минск, Республика Беларусь

⁴ГУО «Институт повышения квалификации и переподготовки кадров Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь», Минск, Республика Беларусь

АННОТАЦИЯ

В в е д е н и е . Установление прижизненности повреждений представляет собой одну из наиболее сложных и актуальных задач судебной медицины, имеющую неоспоримую значимость. Традиционные гистологические методы, основанные на оценке элементов воспалительной реакции, часто недостаточно чувствительны для диагностики повреждений, возникших незадолго до наступления смерти. Разработка и внедрение высокочувствительных молекулярно-морфологических методов является важным направлением развития экспертной практики. **Ц е л ь .** Оценка диагностической ценности такого иммуногистохимического маркера, как фактор некроза опухоли альфа (TNF-α), и метода количественного цифрового анализа для объективного установления прижизненного происхождения повреждений кожи, причиненных тупыми предметами.

М а т е р и а л ы и м е т о д ы . Проведено исследование образцов кожи от 14 трупов с документально подтвержденными прижизненными повреждениями (всего 28 срезов, 140 полей зрения). Изъятие образцов осуществлялось из области наружного повреждения, также изымался контрольный образец тканей из неповрежденной области. Парафиновые срезы окрашивались моноклональными антителами к TNF-α. Цифровые изображения анализировались с помощью программного обеспечения Fiji с применением цветовой деконволюции для выделения DAB-окраски и последующего определения площади экспрессии маркера в эпидермисе и дерме отдельно.

Р е з у л ь т а т ы . Обнаружено статистически значимое увеличение площади экспрессии TNF-α в зоне повреждения по сравнению с интактной кожей контрольных образцов. В эпидермисе разница по медианам составила –16,66 % ($p = 0,0002$), в дерме –7,93 % ($p = 0,0072$).

З а к л ю ч е н и е . Иммуногистохимическое выявление TNF-α в сочетании с количественным анализом цифровых изображений является высокоинформативным и объективным методом для установления прижизненности повреждений кожных покровов, который позволяет выявлять ранние молекулярные признаки альтерации, предшествующие морфологическим изменениям, и минимизирует субъективный фактор при интерпретации результатов, что повышает доказательственную ценность судебно-медицинского заключения.

Ключевые слова: прижизненность образования повреждений, иммуногистохимия.

Образец цитирования: Метр В.Н., Кильдюшов Е.М., Лихачева С.Н., Крылов А.Ю. Установление прижизненности повреждений кожных покровов иммуногистохимическим методом с использованием маркера TNF-α // Journal of Siberian Medical Sciences. 2026;10(1):21-31. DOI: 10.31549/2542-1174-2026-10-1-21-31

Поступила в редакцию 17.12.2025
Прошла рецензирование 22.01.2026
Принята к публикации 04.02.2026

Автор, ответственный за переписку
Метр Виталий Николаевич: УО «Гомельский государственный медицинский университет». 246000, Республика Беларусь, г. Гомель, ул. Ланге, 5.
E-mail: v.metr@mail.ru

Received 17.12.2025
Revised 22.01.2026
Accepted 04.02.2026

Corresponding author
Vitaliy N. Metr: Gomel State Medical University, 5, Lange str., Gomel, 246000, Republic of Belarus.
E-mail: v.metr@mail.ru

Estimation of vitality of skin injuries by immunohistochemistry using TNF- α

V.N. Metr¹, E.M. Kildyushov², S.N. Likhacheva³, A.Yu. Krylov⁴

¹Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus

²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³Department of Forensic Histological Examinations, Directorate General of Forensic Medical Examinations, Central Office of the State Forensic Examination Committee of the Republic of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

⁴Institute for Advanced Training and Retraining of Personnel, State Forensic Examination Committee of the Republic of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

ABSTRACT

I n t r o d u c t i o n . Estimation of wound vitality is one of the most challenging and urgent tasks in forensic medicine, having undeniable significance. Conventional histological methods, based on the assessment of inflammatory response elements, are often insufficiently sensitive for diagnosing injuries inflicted shortly before death. The development and implementation of highly sensitive molecular morphological methods is an important direction for advancing expert practice.

A i m . To evaluate the diagnostic value of such immunohistochemical marker as tumor necrosis factor- α (TNF- α) and the method of quantitative digital analysis for the objective determination of the vitality of skin blunt force injuries.

M a t e r i a l s a n d m e t h o d s . Skin samples from 14 cadavers with documented antemortem injuries (28 sections, 140 fields of view) were analyzed. Samples were taken from the area of external injury, and a control tissue sample was also taken from an undamaged area. Paraffin-embedded sections were stained with monoclonal antibodies to TNF- α . Digital images were analyzed using Fiji software using color deconvolution to isolate DAB staining and subsequently determine the area of marker expression in the epidermis and dermis separately.

R e s u l t s . A statistically significant increase in the area of TNF- α expression was found in the damaged area compared to intact skin in control samples. In the epidermis, the difference in medians was -16,66% ($p = 0,0002$), and in the dermis -7,93% ($p = 0,0072$).

C o n c l u s i o n . Immunohistochemical detection of TNF- α in combination with quantitative analysis of digital image is highly informative and objective method for ascertaining the skin wound vitality. This approach allows for the identification of early molecular signs of alteration preceding morphological changes and minimizes the subjective factor during the interpretation of results, which increases the evidentiary value of the forensic medical report.

Keywords: wound vitality, immunohistochemistry.

Citation example: Metr V.N., Kildyushov E.M., Likhacheva S.N., Krylov A.Yu. Estimation of vitality of skin injuries by immunohistochemistry using TNF- α . *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2026;10(1):21-31. DOI: 10.31549/2542-1174-2026-10-1-21-31

ВВЕДЕНИЕ

Диагностика прижизненности образования повреждений является одним из важнейших вопросов судебной медицины, который имеет прямое юридическое значение, поскольку непосредственно предопределяет часть правовой оценки события.

