

Medicinski fakultet Niš
Institut za sudsku medicinu

Originalni naučni rad
Original study
UDK 616.61-091.5:612.08
DOI:10.2298/MPNS1002015Z

ULTRASTRUKTURNE PROMENE EPITELNIH ĆELIJA PROKSIMALNIH TUBULA BUBREGA U POSTMORTNOJ AUTOLIZI - EKSPERIMENTALNI RAD

ULTRASTRUCTURAL CHANGES OF RENAL EPITHELIAL CELLS DURING POSTMORTEM AUTOLYSIS - EXPERIMENTAL WORK

Miodrag ZDRAVKOVIĆ

Sažetak - Utvrđivanje redosleda i određene pravilnosti ultrastrukturnih promena epitelnih ćelija proksimalnih tubula bubrege tokom postmortalnog vremenskog intervala veoma je korisno u sudskomedicinskoj praksi za ekspertizno zaključivanje o vremenu nastanka smrti, kao i za određivanje vrednosti organa za transplantaciju. U ovom radu su kod eksperimentalnih životinja - pacova, koji su čuvani u različitim temperaturnim uslovima (8-10° C, 18-20° C i 28-30° C) i secirani u različitim vremenskim intervalima od smrti (1-6 sati), uzimani isecci kore bubrege i analizirani te fotografisani na transmissionom elektronskom mikroskopu. Ustanovljena dinamika ispoljavanja ultrastrukturnih promena ćelija epitela proksimalnih tubula korteksa bubrege pokazuje direktnu zavisnost od dužine trajanja autolize i temperature kojoj je nakon žrtvovanja telo izloženo. Utvrđene pravilnosti u morfološkim promenama na supcelularnom nivou tkiva bubrege određuju ih, uz ostale metode, kao moguće indikatore za preciznije određivanje vremena nastanka smrti, kao i za određivanje vitalnosti tkiva i organa.

Ključne reči: Proksimalni bubrežni tubuli; Epitelne ćelije + ultrastruktura; Autoliza; Sudska medicina; Postmortalne promene; Vremenski faktori; Temperatura; Životinje

Uvod

U sudsko-medicinskoj praksi, stručnonaučna, etička i pravna potreba i obaveza stručnjaka iz sudske medicine jeste da se, pored utvrđivanja neposrednog uzroka smrti, što preciznije izjasne o vremenu nastanka smrti. Najčešće korišćena metoda za utvrđivanje posmrtnog vremena je na osnovu razvoja osobina leša i lešnih promena a koje značajno zavise od promenljivih faktora kao što su temperatura, vlažnost vazduha i okruženje [1,2]. Poslednjih decenija izrađene su mnogobrojne studije postmortalnog intervala, koje su se odnosile na utvrđivanje biohemijskih, histoloških, histohemijskih i ultrastrukturnih promena u različitim tkivima i organima [3-7].

Ovaj problem je dugo bio predstavljen uglavnom kao forenzički, ali s vremenom, naročito u drugoj polovini prošlog veka, zbog primene novih metoda lečenja u savremenoj medicini koje se odnose na transplantacije organa i tkiva, postaje još značajniji. Zbog toga je problem sa određivanjem nastanka smrti na sadašnjem nivou medicinske nauke i tehnike postao veoma aktuelan ne samo za stručnjake iz sudske medicine već i za druge biomedicinske specijalnosti, pre svega hirurge, nefrologe, traumatologe, hematologe, transplantatore i dr. [8-13]. Do sada separatno publikovani pojedini naučno vredni rezultati tih istraživanja pokazuju određenu zonomernost pojave i razvoja određenih autolitičkih promena u funkciji vremena proteklog od nastupanja smrti, ali nisu potvrđeni sudskomedicinskom praksom kao precizni i optimalni za razrešenje ovog problema, te je ovaj rad deo napora kako bi se ustanovio kompleks efikasnih i pouzda-

nih metoda i kriterijuma za ovaj važan deo biomedicinskih nauka.

Materijal i metode

U eksperimentu su korišćene 52 eksperimentalne životinje, pacovi soja *Wistar*, težine 180-200 g, starosti 4-6 meseci, podjednaki broj oba pola, koji su bili usmrćeni zadavljenjem. Četiri životinje, po dve muškog i ženskog pola, secirane su odmah po usmrćenju kao kontrolna grupa. Ostalih 48 pacova su podeljeni u tri jednake grupe od po 16 životinja (8 muških i 8 ženskih) i nakon sekcije čuvani na temperaturama 8-10° C (I temperaturna grupa), 18-20° C (II temperaturna grupa) i 28-30° C (III temperaturna grupa).

