

616.411:616.155.35—076.3:614.86:358.4:340.661

STANOVENÍ POČTU EOZINOFILŮ VE SLEZINĚ PŘI SOUDNĚ LÉKAŘSKÉM VYŠETŘOVÁNÍ LETECKÝCH KATASTROF

Pplk. MUDr. František VOREL, CSc., pplk. PhMr. Zdeněk MAKOČ, CSc.,
Ústav leteckého zdravotnictví, Praha
(náčelník plk. MUDr. Miroslav Haňka)

Při soudně lékařském vyšetřování leteckých katastrof je nutné se vyjádřit i k psychickému a somatickému stavu pilota před smrtí. K tomu byly postupně rozpracovány metody, umožňující post mortem hodnotit aktuální stav pilota v době katastrofy a napomáhající při rekonstrukci havarijního děje i při objasňování vlastních příčin nehody. Ukázalo se, že důležité informace z tohoto hlediska poskytuje stanovení kyseliny mléčné (Vorel 1962) a glycidů v mozkové, jaterní, srdeční a svalové tkáni (Vorel, Zemanová 1963). Byla stanovena měřítka expertizní interpretace těchto nálezů (Vorel 1964). Tím ovšem není možné problematiku považovat za zcela vyřešenou, neboť citované metody poskytují informace pouze o těch faktorech, které vyvolávají změny v glycidovém metabolismu.

Proto je třeba pokračovat v hledání metod, které by postihovaly i jiné funkční oblasti. Vede k tomu také skutečnost, že v mnoha případech bývá expertíza ztížena tím, že objekt je devastován a nekompletní. Nejzávažnějším důvodem je však trvalá snaha zvýšit kvalitu znaleckého posudku, umožnit co nejdůkladnější prověření závěrů více metodami současně a podat tak maximum informací vyšetřujícím orgánům.

V této souvislosti upoutala naši pozornost metoda stanovení počtu eozinofilních polymorfonukleárů (dále Eo) především proto, že jak emocionální stress, tak i jiné zátěže vedou k redukci jejich počtu v periferní krvi (McDonald et al. 1961, Pípal 1964, Štverák et al. 1966). Pokles počtu Eo byl pozorován také u osádek v letových

dnech při výcviku i provozu (Domanski 1957, Doležal, Pípal 1965). Tato odpověď organismu na stress je ovlivněna řadou faktorů. Mezi nimi hraje důležitou roli především doba potřebná k tomu, aby organismus mohl odpovědět na zátěž poklesem počtu Eo. Sevitt (1951) při studiu popálenin zjistil, že k signifikantní eozinopenii dochází teprve po několika hodinách po úrazu. V pozorováních Renolda et al. (1951) se maximální odpověď na psychickou zátěž v počtu Eo dostavuje se zpožděním až 4 hodin. K obdobným zjištěním dospěli ve svých pracích Kirkeby (1956) a Domanski (1957). Druhý faktor, který je nutno brát v úvahu, je individuální citlivost jedince na určitý stress a tomu odpovídající reakce (Domanski 1957). Získané výsledky jsou také značně ovlivňovány technickými podmínkami metody (Redfearn 1960, Štverák et al. 1966).

Nejzávažnější překážkou pro využití této metody v soudním lékařství je však skutečnost, že stanovení Eo v krvi mrtvol je prakticky nemožné. Proto jsme hledali možnost vyšetřovat obsah Eo ve tkáních, kde se jejich počet post mortem již nemůže měnit, a histologický obraz mohou překrýt jen pokročilá hniloba nebo změny způsobené účinkem extrémních teplot (zuhelnatění). V literatuře jsme našli údaj, že obsah Eo ve slezině je proporcionální jejich počtu v krvi (Biggart 1932) a že v podmínkách stressu, či jako jeho následek, klesá obsah Eo v krvi i ve slezině. Mezi nálezem v periferní krvi a ve slezině je korelace časově posunutá, protože změna

v počtu Eo ve slezině je oproti krvi opožděna o 1–3 hod. (Sevitt 1955 b).

Vlastní stanovení Eo v krvi je běžnou hematologickou metodou, při níž se využívá afinity Eo ke kyselým barvivům, jako je eozin nebo „Phloxin“. Tento způsob barvení však není pro průkaz Eo ve slezině vhodný, protože spolu s Eo se barví i některé jiné elementy, což by mohlo být zdrojem chyb.

Tyto obtíže odstranil Lendrum (1944), který zjistil, že granula lidských Eo je možno specificky barvit karbolchromotropem.