Определение прижизненности происхождения повреждений – важнейший аспект судебно-медицинского исследования трупа, от научной обоснованности которого зависят не только выводы заключения эксперта, но и нередко дальнейший ход судебного разбирательства.

Совершенствование методов определения прижизненного происхождения повреждений

INTRODUCTION

Estimation of the wound vitality is one of the most important issues in forensic medicine that is legally valid, as it directly determines part of the legal evaluation of the event. Determination of wound vitality is a crucial aspect of forensic postmortem examination. On the medical scientific validity of this determination not only the conclusions of the expert's report, but also the subsequent course of legal proceedings often depend.

Improving methods for determining the antemortem origin of injuries remains a forensic medicine key area of development[1–3]. Current methods of forensic diagnostics of wound vitality, based

продолжает оставаться ключевым направлением развития судебной медицины [1–3]. Современные методы судебно-медицинской диагностики прижизненности повреждений, базирующиеся на анализе стадий воспалительно-репаративного процесса, обладают существенными ограничениями. Их главный недостаток – низкая эффективность при оценке повреждений, полученных в агональном периоде, непосредственно предшествующем наступлению смерти. Это связано с невозможностью достоверно подтвердить или опровергнуть прижизненное происхождение травм из-за недостаточной чувствительности методик. В частности, они не позволяют выявлять молекулярные маркеры, включая ключевые медиаторы воспаления [4, 5].

Макроскопические признаки прижизненного происхождения повреждений находят свое подтверждение на микроскопическом уровне. Такие морфологические маркеры, как кровоизлияния и динамика воспалительно-репаративных процессов, составляют основу традиционной диагностики прижизненных травм.

Современные научные достижения предоставляют экспертам комплексный диагностический инструментарий для установления прижизненного характера повреждений, включающий морфологический анализ, цитологические исследования и методы молекулярной биологии [6, 7]. Иммуногистохимические методы исследования обеспечивают достоверную диагностику прижизненности повреждений в тех случаях, когда традиционная световая микроскопия сосудисто-стромальных реакций оказывается недостаточно информативной – в частности, при смерти, наступившей до развития выраженной воспалительной реакции [8].

Традиционная визуальная оценка иммуногистохимических реакций, основанная на субъективной интерпретации степени экспрессии (отсутствует/слабая/умеренная/сильная), вносит элемент субъективности в диагностику прижизненных повреждений. Современные цифровые методы анализа, использующие количественные параметры (площадь окрашивания, оптическая плотность), позволяют минимизировать этот фактор, обеспечивая объективную верификацию результатов [9].

Данное исследование основано на оценке экспрессии маркера TNF- α (tumor necrosis factor) – воспалительного цитокина, вырабатываемого макрофагами/моноцитами в периоде острого воспаления, который отвечает за широкий спектр сигнальных событий внутри клеток, приводящих

on the analysis of the phases of the inflammatory-reparative response, have significant limitations. Their main drawback is their low effectiveness in assessing wounds inflicted during the agonal period immediately before death, which is associated with the inability to reliably confirm or refute the antemortem origin of injuries due to the insufficient sensitivity of these methods. In particular, they do not allow the identification of molecular markers, including key inflammatory mediators [4, 5].

Signs of wound vitality revealed during gross examination are confirmed by microscopy. Morphological markers such as hemorrhages and the dynamics of inflammatory-reparative response form the basis of traditional diagnosis of antemortem injuries.

Modern scientific advances provide experts with a comprehensive range of tools for estimating the antemortem origin of injury, including morphological analysis, cytological studies, and molecular biology methods [6, 7]. Immunohistochemical methods provide reliable diagnosis of wound vitality in cases when conventional light microscopy of vascular and stromal response is less informative, particularly in cases of death occurring before the development of a pronounced inflammatory response [8].

Traditional visual assessment of immunohistochemical reactions, based on subjective interpretation of the grade of expression (absent/weak/moderate/strong), introduces an element of subjectivity into the diagnosis of antemortem injuries. Modern digital methods using quantitative parameters (staining area, optical density) minimize this factor, ensuring objective verification of results [9].

This study is based on the assessment of the expression of TNF- α (tumor necrosis factor alpha), an inflammatory cytokine produced by macrophages/monocytes during acute inflammation, which is responsible for a wide range of signaling events within cells leading to necrosis or apoptosis [10]. Activated macrophages are the main, but not the only source of TNF- α , since many other cell types, such as helper T cells, natural killer cells, neutrophils, mast cells, eosinophils, and neurons, can also produce it [11, 12].

AIM OF THE RESEARCH

To determine the diagnostic value of such marker as TNF- α in estimation of vitality of skin blunt force injuries (abrasions, wounds), using software for analyzing digital images.

к некрозу или апоптозу [10]. Активированные макрофаги являются основным, но не единственным источником TNF- α , поскольку многие другие типы клеток, такие как Т-хелперы, естественные клетки-киллеры, нейтрофилы, тучные клетки, эозинофилы и нейроны, также могут его продуцировать [11, 12].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определить диагностическую ценность маркера TNF- α при установлении прижизненности образования повреждений кожи (ссадин, ран), возникших от действия тупых предметов, с использованием программного обеспечения для анализа цифровых изображений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании были использованы результаты иммуногистохимических исследований, проведенных в 2023 г. отделом судебно-гистологических экспертиз центрального аппарата Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь.