U okviru svake temperaturne grupe, određene su vremenske podgrupe, zavisno od vremena proteklog od žrtvovanja do sekcije. U svakoj od tih vremenskih podgrupa (ukupno 4) secirana su po četiri pacova (oba pola) na 1, 2, 4 i 6 sati po usmrćenju.

Za svaku eksperimentalnu životinju, pre početka eksperimenta, ustanovljen je karton u koji su upisivani sledeći podaci: redni broj, pol, starost, telesna masa, vreme žrtvovanja, vreme sekcije, temperatura sredine, vlažnost vazduha, makroskopski nalaz i mikroskopski nalaz sa histološkim i histohemijskim aspektom. Životinje su nakon žrtvovanja obeležene odgovarajućim brojevima i do početka sekcije čuvane u prostorijama u kojima su prethodno obezbeđeni planirani mikroklimatski uslovi: temperatura i vlažnost vazduha od 70%.

U toku sekcije uziman je isečak kore vrhova oba bubrege u veličini 0,5x0,5x0,3 cm za transmisiju elektronsku mikroskopiju. Isecci su stavljeni u

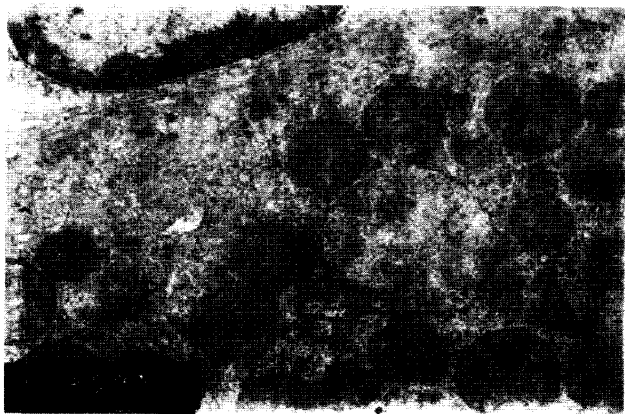
fiksativ glutaraldehyd i čuvani na sobnoj temperaturi. Postfiksacija je izvedena u 1% osmijum-tetrahloridu, pa dehidratacija kroz alkohol i aceton, zatim trimovanje i kontrastiranje po Watsonu i Reynoldsu. Ovako izrađeni preparati analizirani su i fotografisani na transmissionom elektronskom mikroskopu marke "JEOL CX 100".

Rezultati

I temperaturna grupa

U prvom satu postmortalne autolize jedarna membrana je očuvana, ali se uz nju primećuju granulacije jedarnog hromatina, ali nejednako celim obimom. Karioplazma je sa dosta pahuljičastog i zrnastog hromatina. Brojne mitohondrije uz jedro su očuvanih oblika, kod jednog broja sa očuvanim kristama, a kod drugih su kriste fino fragmentisane ili se primećuje njihova mestimična liza. Sarkoplazmatski retikulum je relativno sitnozrnasto zamućen.

Na kraju četvrtog sata autolize u ovoj grupi, skoro celim obimom jedra primećuje se odvajanje jedarnih membrana. Karioplazma je sa zgusnutim sitnozrastim hromatinom, dok je uz samu membranu, negde homogen a negde vakuoliziran, nagomilan hromatin. Oblik mitohondrija je prepoznatljiv i kod nekih se nazire čak i položaj kristi, dok su neke prosvetljene, skoro poluprazne i sa ostacima fragmentisanih kristi. Naziru se ostaci Goldžijevog aparata (Slika 1). Endoplazmatski retikulum je gustozrnasto ispunjen.



Slika 1. Ultrastruktura epitelnih ćelija proksimalnog tubula bubrega pacova I temperaturne grupe 4 sata od žrtvovanja ($\times 10000$)

Fig. 1. Ultrastructure of renal proximal tubule epithelium of rats in the I temperature group 4 hours after death ($\times 10000$)

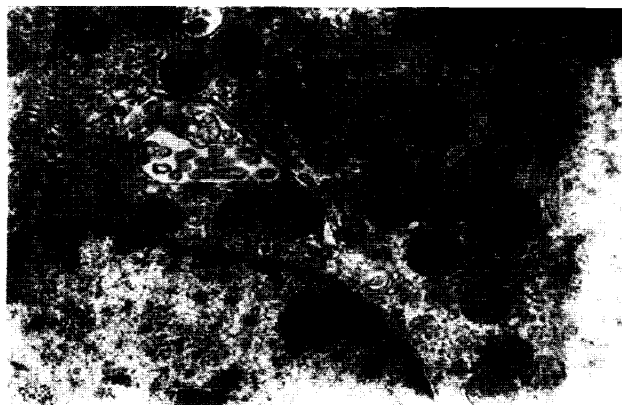
U šestom satu autolize, karioplazma je ispunjena sitnim pahuljičastim i končastim ostacima hromatina, mestimično i homogeno grupisanog, tako da se u karioplazmi nalazi dosta nepravilnih prosvetljenja. Primetno je veće odvajanje jedarnih membrana celim obimom te je jedro prstenasto oivičeno, ali se na pojedinim mestima razmiče hromatin i na