Materiál a metoda

Vyšetření jsme provedli celkem u 61 případů traumatických smrtí zdravých mužů ve věku 20–44 let, kteří zahynuli při dopravních nehodách v silničním provozu a při leteckých katastrofách.

Při vyšetřování každé letecké katastrofy jsme pátrali po tom, zda si pilot uvědomoval havarijnou situaci, a tím i hrozící nebezpečí smrti, a zároveň jsme si krátkodobou předsmrtnou psychickou zátěž pilota ověřovali biochemickými soudně lékařskými metodami. U ostatních případů byl výskyt zátěže potvrzen pouze vyšetřeními okolnostmi smrti. Nejasné případy jsme do souboru nezařazovali.

Přežívání úrazu jsme prokázali pozitivním nálezem embolizace tuku v plicních kapilárách. U žádného případu v našem souboru nebyl proveden léčebný zásah.

Vzorky tkáně sleziny jsme zpracovávali běžnou parafinovou technikou. Řezy v tloušťce přesně 5 μm jsme barvili hematoxylinem a dobarvovali podle Lendruma (1944) karbol-chromotropem. (Příprava barviva: 1 g krystalického fenolu se taví v baňce přímo nad plamenem. K tavenině se za míchání přidá 0,5 g chromotropu 2 R a směs se pak rozpustí ve 100 ml destilované vody. Tím je roztok připraven pro práci a svoji barvicí schopnost si zachovává po dobu asi 3 měsíců.)

Počítání obsahu Eo jsme prováděli při značném zvětšení na mikroskopu Lumipan (obj. 40, okul. 10) a silném prosvícení. Z každého případu byly systematicky počítány Eo celkem v 50 zorných polích ležících v subkapsulární oblasti a výsledek byl vyjádřen jako průměrné číslo na 100 zorných polí.

Počítali jsme jen eozinofilní polymorfonukleární leukocyty nijak se nelišící od krevních elementů. Tvořily 90–95 % všech chromotropních buněk ve slezině. Zbývajících 5–10 % mononukleárních buněk s jasně chromotropní cytoplasmou jsme nepočítali.

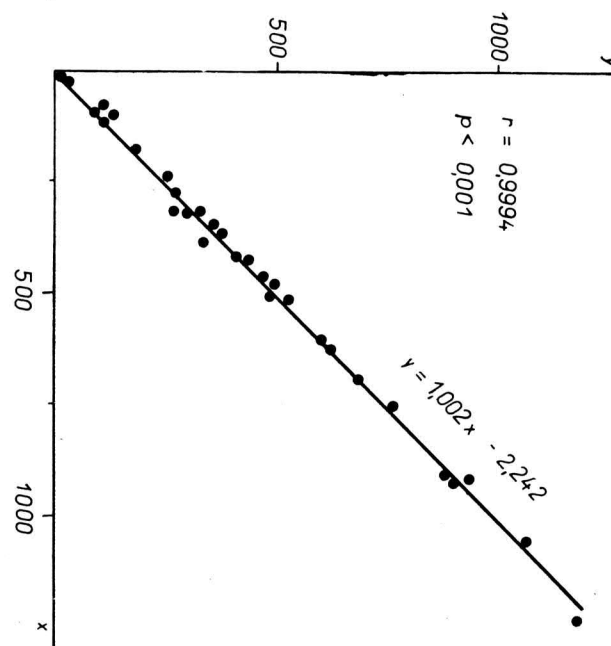
Pro statistické hodnocení výsledků jsme použili tabulky o více polích a výpočtu koeficientu korelace (Adam 1966). Přesnost metody jsme hodnotili podle Hanče (1951).

Výsledky

V počátečním stadiu práce při prověřování metody jsme podle Sevitta (1955 b) vyjadřovali množství zjištěných Eo na 1 mm^3 tkáně. Ověřili jsme si ve shodě s autorem, že výsledek je zatížen maximálně 5% relativní chybou. Při výpočtu jsme vycházeli z tloušťky řezu a plochy zorného pole, přičemž jsme uvažovali specifickou hmotu tkáně = 1,1. Ukázalo se však, že složitější způsoby vyjadřování počtu Eo (tj. na 1 mm^3 tkáně, resp. přepočet na váhu celé sleziny) se shodují s daleko jednodušším vyjádřením, tj. počtem Eo/100 zorných polí ($r = 0,936$, resp. $r = 0,962$). Proto jsme se rozhodli přidržet se nadále tohoto jednoduššího ukazatele.