Материал для исследования отбирали от трупов, соответствующих следующим критериям: давность смерти не превышала 24 ч – труп находился при комнатной температуре или 72 ч – труп находился в холодильной камере (+4...+10 °C). Все повреждения имели документально подтвержденное прижизненное происхождение. Критерий исключения: любые визуальные признаки гнилостных изменений, независимо от давности наступления смерти (гнилостная венозная сеть, трупная эмфизема, гнилостные пузыри).

Материал был получен от 14 умерших. Всего исследовано 28 срезов в 140 полях зрения. Изъятие образцов осуществлялось из области наружного повреждения, также изымался контрольный образец тканей из неповрежденной области на расстоянии не менее 15 см от повреждения или с контралатеральной стороны тела. Размеры фрагментов кожи не превышали 1,5–2,0 см в длину, 1,0–1,5 см в ширину и 0,5–0,8 см в толщину, материал изымался по периферии повреждения с захватом неповрежденной ткани. Материал забирали в 10% раствор нейтрального забуференного формалина, препараты маркировались. В емкость с фиксирующей жидкостью помещался объем материала не более чем на 1/3 объема жидкости. Полученные образцы тканей немедленно (или не позднее 15–20 мин после забора) помещали в фиксирующий раствор. Фиксация материала проводилась в течение 24–48 ч.

MATERIALS AND METHODS

In our study, the results of immunohistochemical examinations performed in 2023 by the Department of Forensic Histological Examinations of the Central Office of the State Forensic Examination Committee of the Republic of Belarus were used.

Samples for the study were taken from cadavers that met the following criteria: death within 24 h (the cadavers were kept at room temperature) or 72 h (the cadavers were kept in a refrigerated chamber (+4...+10°C)). All injuries were evidenced ante-mortem. Exclusion criteria: any visual signs of putrefactive changes, regardless of the time of death (putrefactive venous network, cadaveric emphysema, putrefactive blisters).

Skin tissue samples were taken from 14 cadavers. A total of 28 sections in 140 fields of view were examined. Samples were taken from the area of external skin lesion; also, a control sample was taken from an intact area at least 15 cm away from the lesion or from the contralateral side of the body. Skin samples did not exceed 1,5–2,0 cm in length, 1,0–1,5 cm in width, and 0,5–0,8 cm in thickness, and were taken on the periphery of the lesion including intact tissue. Samples were placed into 10% neutral buffered formalin and then labeled. A volume of the material no more than 1/3 of the volume of the liquid was placed in a container with fixative. The skin tissue samples obtained were immediately (or no later than 15–20 min after taking) placed in a fixative solution. The samples were fixed for 24–48 h. For subsequent histological examination, paraffin blocks were prepared at a paraffin temperature not exceeding 60°C. Then, 5- μ m-thick serial sections were obtained from each paraffin block, which were used for immunohistochemical analysis.

The analysis was performed using specific antibodies to TNF- α , which allowed for the detection and localization of the biomarkers of interest in the studied tissues. When the histological sections have been prepared, sequential specimen processing was performed. First, specimens were washed twice in phosphate buffer (pH 7,3) at an exposure of 5 min for each step. Then, primary antibodies to TNF- α (Abcam, UK) were applied at a dilution of 1:50, followed by incubation in a controlled-humidity chamber for 60 min at room temperature. After repeated two-fold washes in phosphate buffer (5 min each), secondary antibodies from a Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB IHC Detection Kit (Micro-polymer) with a 30-min incubation in controlled-humidity chamber were applied. The final step included last two washes in buffer solution and

Для последующего гистологического исследования изготавливали парафиновые блоки при температуре парафина, не превышающей +60 °С. Из каждого парафинового блока получали серийные срезы толщиной 5 мкм, которые затем использовали для проведения иммуногистохимического исследования.

Анализ проводили с применением специфических антител к TNF- α , что позволяло выявить и локализовать интересующие биомаркеры в исследуемых тканях. После подготовки гистологических срезов проводили последовательную обработку препаратов. Сначала выполняли двукратное промывание в фосфатном буфере (pH 7,3) с экспозицией 5 мин для каждого этапа. Затем наносили первичные антитела к TNF- α (Abcam, Великобритания) в разведении 1:50 с последующей инкубацией во влажной камере в течение 60 минут при комнатной температуре. После повторного двукратного промывания в фосфатном буфере (по 5 мин) проводили обработку вторичными антителами системы визуализации Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB IHC Detection Kit (Micro-polymer) с 30-минутной инкубацией во влажной камере. Завершающий этап включал финальное двукратное промывание в буферном растворе и монтирование препаратов под покровные стекла с использованием монтажной среды Biomount (BioOptica, Италия). Проводился негативный контроль иммуногистохимического исследования [13].

Изготовленные срезы предварительно исследовали под световым микроскопом, после чего с использованием системы Motic EasyScan (Motic China Group Co., Ltd., КНР) делали цифровые сканы полученных срезов, которые затем изучались с применением программного обеспечения Motic VM 3.0 – Motic Digital Slide Assistant (Motic China Group Co., Ltd., КНР) при увеличении $\times 400$. В каждом отсканированном срезе исследовалось не менее пяти полей зрения, с последующим их фотографированием. После стандартной подготовки гистологических срезов проводили их предварительную оценку с использованием светового микроскопа. В рамках исследования каждого сканированного образца анализировали минимум пять репрезентативных полей зрения с обязательной их цифровой документацией (рис. 1). Полученные цифровые изображения открывались при помощи программного обеспечения Fiji [14]. Данное программное обеспечение распространяется с открытым исходным кодом (свободная лицензия GNU General Public License).

mounting the specimens under coverslips using a Biomount mounting medium (BioOptica, Italy). During immunohistochemical study negative control was used [13].