retkim mestima se uočava pucanje spoljašnje jedrove membrane. Brojne mitohondrije oko jedra su još uvek prepoznatljivog oblika, ali i sa primetnim, delom celim a delom fragmentisanim, mitohondrijalnim kristama, dok su pojedine mitohondrije sa sitnograduliranim sadržajem. Primećuju se delovi Goldžijevog aparata, endoplazmatski retikulum je sitnozrnasto ispunjen ali delom sa nepravilnim i kružnim vakuolama.

II temperaturna grupa

U prvom satu autolize, kod životinja čuvanih postmortem na $18-20^{\circ}\text{C}$, karioplazma je sa gusto granuliranim hromatinom, a zapaža se homogeni hromatin prikupljen uz jedarnu membranu. Primećuje se i početak odvajanja jedarnih membrana. Mitohondrije oko jedra zadržavaju oblik i u njima su primetni fragmenti njihovih kristi. Sarkoplazmatski retikulum je sa granulacijama i prosvetljenjima i sa pokojom vidljivom liofilnom granulom.

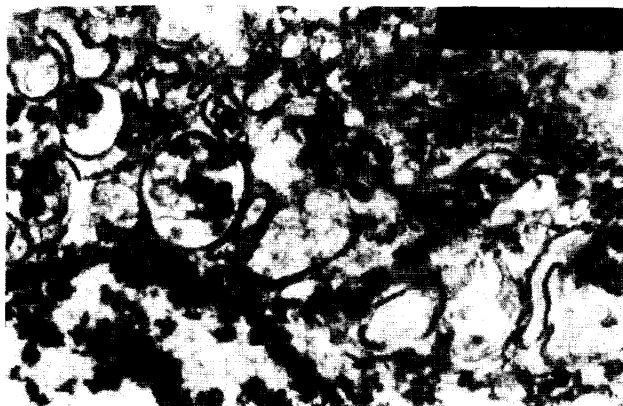
U četvrtom satu autolize, uočava se gust, ali sitnograduliran hromatin koji ispunjava karioplazmu, ali se uočava i trakasto nagomilan hromatin uz jedarnu opnu. Jasno je vidljivo odvajanje jedarnih membrana sa mestimičnim proširivanjem njihovog međuprostora. Oblik mitohondrija je sačuvan, ali ne i njihove kriste (Slika 2). Endoplazmatski retikulum je sitno i gusto granuliran.



Slika 2. Ultrastruktura epitelnih ćelija proksimalnog tubula bubrega pacova II temperaturne grupe 4 sata od žrtvovanja ($\times 10000$)

Fig. 2. Ultrastructure of renal proximal tubule epithelium of rats in the II temperature group 4 hours after death ($\times 10000$)

Šesti sat autolize na ultrastrukturnom nivou karakteriše razlivanje hromatina koji je bio nagomilan uz jedarnu opnu, a unutrašnjost karioplazme je sa granuliranim hromatinom ali i sa početnim sitnovakuoliziranim rasvetljenjima. Jasno je vidljivo odvajanje jedarnih membrana, a na nekim mestima i litička destrukcija spoljašnje opne. Brojne mitohondrije su sačuvanih oblika ali ne i unutrašnje građe. Primećuju se ostaci Goldžijevog aparata.



Slika 3. Ultrastruktura epitelne ćelije proksimalnog tubula bubrega pacova III temperaturne grupe 4 sata od žrtvovanja ($\times 10\,000$)

Fig. 3. Ultrastructure of renal proximal tubule epithelium of rats in the III temperature group 4 hours after death ($\times 10\,000$)

III temperaturna grupa

Kraj prvog sata autolize karakterišu jedra nepravilnog oblika sa hromatinom nagomilanim prema jedrovoj opni i prosvetljenjima unutar karioplazme, te litičkom destrukcijom obe jedarne opne i razlivanjem hromatina u sarkoplazmu. Jedan broj mitohondrija je još uvek sačuvanog oblika ali ne i unutrašnje građe. Sarkoplazmatski retikulum je sitnozrnasto zamućen i sa mestimičnim nepravilnim vakuolarnim prosvetljenjima.