Vlastní počítání Eo u každého jednotlivého případu na 100 zorných polí mikroskopu je časově velmi náročné a únavné. To nás vedlo k tomu, že jsme statisticky vyhodnotili v korelační závislosti počet Eo u prvních a druhých 50 zorných polí. Zjistili jsme (graf č. 1) významnou

Graf 1



Korelace počtu eozinofilů zjištěných v prvních (osa x) a druhých 50 zorných polích (osa y)

korelaci a dále prokázali, že zcela postačuje spočítat Eo pouze v 50 zorných polích, neboť relativní chyba metody se tak zvýší o pouhé 1%. Proto jsme všechna vyšetření prováděli tímto způsobem a výsledek jednoduše přepočítali na 100 zorných polí. Již během ověřovacích vyšetření se ukázalo, že počítání Eo musí provádět vždy táž osoba, aby výsledky byly reprodukovatelné.

Výsledky vyšetření počtu Eo ve slezině u úrazových smrtí jsou uvedeny v tabulce 1. Případy jsou rozděleny do dvou základních skupin, tj. piloty a ostatní. Podle počtu Eo ve slezině jsme pak soubor rozdělili do tří skupin. Posledním

Tabulka 1

Vliv předsmrtného stavu organismu na počet eozinofilů ve slezině

Skupina	Předsmrtná psychická zátěž	Přežívání úrazu	Počet eozinofilů ve slezině na 100 zorných polí			Celkem	Počet případů v %
			do 150	151–550	nad 550		
Piloti	—	—	0	0	36,6	100	
		+	0	2,4	36,6		
	+	—	22	7,3	2,4		
		+	14,7	36,6	4,9		
Ostatní	—	—	0	0	25	100	
		+	0	5	0		
	+	—	45	10	5		
		+	45	10	0		

kritériem vzhledem k objasňovaným otázkám byl výskyt předsmrtné psychické zátěže a přežívání úrazu.

U případů úmrtí při leteckých katastrofách se počet Eo ve slezině pohybuje v rozsahu od 8 do 2396. Nejvyšší hodnoty (skupina nad 550 Eo/100 zorných polí) jsme zjistili jen u případů okamžitých traumatických smrtí bez předsmrtné psychické zátěže. Předsmrtná psychická zátěž s výjimkou 2,4 % případů snižovala počet Eo ve slezině, k vlivu přežívání úrazu se pro malý počet případů nelze vyjádřit. Kombinace obou stressorů, tj. psychické zátěže a přežívání úrazu, významně ($p < 0,01$) počet Eo ve slezině snižuje.

U případů ostatních násilných traumatických smrtí (tj. neleteckých) se obsah Eo ve slezině pohyboval od 20 do 1622/100 zorných polí, přičemž přes 80 % případů okamžitých smrtí bez psychické zátěže se svými hodnotami řadí do skupiny nejvyšší. Přitom se nevyskytl žádný případ, u něhož by došlo k přežití bez předsmrtné psychické zátěže, a podobně případů „čisté“ předsmrtné zátěže je málo na to, aby je bylo možno hodnotit. U osob, které byly před smrtí vystaveny účinku obou stressorů, jsme obdobně jako u pilotů zjistili významný ($p < 0,01$) pokles počtu Eo, který je řadí především do skupiny s nejnižšími hodnotami.

Spojením všech případů násilných smrtí se pozorované rozdíly v počtu Eo ještě zvýraznily (tab. 2), neboť 95 % případů, u kterých nedošlo před smrtí k psychické zátěži ani k přežívání úrazu, má hodnoty Eo nad 550/100 zorných polí,

a 79 % případů, u nichž oba zátěžové faktory smrti předcházely, má uvedené hodnoty nižší než 150. Byl-li organismus před smrtí vystaven jen jedné z uvedených zátěží, jsou 3/4 těchto případů ve střední skupině.

Diskuse

V práci jsme si prověřili vhodnost a použitelnost Lendrumem navržené metody stanovení počtu Eo ve slezině post mortem. Při vyhodnocení přesnosti metody podle Hanče (1951) jsme zjistili, že $h = 0,417$ a že naše úprava metody (výchozí hodnota počtu Eo se získá z 50 zorných polí) plně vyhovuje.