The sections were preliminarily examined under a light microscope; thereafter, digital scans of the sections were made using a Motic EasyScan scanner (Motic China Group Co., Ltd., PRC); then the sections were studied using the Motic VM 3.0 – Motic Digital Slide Assistant software (Motic China Group Co., Ltd., PRC) at a magnification of 400. In each section scanned, at least five fields of view were examined and their photographs were taken. After standard processing of histological sections, they were preliminarily assessed using light microscope. As part of the study of each scanned specimen, at least five representative fields of view were analyzed under mandatory digital documentation (Fig. 1). The digital images obtained were opened using Fiji software [14]. This software is distributed as open source (free license GNU General Public License).

Modern digital devices use RGB technology to render color, in which any hue is created by combining three essential colors – red, green, and blue. This combination determines the color of an individual pixel, which is the smallest element of a digital image. Consequently, the combination of all these pixels forms the complete image we see on the screen.

The color of immunohistochemical staining was extracted from the general color set of digital photographs using the Color Deconvolution function, which allows separating the colors present in the image with known RGB parameters of the pixels, one of which (Colour [2]) determines the color of the marker (chromogen – 3,3'-diaminobenzidine (DAB)): Colour [2]: R2: 0,268 G2: 0,57 B2: 0,776. As a result of applying the color deconvolution function, an “isolated” color was obtained from the original digital photograph, corresponding to the DAB chromogen (Fig. 2).

The images obtained during color deconvolution had clear negative staining, which was leveled out by adjusting the maximum and minimum threshold values for DAB staining before calculations were performed (Fig. 3).

Next, the analyzed area of the image was manually selected, avoiding obvious artifacts (section folds, dye grains, etc.), the stratum corneum, and, if possible, skin appendages and large vessels. For each digital photograph, two separate areas were analyzed: one for the epidermis and one for the dermis, respectively. The border of the epidermis area was

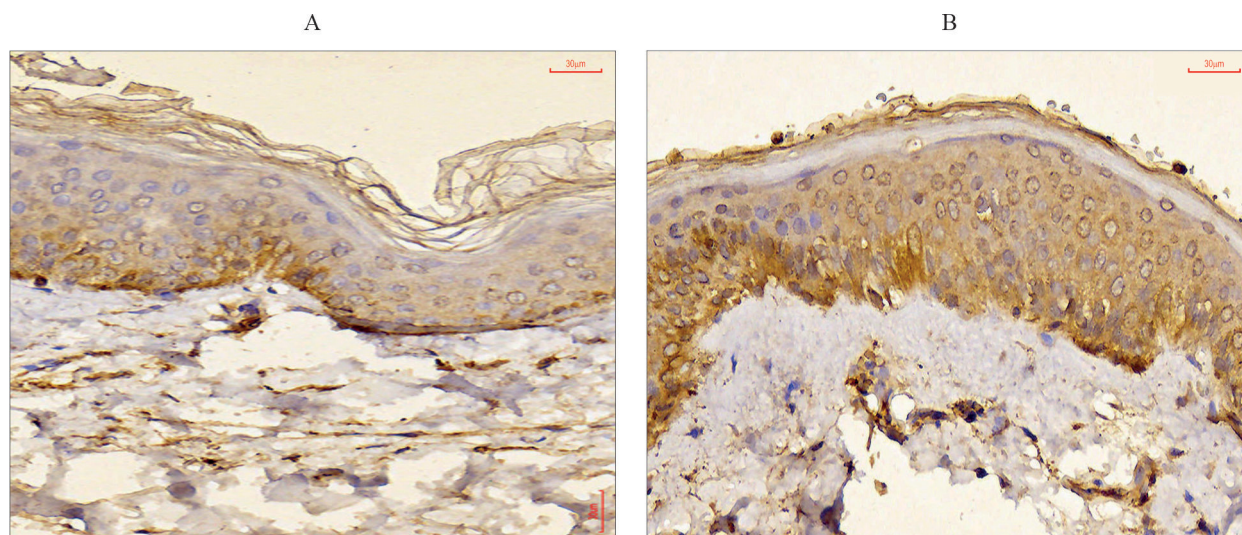


Рис. 1. Цифровые фотографии образцов (А – контрольный; В – из области повреждения) с экспрессией TNF- α .
Окрашивание – гематоксилин Майера. Увеличение $\times 400$
Fig. 1. Digital photographs of samples (A – from the control area; B – from the area of lesion) with TNF- α expression.
Stained with Mayer's hematoxylin. Magnification $\times 400$

Современные цифровые устройства используют технологию RGB для передачи цвета, в которой любой оттенок создается путем комбинации трех основных цветов – красного, зеленого и синего. Именно их сочетание определяет цвет отдельного пикселя, который является минимальным элементом цифрового изображения. В результате совокупность всех этих пикселей формирует целостную картинку, которую мы видим на экране.

Цвет иммуногистохимической окраски выделялся из общего пула цветов на цифровой фотографии при помощи функции Color Deconvolution (цветовая деконволюция), которая позволяет разделять имеющиеся цвета на изображении с известными RGB параметрами пикселей и один из них (Colour [2]) определяет цвет маркера (хромоген – 3,3'-диаминобензидин (DAB)): Colour [2]: R2: 0,268 G2: 0,57 B2: 0,776. В результате применения функции цветовой деконволюции получали «изолированный» цвет из исходной цифровой фотографии, соответствующий DAB хромогену (рис. 2).

Полученные в результате цветовой деконволюции изображения имели очевидное фоновое окрашивание, которое перед проведением расчетов нивелировалось путем регулировки максимального и минимального пороговых значений для окрашивания DAB (рис. 3).