U četvrtom satu jedarni hromatin se razliva od opne unutar jedra pa je karioplazma sa sitno ali i krupnograduliranim hromatinom i mestimičnim prosvetljenjima. Na pojedinim mestima uočavaju se ostaci obe jedarne opne, a na nekim mestima je vidljiva litička destrukcija spoljašnje, a mestimično i obe jedarne opne. Primećuju se brojne mitohondrije perinuklearno raspoređene, ali su balonizirane i prosvetljene tako da na prvi pogled skoro impunuju vakuolama, ali njihovu unutrašnjost većim delom ispunjavaju jasno primetni fragmentisani ostaci mitohondrijalnih kristi i njihov zrnasti detritus (Slika 3). Sarkoplazmatski retikulum je ispunjen i sitnim vakuolarnim prosvetljenjima.

U šestom satu jedarne opne su destruirane najvećim delom i na tim mestima se stvara komunikacija između kario- i sarkoplazme, te počinje izlivanje hromatina u sarkoplazmu. Unutrašnjost karioplazme je većim delom prosvetljena i vakuolizirana, a manjim delom sa ostacima hromatina. Prepoznatljiviji su i ostaci mitohondrija i u njima retki fragmenti a dominantnije sitnozrnasti ostaci mitohondrijalnih kristi. Sarkoplazmatski retikulum je sa više nepravilnih i vakuoliziranih prosvetljenja, a u velikom delu su vidljiva paučinasta i sitnozrnasta zamućenja.

Diskusija

Histomorfološki, autoliza predstavlja intravitalnu ili postmortalnu dezintegraciju živih struktura, a biohemijski odgovara gubitku u poretku metaboličke ravnoteže sa degradacijom metaboličke supstance koji rezultuje gubitkom energije i materije. Autoliza se podudara sa aktivnošću pojedinih enzima, nazvanih autolitički enzimi, koji su dokazani u lizozomima živih ćelija, a koji nakon smrti dovode do razaranja sopstvenih ćelijskih komponenti. Ti enzimi brzo razlažu intracelularni materijal, uključujući organele, druge ćelijske membranske sisteme i makromolekule, te ćelijska citoplazma postaje homogenog izgleda i intenzivno eozinofilna, što na kraju kulminiše gubitkom ćelijskih detalja i tkivne arhitekture. Presudno za početak autolize je prestanak pravilnog snabdevanja kiseonikom, te potpuni prekid ćelijskog disanja, usled čega je onemogućeno stvaranje energije, prvenstveno ATP u procesu oksidativne fosforilacije. Taj nedostatak energije se za kratko vreme kompenzuje stvaranjem malih količina energije pri anaerobnoj glikolizi. U tom procesu se stvaraju kiseli produkti, prvenstveno pirogvoždani i mlečna kiselina koje ne mogu da se uključe u citratni ciklus zbog prekida respiratornog lanca, što snižava pH ćelije, tj. povećava ćelijski aciditet. Zbog toga i ovo postmortalno povećanje kiselosti omogućava povećanje aktivnosti hidrolitičkih enzima i ubrzava autolizu. Posledica toga je i depolimerizacija ćelijskih makromolekula, usled čega dolazi do nagomilavanja niskomolekularnih jedinjenja u ćelijama, raste osmotski pritisak u ćeliji pa tečnost prodiru u unutrašnjost i ćelije počinju da bujaju i bubre, gubeći postepeno svoju morfološku celovitost. Do povećanja osmotskog pritiska u ćelijama dolazi i zbog pada nivoa ATP čime je blokiran aktivni transport kroz ćelijske membrane i fiziološka preraspodela ekstra- i intraćelijskog sadržaja, pre svega elektrolita (Na^+ i K^+) i vode. Zbog svega navedenog različita brzina autolize u različitim ćelijama i tkivima zavisi od koncentracije hidrolitičkih enzima i faktora koji stimulišu njihovo dejstvo, kao i od brzine porasta ćelijskog aciditeta [3,14,15].

Tomita sa saradnicima, ispitujući ultrastrukturne promene u ranoj postmortalnoj autolizi na bubrezima, pankreasu, jetri, srcu i skeletnim mišićima pacova čuvanih na 23°C nakon smrti, utvrdio da kod svakog od ovih organa nastaje bubrenje ćelije, stvaranje amorfnih depozita u mitohondrijama, gubitak granula glikogena, dilatacija endoplazmatskog retikuluma, zgrudvavanje, marginacija i kondenzacija jedarnog hromatina, s tim što se ti procesi kod različitih organa odvijaju u različitim periodima od nastupanja smrti. Mnoge od ovih promena najranije se javljaju kod bubrega, u hepatocitima morfološke promene se javljaju kasnije od tubularnog epitela, a ranije nego kod miokardiocita. U epitelnim ćelijama proksimalnog tubula, u trećem satu uočava se bubrenje mitohondrija, a u petom satu

zgrudnjavanje i marginacija nuklearnog hromatina [16].