Hodnoty Eo, které jsme zjistili v našem souboru, jsme srovnávali s nálezy jiných autorů. Neočekávali jsme jednoznačnou shodu v prostém srovnání absolutních čísel, neboť soubory se liší jak zkoumanými objekty a dobou přežívání, tak druhem a rozsahem poranění i předsmrtné zátěže. Přesto se však řádově nelišíme. Sevitt (1955 a, b) jako normální udává hodnoty 200–700 buněk/100 zorných polí. V našem souboru považujeme za normální ty případy, u nichž počet Eo je vyšší než 550. Voigt (1957) definoval hodnoty, které zjistil u případů okamžitých traumatických smrtí, jako normální nález až eozinofilii. Za horní hranici splenické eozinopenie, kterou pozoroval u případů spojených s delší agónií, považoval 285 Eo/100 zorných polí.

V literatuře převládá názor, že je třeba určité doby (až několika hodin) k tomu, aby organismus odpověděl na stress poklesem Eo. Tomuto názoru neodpovídají naše nálezy především tam, kde jsme u pilotů vystavených krátkodobé předsmrtné psychické zátěži zjistili eozinopenii. V této souvislosti nás zaujala práce Enose et al. (1955), kteří u vojáků padlých v boji za korejské války zjistili eozinopenii, přičemž se délka vlastní bojové akce (od minut až po hodiny) v počtu Eo neodrazila. Naše i Enosova zjištění poklesu počtu Eo ve slezině ve velmi krátkém intervalu po působení prokázaného stressu jsou však v rozporu s výše uvedeným názorem jen zdánlivě. U obou souborů nelze totiž vyloučit působení stressujících faktorů ještě před letem či

Tabulka 2

Vztah počtu eozinofilů ve slezině k výskytu předsmrtných zátěží

	Počet eozinofilů ve slezině na 100 zorných polí			Celkem	Počet případů v %
	do 150	151–550	nad 550		
Bez zátěží	0	5	95	100	
Jedna ze zátěží	14	76	10	100	
Obě zátěže	79	21	0	100	

bojovou akcí, a tím ani jejich následný účinek, který se mohl projevit až po několika hodinách pozorovanou eozinopenií. Tento náš předpoklad nemůžeme však prokázat, neboť v rámci vyšetřování leteckých katastrof jsme měli možnost objektivizovat pouze výskyt krátkodobé předsmrtné zátěže a přežívání úrazu.

I když hodnoty získané v našich vyšetřeních ukazují na značnou individuální variabilitu, domníváme se, že rozdělení případů do tří skupin podle počtu Eo ukazuje na některé závislosti.

Ve skupině nad 550 Eo/100 zorných polí se nevyskytl žádný případ, u něhož by byla prokázána přítomnost obou zátěží. Pro případnou posudkovou interpretaci to znamená především hodnoty normální a jen výjimečně lze připustit působení zátěže.

Skupinu 151–550 Eo/100 zorných polí považujeme za přechodnou.

Za nejdůležitější pro posudkovou interpretaci považujeme poslední skupinu. Nález do 150 buněk/100 polí svědčí podle našeho názoru o tom, že organismus byl před smrtí vystaven stressovému působení. Domníváme se však, že v takovém případě nepostačuje hledat zátěžový faktor, který organismus ovlivnil, v krátkém intervalu před smrtí během havarijního děje, ale že je nutné po něm anamnesticky pátrat v období před samotným letem.

Jestliže dosavadní biochemické metody, využívané při soudně lékařském vyšetřování leteckých katastrof, poskytují obraz předsmrtných procesů, které proběhly jako zátěž v ose diencefalo-hypofyzo-adrenální, pak splenická eozinopenie je citlivým ukazatelem především kortikální hyperaktivity. Dosavadní naše zkušenosti z histologického vyšetření lipidů v kůře nadledvin u případů úmrtí při leteckých katastrofách by tento názor podporovaly.

Tuto naši práci nemůžeme považovat za uzavřenou, neboť při pokusu o vysvětlení pozorovaných závislostí jsme byli omezeni nedostatkem objektivních anamnestických dat a odkázání na nepřímé důkazy. Interpretaci výsledků ztěžoval i nedostatečný počet případů v některých skupinách.

Je nám jasné, že nález eozinopenie sám o sobě nepostačuje k tomu, abychom mohli blíže definovat zátěž, která na organismus před smrtí působila, protože jde o reakci nespecifickou. Přesto podle našeho názoru nalezne metoda stanovení počtu Eo ve slezině své uplatnění v kombinaci s jinými metodami, které se při vyšetřování leteckých katastrof používají. Předpokládá to však komplexnější posouzení každého jednotlivého případu letecké katastrofy v tom, že bude třeba hodnotit nejen zjištěná fakta, související bezprostředně s vlastním letem, ale i další okolnosti z období před startem, které mohly na organismus pilota působit. Z tohoto hlediska pak bude nutné uvažovat i interpretaci nálezů získaných dosud používanými metodami ve vztahu k počtu Eo ve slezině.