Далее в ручном режиме осуществлялось выделение области анализа изображения, при этом не допускалось попадания в нее явных артефактов

the basement membrane and the stratum lucidum. The dermis was examined from the basement membrane down to the subcutaneous fat, if present. Each area was analyzed separately using Fiji software. The expression area was detected, which represents objective data obtained by calculating the DAB (antigen expression area) staining area as a percentage of the selected area.

Similar measurements were done for each digital photograph (field of view), and the data obtained were then transferred in a Microsoft Excel spreadsheet. The spreadsheet included the number of analysis, number of image, as well as parameters for both the epidermis and dermis – both in the injured area and in the control area.

Statistical analysis of the data obtained was performed using GraphPad Prism 10 software. For normal distributed data, the Shapiro-Wilk test was used separately for values of the epidermis and dermis in both the damaged and control areas. The analysis revealed non-normally distributed data, which prompted the use of the non-parametric Mann-Whitney test (Mann-Whitney *U*-test or Wilcoxon signed-rank test).

RESULTS AND DISCUSSION

When evaluating the data obtained, it was found that the formation of abrasions and contused wounds due to blunt force trauma is accompanied by the expression of TNF- α in the damaged area both in the epidermis and in the dermis in comparison with intact skin from the control area.

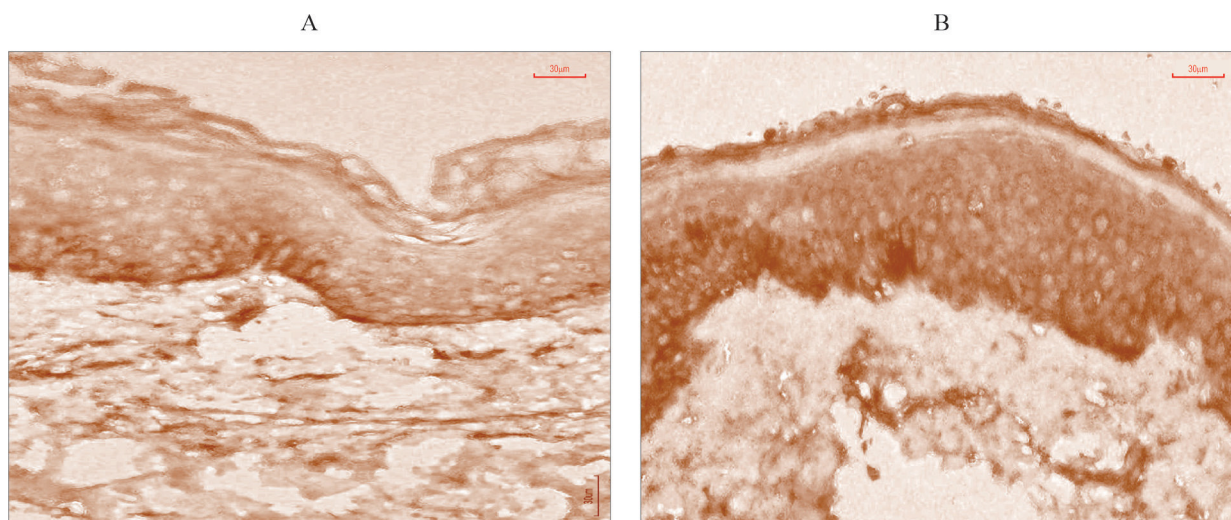


Рис. 2. Цифровые фотографии образцов из контрольной области (А) и области повреждения (В). Иммуногистохимическое окрашивание с антителами к TNF- α после цветовой деконволюции с параметрами R2: 0,268; G2: 0,57; B2: 0,776. Увеличение $\times 400$

Fig. 2. Digital photographs of samples from the control (A) and the lesion (B) areas. Immunohistochemical staining with antibodies to TNF- α after color deconvolution (R2: 0,268; G2: 0,57; B2: 0,776). Magnification $\times 400$

(складки среза, зерна красителя и т.д.), рогового слоя кожи, а также, по возможности, придатков кожи, крупных сосудов. Для каждой цифровой фотографии было определено две отдельные области анализа: для эпидермиса и для дермы соответственно. Границей области исследования эпидермиса являлась базальная мембрана и блестящий слой. Дерма исследовалась от базальной мембраны и до подкожно-жировой клетчатки при наличии таковой. Каждая из областей анализировалась отдельно при помощи программного обеспечения Fiji – регистрировалась площадь

According to the Shapiro-Wilk test results for both the epidermis and dermis, both data sets did not show a normal distribution at a significance level of $\alpha = 0,05$. For further analysis (sample comparison), the nonparametric Mann-Whitney test was used. The obtained results of comparing the TNF- α expression area for the epidermis from the area of lesion and from the control area (Fig. 4) indicate the presence of statistically significant differences: $p < 0,05$ (0,0002), the difference between medians: -16,66, the rank sum for sample A (1189) is significantly higher than for sample B (351).