U odvojenim istraživanjima, Lopuhin i Tanaka zaključuju da se već u prva četiri sata nakon smrti, u različitim temperaturnim uslovima, nalaze promene na jedru u vidu izmene reljefa spoljašnjih kontura i gubitka fibrilarne komponente hromatina sa pojavom krupnih granulacija u jedru. Saglasno ovim istraživanjima, i u ovom radu već u prvom satu na 30° C jedra mestimično gube svoj pravilan oblik, tj. na njihovim membranama se zapažaju litičke destrukcije i to kako spoljašnje, tako i unutrašnje opne. U istoj vremenskoj grupi šest sati nakon žrtvovanja, jedarne membrane su gotovo čitavom svojom cirkumferencijom lizirane, te se mogu videti samo njihovi fragmentisani ostaci [14,17]. Ovi se rezultati razlikuju od istraživanja Kostić-Banović, prema kojima se do četvrtog sata autolize zadržava oblik i pozicija jedarnih membrana miokardiocita, da bi se tek nakon tog vremena uočila izmena reljefa jedara sa rupturama jedarnih membrana i "izlivanjem" jedarnog hromatina u sarkoplazmu [4]. Ovaj stepen lize jedara u šestom satu nakon smrti odgovara našim rezultatima iz III temperaturne grupe. U I temperaturnoj grupi, jedarne opne do četvrtog sata imaju očuvan integritet i položaj, s tim što se na kraju četvrtog sata zapaža međusobno odvajanje spoljašnje i unutrašnje membrane, koje je izraženije u šestom satu, kada se zapaža i mestimično "pucaње" spoljašnje jedarne opne. Isti redosled promena na jedarnim membranama vidi se i u II temperaturnoj grupi (18-20° C), s tim što je međusobno odvajanje i širenje prostora između spoljašnje i unutrašnje membrane izraženije u četvrtom satu autolize nego kod prethodne temperaturne grupe.

Mitin i saradnici su, istražujući elektronsko-mikroskopske promene, transmisijom elektronskom mikroskopijom, na bubrezima i plućima miševa, a koji su nakon smrti čuvani na 18-20° C do 36 sati, utvrdili u toku prvih 90 minuta najizraženije promene u citoplazmi ćelija proksimalnih tubula u vidu difuzne hidratacije, vakuolarizacije citoplazme sa delimičnom lizom citomembrana i membrana mitohondrija. Dublje izražene promene javljaju se do 18 sati nakon smrti, gde je citoplazma predstavljena grudvasto-zrnastim ili paučinasto-mrežastim materijalom sa nestankom hijaloplazme, što je u saglasnosti i sa našim rezultatima [18].

Ultrastrukturalne promene na bubrezima pilića čuvanih nakon žrtvovanja na 27° C u periodu 1-360 minuta nakon smrti, istraživali su i Brown i Fletcher. Oni nalaze da su najranije promene vidljive kao apikalno bubrenje epitela proksimalnih i distalnih tubula. Sa vremenom se bubrenje povećava i intenzivira, a javljaju se i pukotine u ćelijskoj membrani nakon deset minuta *post mortem*. Primetne promene na organelama uočavaju se nakon 5 minuta u proksimalnim, a nakon deset u distalnim tubulima. One se ogledaju u dilataciji mitohondrija i endoplazmatskog retikuluma. Marginacija jedarnog hromatina događa se na 10 minuta u proksimalnim i

distalnim tubulima, a nakon 30 minuta u epitelnim ćelijama glomerula. Zgrušavanje hromatina vidljivo je u proksimalnim i distalnim tubulima na 30 minuta nakon smrti, a karioreksa i piknoza na 360 minuta [19].

U našem istraživanju, jedarni hromatin je u I temperaturnoj grupi u prvom satu autolize zgusnut i nalazi se raspoređen uz unutrašnju jedarnu membranu, da bi u četvrtom, a naročito u šestom satu, u vidu zgusnutih i pahuljičastih formacija bio raspoređen i unutar karioplazme. U II temperaturnoj grupi, hromatin se takode u prvom satu najvećim delom nalazi uz jedarnu membranu, da bi daljim protokom vremena došlo do njegovog razlivanja unutar karioplazme i u šestom satu do pojave sitnih i retkih vakuolarnih prosvetljenja. Razlivenost hromatina u karioplazmi zapaža se već u prvom satu na 30° C, da bi se vakuolarna prosvetljenja uočila već u četvrtom satu, a njegova razlivenost kroz lizirane jedarne membrane u sarkoplazmu uočava se na kraju šestog sata autolize.