Souhrn

Na souboru 61 případů násilných smrtí zdravých mužů ve věku od 20 do 44 let, z nichž část zahynula při leteckých katastrofách, byla prověřena metoda histologického stanovení počtu Eo ve slezině.

Z interpretačního hlediska je závažné zjištění, že hodnoty do 150 Eo/100 zorných polí lze považovat za průkaz působení stressu na organismus před smrtí.

Autoři vyslovují názor, že nález eozinopenie nasvědčuje působení zátěžových faktorů v delším časovém intervalu před smrtí a že u případů leteckých katastrof může jít o faktory, které ovlivňovaly organismus pilota ještě před vlastním letem.

Literatura

- Adam, J.: Einführung in die medizinische Statistik. Berlin, VEB Verlag Volk und Gesundheit, 1966, 268 s.
- Biggart, J. H.: Some observations on the eosinopenic cell. *J. Path. Bacter.* 35, 1932, 2:799–816.
- Doležal, V., Pípal, M.: Některé humorální změny u pilotních žáků při prvních letech na proudových letounech. *Voj. zdrav. listy*, 34, 1965, 1:8–12.
- Domanski, T. J.: The stress concept applied to flying. *J. Aviat. Med.*, 28, 1957, 6:249–258.
- Enos, W. F., Beyer, J. C., Holmes, R. H.: Estimation of survival time following injury. *Arch. Path.*, 60, 1955, 3:325–328.
- Hanč, O.: Chemická laboratorní příručka. Průmyslové vydavatelství, Praha, 1951, 536 s.
- Kirkeby, K.: Diagnostic and prognostic significance of eosinopenia in acute myocardial infarction. *Amer. J. Med. Sci.*, 232, 1956, 1:50–56.
- Lendrum, A. C.: The staining of eosinophil polymorphs and enterochromaffin histological sections. *J. Path.*, 56, 1944, 3:441.
- Mc Donald, R. D., Yagi, K., Stockton, E.: Human eosinophil response to acute physical exertion. *Psychosom. Med.*, 23, 1961, 1:63–66.
- Redfearn, J. W. T.: The eosinopenia of physical exercise. *Ergonomics*, 3, 1960, 1:17–29.
- Pípal, M.: Eosinopenic reaction of human organism to starvation. *Activitas nerv. sup.*, 6, 1964, 1:59–60.
- Renold, A. E., Guigley, T. B., Kennard, H. E., Thorn, G. W.: Reaction of the adrenal cortex to physical and emotional stress in college oarsmen. *New Engl. J. Med.*, 244, 1951, 8:754–759.
- Sevitt, S.: Eosinophil and other leucocyte changes in burned patients (with special reference to adrenocortical activity). *Brit. Med. J.*, 1, 1951, 1:976–980.
- Sevitt, S.: Splenic eosinopenia and adrenocortical hyperactivity. *J. Path. Bacter.*, 70, 1955, 1:65–80.
- Sevitt, S.: The spleen and blood eosinopenia. *J. Clin. Path.*, 8, 1955, 1:42–49.
- Štverák, J., Doležal, V., Luxa, J., Pípal, M.: The influence of heat on some functions of the organism. *Physiol. bohemoslov.*, 15, 1966, 5:466–474.
- Voigt, J.: Paper presented at International Meeting on Forensic Pathology, Brussels 1957. Cit. podle Mason, J. K.: *Aviation Accident Pathology*. London. Butterworths 1962, 358 s.
- Vorel, F.: Hladina kyseliny mléčné se zřetelem k příčině smrti, agonálním stavům a době smrti. *Publ. ÚLZ*, č. 46. Praha, 1962.
- Vorel, F., Nádvorník, F., Řehánek, L.: Prověření metody zjišťování tukové embolie při leteckých katastrofách jako průkazu předsmrtného poranění. *Publ. ÚLZ*, č. 37. Praha, 1962.
- Vorel, F., Zemanová, Z.: Postmortální hladina sacharidů nebo jejich metabolitů ve tkáních jako ukazatel předsmrtného somatického a psychického stressu. *Publ. ÚLZ*, č. 64. Praha, 1963.
- Vorel, F.: Význam biochemických laboratorních metod při soudně lékařském vyšetřování leteckých katastrof. Disertační kandidátská práce, Kat. soud. lék. FVL KU, Praha, 1964.