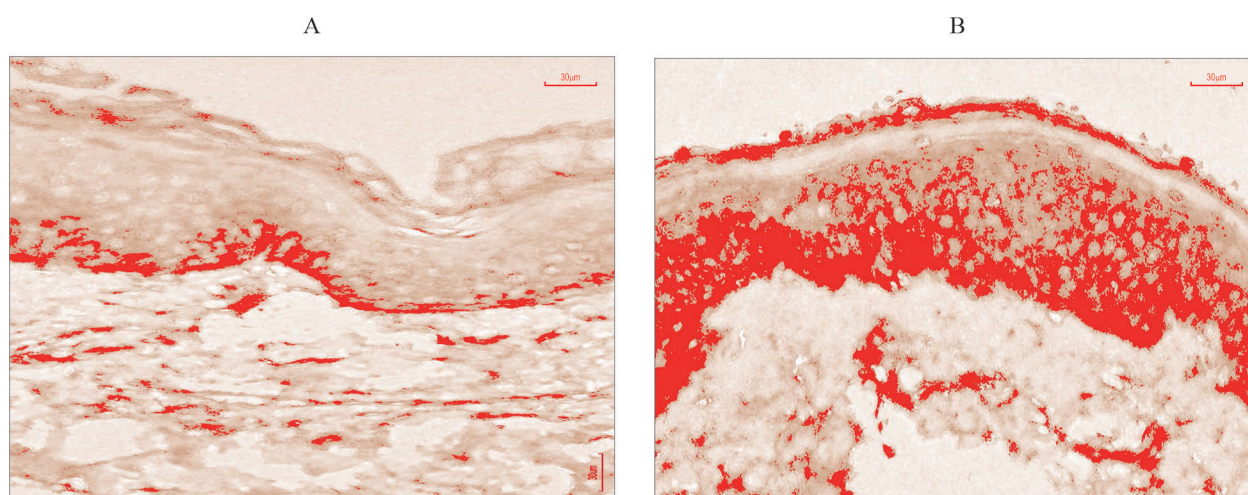


Рис. 3. Установленные пороговые значения для окрашивания DAB (3,3'-диаминобензидин). Увеличение $\times 400$: А – образец из контрольной области; В – образец из зоны повреждения

Fig. 3. Threshold values for DAB (3,3'-diaminobenzidine) staining. Magnification $\times 400$: А – sample from the control area; В – sample from the area of lesion

экспрессии, которая представляет собой объективные данные, полученные в результате расчета программой площади окрашивания DAB (площадь экспрессии антигена) в процентах относительно выделенной области.

Для каждой цифровой фотографии (поля зрения) выполнялись аналогичные измерения, после чего полученные данные фиксировались в таблице Microsoft Excel. В таблице указывались маркировка исследования, номер снимка, а также соответствующие параметры как для эпидермиса, так и для дермы – как в зоне повреждения, так и в контрольной области.

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 10. Для оценки нормальности распределения данных применяли критерий Шапиро – Уилка отдельно для показателей эпидермиса и дермы как в зоне повреждения, так и в контрольной области. Анализ выявил отклонения от нормального распределения, что послужило основанием для использования непараметрического критерия Манна – Уитни (*U*-критерий Манна – Уитни или ранговый критерий Уилкоксона).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При оценке полученных данных было установлено, что образование ссадин и ушибленных ран при травме тупыми предметами сопровождается экспрессией TNF- α в зоне повреждения как в эпидермисе, так и в дерме в сравнении с интактной кожей из контрольной области.

По результатам теста Шапиро – Уилка как для эпидермиса, так и для дермы оба набора данных не показали нормального распределения при уровне значимости $\alpha = 0,05$. Для дальнейшего анализа (сравнения выборок) использовали непараметрический тест Манна – Уитни. Полученные результаты сравнения площади экспрессии TNF- α для эпидермиса из области повреждения и из контрольной зоны (рис. 4) указывают на наличие статистически значимых различий: $p < 0,05$ (0,0002), разница между медианами: –16,66, сумма рангов для выборки А (1189) значительно выше, чем для выборки В (351).

Полученные результаты сравнения площади экспрессии TNF- α для дермы из области повреждения и из контрольной области (см. рис. 4) указывают на наличие статистически значимых различий: $p < 0,05$ (0,0072), разница между медианами: –7,932, сумма рангов для выборки А (1132) значительно выше, чем для выборки В (408).

The obtained results of comparison of the area of TNF- α expression for the dermis from the lesion and control areas (Fig. 4) indicate the presence of statistically significant differences: $p < 0,05$ (0,0072), the difference between medians: –7,932, the sum of ranks for sample A (1132) is significantly higher than for sample B (408).

Our study confirms the reasonability of using specialized software for image analysis to evaluate the chromogenic staining (DAB) results. This approach offers the following advantages: exclusion of artifacts during the area-of-interest selection stage; quantitative presentation of results of immunohistochemical (IHC) study as objective numerical parameters (area in percentage of the selected region); elimination of the subjective factor in data interpretation; and intuitively comprehensible visualization of results that is intelligible for non-specialists.

The study demonstrated that modern IHC methods open up new perspectives in forensic medicine, offering fundamentally new possibilities for molecular diagnostics. Innovative approaches allow forensic histologists and thanatologists to substantiate their conclusions at a new level totally, detecting molecular markers and subcellular changes that precede visible morphological transformations. The integrated use of these techniques with modern computer technologies of image analysis is particularly informative. This enables objectively to solve diagnostic issues that previously were interpreted with much difficulties. At the current stage of forensic medicine's development, the synthesis of advanced laboratory methods and digital technologies significantly expands the scope of forensic examination capabilities.

CONCLUSION

Using objective and statistically significant data obtained through automated digital image processing, we confirmed the informative value of TNF- α for diagnosing the vitality of injuries by its expression in both the epidermis and dermis compared to a control area. Automated image analysis allows for standardization of the assessment of IHC results, increasing their accuracy and reproducibility.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