Rouslin u svojim istraživanjima ukazuje na to da je kod miokardiocita unutrašnja membrana mitohondrija, naborana u vidu mnogobrojnih kristi u matriksu, znatno otpornija na oštećenja usled ishemije u odnosu na druge membranske sisteme ćelije, sarkoleme i sarkoplazmatskog retikuluma. Ključna lezija pri ishemiji ćelije, dakle, odigrava se u plazmamebranama a ne u mitohondrijama [20]. Sukura i sar. već u petom minutu autolize miokardiocita otkrivaju dezorganizaciju mitohondrijalnih kristi, u desetom minutu otok pojedinih mitohondrija, a u 25. minutu povećanje veličine mitohondrija [21]. Nešto drugačije rezultate prikazuje Lopuhin, koji prve izmene na mitohondrijama otkriva posle 15 minuta, a evidentne promene arhitektonike tek u trećem satu *post mortem* [14].

U našem istraživanju, mitohondrije u I i II temperaturnoj grupi kroz sve ispitivano vreme zadržavaju prepoznatljiv oblik, dok se prve promene na kristama uočavaju u prvom satu na 10° C u vidu njihove retke, mestimične lize, da bi u šestom satu unutar mitohondrija bili prisutni fragmenti kristi i sitnozrnasti detritus. Fragmenti kristi mitohondrija se zapažaju u II temperaturnoj grupi kroz sve vreme eksperimenta. Na 30° C, već od prvog sata mitohondrije gube većim delom oblik i unutrašnju građu, tako da se u sarkoplazmi od četvrtog sata mogu uočiti samo balonizovane i prosvetljene strukture mitohondrija sa fragmentisanim ostacima kristi, a u šestom satu su prepoznatljivi samo fragmentisani ostaci mitohondrija u sarkoplazmi oko jedra.

Prateći rane ultrastrukturne promene na koži eksperimentalnih životinja na koju su nanošene sekoćine, a koje su nakon žrtvovanja čuvane na temperaturi 20-24° C, Popović je ustanovio da se već na dva sata nakon žrtvovanja zapaža niz izmena ultrastrukturne arhitektonike ćelija epitela i krzna oko rane. Izmene su u vidu deformacije jedara uz hromatinsku agregaciju i periferni raspored hromatina uz jedrovanu membranu, uvećanja broja slobodnih ribozoma,

izraženog polimorfizma mitohondrija i jedara, ekscentričnog položaja jedarceta uz neujednačenu debljinu i veću valovitost bazalne membrane. Polimorfizam ultrastrukturno detektibilnih promena je još izraženiji kod lezija starih 8 sati, u vidu smanjenja denziteta matriksa mitohondrija, povećanja brojnosti ribozoma, a bazalna membrana je neujednačena, valovita. Ovi rezultati su visokosaglasni sa našim rezultatima iz II temperaturne grupe, kako u delu koji se odnosi na raspored hromatina uz jedarnu membranu, tako i u pogledu izmena u građi i izgledu mitohondrija [22].

Eksperimentalnim istraživanjem morfologije renalnih lezija u funkciji vremena na 12, 24, 36 i 48 sati kod potencijalnih bubrežnih alograftova čuvanih u različitim rashlađenim prezervacionim solucijama na temperaturi 2-4° C, Simić i Vuković preko svetlosnomikroskopskih analiza, utvrđuju da se 12 sati od uzimanja alograftova uočava da su tubularne ćelije nabubrele sa suženim lumenima tubula, a već posle 24 sata vidljiva je hidropična degeneracija epitelnih ćelija tubula sa već postojećim nekrozama (ovo sve kod bubrega čuvanih u fiziološkom rastvoru). Posle 36 sati većina tubularnih ćelija je nekrotična, sa rupturama bazalne membrane tubula, a što je sve izraženije posle 48 sati. Relativno dobra očuvanost građe tubularnog epitela i 12 sati nakon smrti, kao i dinamika, redosled i stepen ispoljavanja postmortalnih promena i smanjenje vitalne vrednosti bubrežnog tkiva u globalnom su saglasju sa rezultatima iz našeg rada, ali se zbog različitih temperaturnih uslova čuvanja u ova dva eksperimenta, ne može napraviti dovoljno dobra i ispravna komparacija kroz vremenske podgrupe [22].