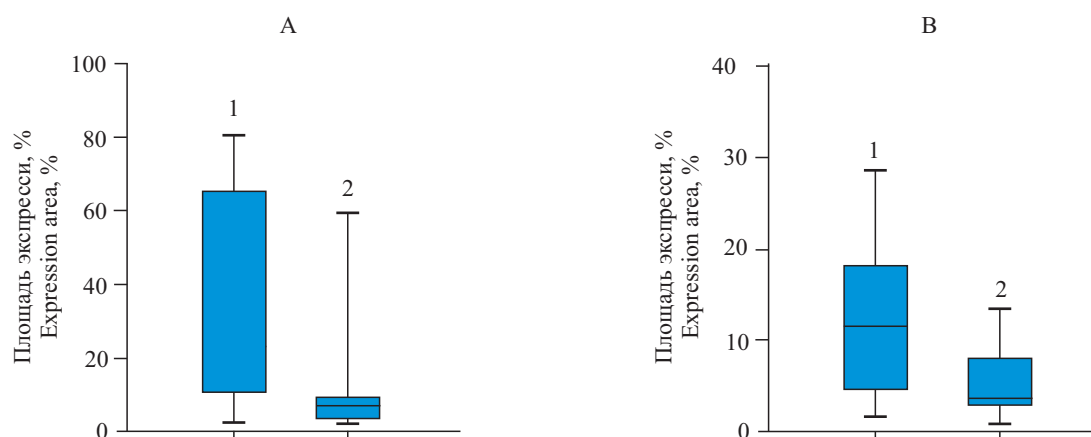


Рис. 4. Графическое представление распределения данных для групп эпидермиса (А) и дермы (В) из области повреждения (1) и контрольной области (2)

Fig. 4. Graphical representation of the data distribution for the epidermis (A) and dermis (B) groups from the area of lesion (1) and the control area (2)

Проведенное исследование подтверждает целесообразность использования специализированного программного обеспечения для анализа изображений при оценке результатов хромогенного окрашивания (DAB). Данный подход обеспечивает следующие преимущества: исключение артефактов на этапе выделения исследуемой области; количественное представление результатов иммуногистохимического (ИГХ) исследования в виде объективных цифровых показателей (площадь в процентах от выделенного участка); устранение субъективного фактора при интерпретации данных; визуализация результатов в интуитивно понятной форме, доступной для восприятия неспециалистами.

Проведенное исследование показало, что современные ИГХ методы открывают новые перспективы в судебно-медицинской практике, предоставляя принципиально новые возможности молекулярно-биологической диагностики. Инновационные подходы позволяют экспертам-гистологам и танатолам обосновывать свои заключения на качественно новом уровне – выявляя молекулярные маркеры и субклеточные изменения, предшествующие видимым морфологическим преобразованиям. Особую информативность имеет комплексное использование этих

методик с современными компьютерными технологиями анализа изображений. Это дает возможность объективно решать диагностические задачи, которые ранее могли не поддаваться достоверной интерпретации. На современном этапе развития судебной медицины синтез передовых лабораторных методов и цифровых технологий существенно расширяет границы возможностей выполнения экспертизы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Статистически достоверно, на основании объективных данных, полученных в результате автоматизированной обработки цифровых изображений, подтверждена информативность применения маркера TNF-α для диагностики прижизненности повреждений путем оценки его экспрессии как в эпидермисе, так и в дерме при сравнении с контрольной областью. Автоматизированный анализ изображений позволяет стандартизировать процесс оценки ИГХ реакции, повышая достоверность и воспроизводимость результатов исследований.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Куприянов Д.Д., Федулова М.В. Выявление некоторых маркеров ранней фазы воспалительно-репаративного процесса при механических повреждениях кожи // Судебно-медицинская экспертиза. 2024;67(2):17-19. DOI: 10.17116/sudmed20246702117.
2. Судебная медицина : национальное руководство / Ю.И. Пиголкин, Д.Д. Куприянов, А.В. Копылов

REFERENCES

1. Kupriyanov D.D., Fedulova M.V. Detection of some markers of the early phase of the inflammatory and reparative process in mechanical skin injuries. *Forensic Medical Expertise*. 2024;67(2):17-19. DOI: 10.17116/sudmed20246702117. (In Russ.)
2. Pigolkin Yu.I., Kupriyanov D.D., Kopylov A.V. et al.; ed. by Yu.I. Pigolkin (2018). *Forensic Medicine: National*

- и др.; под ред. Ю.И. Пиголкина. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2018. 576 с.
3. Суркова Е.И. Определение давности механических повреждений иммуногистохимическим методом // Проблемы экспертизы в медицине. 2014;14(4(56)):12-14.
 4. Федуллова М.В., Куприянов Д.Д. Достоверность иммуногистохимической оценки прижизненности и давности повреждений: анализ и перспективы исследований // Судебно-медицинская экспертиза. 2020;63(2):52-57. DOI: 10.17116/sudmed20206302152.
 5. Ohshima T. Forensic wound examination // *Forensic Sci. Int.* 2000;113(1-3):153-164. DOI: 10.1016/s0379-0738(00)00269-3.
 6. Cecchi R. Estimating wound age: looking into the future // *Int. J. Legal Med.* 2010;124(6):523-536. DOI: 10.1007/s00414-010-0505-x.
 7. Grellner W., Madea B. Demands on scientific studies: vitality of wounds and wound age estimation // *Forensic Sci. Int.* 2007;165(2-3):150-154. DOI: 10.1016/j.forsciint.2006.05.029.
 8. Wenzlow N., Mills D., Byrd J. et al. Review of the current and potential use of biological and molecular methods for the estimation of the postmortem interval in animals and humans // *J. Vet. Diagn. Invest.* 2023;35(2):97-108. DOI: 10.1177/10406387231153930.
 9. Crowe A.R., Yue W. Semi-quantitative determination of protein expression using immunohistochemistry staining and analysis: an integrated protocol // *Bio Protocol.* 2019;9(24):e3465. DOI: 10.21769/BioProtoc.3465.
 10. Idriss H.T., Naismith J.H. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s) // *Microsc. Res. Tech.* 2000;50(3):184-195. DOI: 10.1002/1097-0029(20000801)50:3<184::AID-JEMT2>3.0.CO;2-H.
 11. Panwar R., Shekhawat R.S., Shukla K.K. et al. Quantitative estimation of TNF- α and IL-3 by using ELISA from human lung tissue in fatal asphyxial deaths // *J. Forensic Leg. Med.* 2023;98:102559. DOI: 10.1016/j.jflm.2023.102559.
 12. Spiekstra S.W., Toebak M.J., Sampat-Sardjoeppersad S. et al. Induction of cytokine (interleukin-1 α and tumor necrosis factor- α) and chemokine (CCL20, CCL27, and CXCL8) alarm signals after allergen and irritant exposure // *Exp. Dermatol.* 2005;14(2):109-116. DOI: 10.1111/j.0906-6705.2005.00226.x.
 13. Зиновкин Д.А. Роль воспалительного компонента опухолевого микроокружения эндометриодной аденокарциномы тела матки при различных исходах заболевания // Опухоли женской репродуктивной системы. 2016;12(1):73-78. DOI: 10.17650/1994-4098-2016-12-1-73-78.
 14. Fiji. URL: <https://imagej.net/software/fiji/#publication> (дата обращения: 14.12.2025).
 - Guidelines. Moscow: GEOTAR-Media, 2018. 576 p. (In Russ.)
 3. Surkova E.I. Wound age estimation by immunohistochemical method. *Medical Examination Problems.* 2014;14(4(56)):12-14. (In Russ.)
 4. Fedulova M.V., Kupriyanov D.D. Reliability of the immunohistochemical estimation of vitality and injury age: analysis and perspectives for study. *Forensic Medical Expertise.* 2020;63(2):52-57. DOI: 10.17116/sudmed20206302152. (In Russ.)
 5. Ohshima T. Forensic wound examination. *Forensic Sci. Int.* 2000;113(1-3):153-164. DOI: 10.1016/s0379-0738(00)00269-3.
 6. Cecchi R. Estimating wound age: looking into the future. *Int. J. Legal Med.* 2010;124(6):523-536. DOI: 10.1007/s00414-010-0505-x.
 7. Grellner W., Madea B. Demands on scientific studies: vitality of wounds and wound age estimation. *Forensic Sci. Int.* 2007;165(2-3):150-154. DOI: 10.1016/j.forsciint.2006.05.029.
 8. Wenzlow N., Mills D., Byrd J. et al. Review of the current and potential use of biological and molecular methods for the estimation of the postmortem interval in animals and humans. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2023;35(2):97-108. DOI: 10.1177/10406387231153930.
 9. Crowe A.R., Yue W. Semi-quantitative determination of protein expression using immunohistochemistry staining and analysis: an integrated protocol. *Bio Protocol.* 2019;9(24):e3465. DOI: 10.21769/BioProtoc.3465.
 10. Idriss H.T., Naismith J.H. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc. Res. Tech.* 2000;50(3):184-195. DOI: 10.1002/1097-0029(20000801)50:3<184::AID-JEMT2>3.0.CO;2-H.
 11. Panwar R., Shekhawat R.S., Shukla K.K. et al. Quantitative estimation of TNF- α and IL-3 by using ELISA from human lung tissue in fatal asphyxial deaths. *J. Forensic Leg. Med.* 2023;98:102559. DOI: 10.1016/j.jflm.2023.102559.
 12. Spiekstra S.W., Toebak M.J., Sampat-Sardjoeppersad S. et al. Induction of cytokine (interleukin-1 α and tumor necrosis factor- α) and chemokine (CCL20, CCL27, and CXCL8) alarm signals after allergen and irritant exposure. *Exp. Dermatol.* 2005;14(2):109-116. DOI: 10.1111/j.0906-6705.2005.00226.x.
 13. Zinovkin D.A. The role of tumor inflammatory component of the tumor microenvironment of the endometrioid adenocarcinoma of the corpus uteri in different disease outcomes. *Tumors of Female Reproductive System.* 2016;12(1):73-78. DOI: 10.17650/1994-4098-2016-12-1-73-78. (In Russ.)
 14. Fiji. URL: <https://imagej.net/software/fiji/#publication> (accessed 14.12.2025).

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Метр Виталий Николаевич – старший преподаватель кафедры патологической анатомии УО «Гомельский государственный медицинский университет», Гомель, Республика Беларусь. ORCID: 0009-0004-7683-4957.

ABOUT THE AUTHORS

Vitaliy N. Metr – Senior Lecturer, Department of Pathological Anatomy, Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus. ORCID: 0009-0004-7683-4957.

Evgeniy M. Kildyushov – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head, Department of Forensic Medicine named after P.A. Minakov, Institute of Human Biology and Patho-

Кильдюшов Евгений Михайлович – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой судебной медицины им. П.А. Минакова Института биологии и патологии человека ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Россия.

Лихачева Светлана Николаевна – начальник управления судебно-гистологических экспертиз главного управления судебно-медицинских экспертиз центрального аппарата Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь, Минск, Республика Беларусь.

Крылов Андрей Юрьевич – канд. мед. наук, доцент, заведующий кафедрой судебной медицины ГУО «Институт повышения квалификации и переподготовки кадров Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь», Минск, Республика Беларусь. ORCID: 0000-0001-7171-6928.

logy, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia.

Svetlana N. Likhacheva – Head, Department of Forensic Histological Examinations, Directorate General of Forensic Medical Examinations, Central Office of the State Forensic Examination Committee of the Republic of Belarus, Minsk, Republic of Belarus.

Andrey Yu. Krylov – Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Head, Department of Forensic Medicine, Institute for Advanced Training and Retraining of Personnel, State Forensic Examination Committee of the Republic of Belarus, Minsk, Republic of Belarus. ORCID: 0000-0001-7171-6928.