Kroz istraživanja vitalne vrednosti tkiva jetre kod eksperimentalnih životinja, čije su jetre nakon žrtvovanja čuvane do 16. sata ishemije na 37° C (topla ishemija) i 4° C (hladna ishemija) u evrokolins prezervacionom rastvoru, Vuković, Simić i Tasić nalaze promene u vidu pražnjenja glikogenskih rezervi, bubrenja i nekroze hepatocita sa posledičnom redukcijom sinusoidnog volumena. Tako se kod hladne ishemije u prvih 8 sati uočava mali broj nekrotičnih hepatocita, sinusoidni volumen je iznad kritične vrednosti, a globalna struktura mikrocirkulatornih jedinica je očuvana, te je jetra u tom vremenskom intervalu podobna za transplantaciju. Nakon tog perioda i kod hladne ishemije tkivo jetre više nije pogodno za transplantaciju, a zbog uzna-

predovalih lezija tkiva jetre. Dalje se zaključuje da se kod tople ishemije ove morfološke promene javljaju znatno ranije, te da su promene kod četvorosatne tople ishemije praktično jednake promenama šesnaestosatne hladne ishemije [18]. Ovi zaključci, koji se odnose na izrazitu razliku u brzini i dinamici lezija tkiva jetre uzrokovanih ishemijom, kod tkiva čuvanih na različitim temperaturama pokazuju podudarnost sa rezultatima našeg eksperimenta na tubularnom epitelu.

Ispitujući morfološke kriterijume podobnosti bubrega za transplantaciju, Simić, Tasić i Živojnović utvrđuju brzu evoluciju oštećenja renalnog tkiva, te da se u periodu do 12 sati trajanja moždane smrti javljaju takve morfološke promene bubrežnog tkiva kada je bubrežni još uvek podoban, a nakon toga postoje relativno ili apsolutno nepodoban za transplantaciju. Takođe se konstatuje da pored vremenskog intervala ishemije, na stepen razvoja morfoloških i funkcionalnih promena bubrežnog tkiva značajan uticaj ima i uzrok smrti, te da je zato neophodno pre transplantacionog zahvata kada se renalni graft uzima sa kadavera, izvršiti morfološke testove sa onog bubrega koji se neće transplantirati [7]. Ovo dokazuje ispravnost početne ideje da metoda i rezultati ovog rada mogu poslužiti i za određivanje stepena oštećenja i vitalne vrednosti ovog organa u procesu transplantacije.

Zaključak

Dinamika ispoljavanja ultrastrukturnih promena ćelija epitela proksimalnih tubula korteksa bubrega pokazuje direktnu zavisnost od dužine trajanja autolize i temperature kojoj je nakon smrti telo izloženo. Na temperaturama 8-10° C i 18-20° C prve promene na jedru zapažaju se u četvrtom satu autolize, a na 30° C već na kraju prvog sata autolize. Mitohondrije zadržavaju normalan oblik šest sati nakon smrti na temperaturama 8-10° C i 18-20° C, a liza i fragmentacija kristi zapažaju se od prvog sata autolize, dok na 30° C, već u prvom satu, mitohondrije većim delom gube svoj oblik i unutrašnju građu.

Ove pravilnosti u morfološkim promenama na supcelularnom nivou tkiva bubrega određuju ih, uz ostale metode, kao moguće indikatore za preciznije određivanje vremena nastanka smrti, kao i vitalne vrednosti tkiva i organa.

Literatura

1. Knight B. Forensic pathology. 2nd ed. London: Edward Arnold; 1997.
2. Janssen W. Forensic histopathology. Berlin: Springer Verlag; 1985.
3. Coe JJ. Postmortem chemistry update. emphasis on forensic application. Am J Forensic Med Pathol 1993;14:91-117.
4. Kostić-Banović L. Postmortalne autolitičke promene na srčanom mišiću (doktorska disertacija). Niš: Medicinski fakultet; 1999.
5. Otašević V, Petrović S, Savić V, Kostić-Banović L, Spalević M. Elektronomikroskopska analiza autolitičkih promena luka aorte u različitim postmortalnim vremenskim intervalima. Acta Fac Med Naiss 1993;2:95-102.
6. Penttilä A, Laiho K. Autolytic changes in blood of human cadavers. II morphological studies. Forensic Sci Int 1981;17(2):121-32.
7. Simić M, Tasić M, Živojnović S. Mediko-legalni problemi selekcije kadaveričnog renalnog donora. Med Pregl 1983; 36(7-8):363-65.

8. Opelz G, Dohler B. Multicenter analysis of kidney preservation. *Transplantation* 2007;83(3):247-57.
9. Simić M, Vuković R. Morfološka analiza renalnog grafita u različitim prezervacionim tečnostima. *Med Pregl* 1991;44(5-6):217-9.
10. Vuković R, Simić M, Tasić M. Analiza ishemijskih lezija jetre u različitim intervalima tople i hladne ishemije. *Med Pregl* 1996;49(7-8):263-7.
11. Popović D, Simić M. The early postmortem histomorphological changes under experimental conditions. *Acta Med Leg Soc* 1989;39(1):219-26.
12. Popović D, Simić M, Čanak N, Živojnović S. Evaluacija transplantacione podobnosti organa i tkiva kod kadaveričnih donora. *Zb Matice Srp Prir Nauke* 1986;70:15-21.
13. Kocovski L, Duflou J. Can renal acute tubular necrosis be differentiated from autolysis at autopsy? *J Forensic Sci* 2009;54(2):439-42.
14. Lopuhin J, Kogan ME, Kraganov LJ. Ultrastrukturne osnovi žvnesposobnosti pečeni, poček i serdca. Moskva: Medicina; 1977.
15. Kumar V, et al. Basic pathology. 7th ed. Philadelphia: Saunders; 2003.
16. Tomita Y, Nihira M, Ohno Y, Sato S. Ultrastructural changes during in situ early postmortem autolysis in kidney, pancreas, liver, heart and skeletal muscle of rats. *Legal Med* 2004;6(1):25-31.
17. Tanaka K. Cell fine structures observed by scanning electron microscopy. *Hum Cell* 1992;5(3):211-7.
18. Mitin KS, Melnikov Iul, Berezovskii ME, Dzhamankulov ZT. Changes in ultrastructure of the kidney and lungs in the course of autolysis as an indicator of postmortem interval. *Sud Med Eksper* 1986;29(3):8-11.
19. Brown TP, Fletcher OJ. Ultrastructural postmortem changes in chicken kidneys at 27 C. *Avian Dis* 1986;30(2):370-81.
20. Rouslin W. Persistence of mitochondrial competence during myocardial autolysis. *Am J Physiol* 1987;252:985-9.
21. Sukura A, Sovert T, Lindberg LA. Morphometric quantitation early autolytic changes in rat myocardial cells. *Res Vet Sci* 1990;48(3):276-9.
22. Popović D. Rane morfološke odlike sekotina kože i njihov sudsko-medicinski značaj (doktorska disertacija). Novi Sad: Medicinski fakultet; 1972.

Summary

Introduction

Determination of schedule and certain predictable regularities of ultrastructural changes of proximal tubules epithel of kidney during post mortal interval would be very useful in forensic medicine when it is needed to determine the exact time of death.

Material and methods

In this research there were 52 experimental animals, laboratory rats "Wistar" type, which had been killed by choking. Four animals were selected to be a control group right after death, and 48 rats were divided into three equal groups. The rats were then fended on different temperatures: 8-10° C, 18-20° C, 28-30° C, respectively. In each and every group the rats were divided into four groups based on time interval after death: 1, 2, 4 and 6 hours. There were four rats in each of those four subgroups. Preparations were analyzed and photographed using transmission electronic microscope.

Results

It was found that pace of ultrastructure changes of proximal tubules epithel the cells of kidney was directly dependable on the duration of autolysis and temperatures that the body was stored at. First changes on nucleus, which are separation of external

and internal membranes, occurred during the fourth hour of autolysis. Decomposition of external membrane occurred also during fourth hour on temperatures of 8-10° C and 18-20° C. When the body was stored at 30° C lysed decomposition of both membranes of nucleus and loss of natural nucleus shape were noticeable even during the first hour of autolysis. During the sixth hour nucleus membranes were almost lysed around the perimeter and that led to "leaking" of chromatin in sarkoplasm. Mitochondria kept their normal shape six hours after death when the body was stored on 8-10° C and 18-20° C, and lysis and fragmentation of cristae were noticeable from the first hour of autolysis. Mitochondria lost their natural shape and inner composition during the first hour when the body was stored at 30° C. So, after the fourth hour only balloon like and lightened remaining of mitochondria and fragmented pieces of their cristae were noticeable.

Conclusion

All of the predictable changes found in morphological changes on subcell level of kidney tissue can be useful to determine very precisely the time of death. They can be also used to determine vital value of tissue and organs.

Key words: Kidney Tubules, Proximal; Epithelial Cells + ultrastructure; Autolysis; Forensic Medicine; Postmortem Changes; Time Factors; Temperature; Animals

Rad je primljen 19. II 2007.

Prihvaćen za štampu 17. IV 2007.

BIBLID.0025-8105;(2009):LXII:1-2:15-20.