

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Российский университет медицины»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

ШАЙ Алиса Николаевна

**СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКАЯ ОЦЕНКА БЕЛКОВ – МАРКЕРОВ
ДИФФУЗНОГО АКСОНАЛЬНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ГОЛОВНОГО
МОЗГА ПРИ СМЕРТИ ОТ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ**

3.3.5. Судебная медицина

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
Шигеев Сергей Владимирович,
доктор медицинских наук, профессор

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Актуальные аспекты судебно-медицинской диагностики диффузного аксонального повреждения (ДАП)	11
1.2. История изучения механизмов возникновения и морфологии диффузного аксонального повреждения.....	12
1.3 Клиническая картина ДАП.....	19
1.4 Прижизненная диагностика ДАП лабораторными и инструментальными методами.....	19
1.5. Посмертная диагностика ДАП: классические гистологические методы исследования.....	20
1.6. Исследование белков-маркеров повреждения нервной ткани с помощью покадровой микроскопии и масс-спектрометрического анализа.....	21
1.7. Анализ белков – маркеров повреждения нервной ткани	23
1.8 Предшественник β -амилоида (β -APP белок).....	27
1.9. Резюме	29
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	30
2.1. Объем и материал проводимых исследований	30
2.2. Методика изъятия и подготовки материала для гистологического и иммуногистохимического (ИГХ) исследования	33
2.3. Постановка ИГХ исследования и оценка результатов	36
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	39
3.1. Судебно-медицинская оценка и статистический анализ случаев смерти от травмы головного мозга.....	39
3.2. Судебно-медицинская оценка и статистический анализ случаев смерти, не связанных с травмой мозга.....	46
Глава 4. МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЕЩЕСТВА МОЗГА 50	
4.1. Морфологическое исследование вещества мозга в случаях смерти, связанных с черепно-мозговой травмой	50
4.1.1. Судебно-медицинская макроскопическая характеристика ДАП.....	50
4.1.2. Судебно-медицинская характеристика гистологических изменений вещества мозга при ДАП, окраска гематоксилином и эозином.....	51
4.1.3. Иммуногистохимическое исследование ткани головного мозга при черепно-мозговой травме (ЧМТ)	54

4.1.4. Иммуногистохимическое исследование ткани головного мозга при ЧМТ, срок выживаемости до 3 часов	58
4.1.5. Иммуногистохимическое исследование ткани головного мозга при травме мозга, срок выживаемости до 1 суток	64
4.1.6. Иммуногистохимическое исследование ткани головного мозга при ЧМТ, срок выживаемости от 2 до 14 суток	66
4.1.7. Иммуногистохимическое исследование ткани головного мозга при ЧМТ, срок выживаемости более 14 суток	68
4.2. Иммуногистохимическое исследование вещества головного мозга в случаях смерти, не связанных с травмой головного мозга	70
4.3. Внедрение иммуногистохимического исследования на β -APP белок в судебно-медицинскую практику при подозрении на ЧМТ: случай из практики	75
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	78
ВЫВОДЫ	84
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	85
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	87
Приложение А (обязательное)	106

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Диффузное аксональное повреждение (ДАП) как вид тяжёлой черепно-мозговой травмы является предметом исследований клиницистов, морфологов и судебно-медицинских экспертов. При этом существенной особенностью этого вида повреждения головного мозга является отсутствие макроскопически различимых проявлений аксонального повреждения в 1/3 случаев. Если диагностика ДАП (как клинико-инструментальными, так и гистологическими методами) в настоящее время не представляет трудностей при переживании травмы в течение от 6 часов и более, то в случаях быстрого наступления смерти морфологическая диагностика ДАП является трудновыполнимой задачей, так как традиционные методы микроскопической диагностики в этом случае являются малоинформативными.

Применяемые в настоящее время в практике судебно-гистологические исследования традиционные методы диагностики ДАП, такие, как базовая окраска гематоксилином и эозином и дополнительные окраски, включая импрегнацию серебром, не обладают достаточной специфичностью. В то же время высокоспецифичные иммуногистохимические (ИГХ) технологии выявления белков-маркеров ранних и поздних травматических повреждений аксонов до сегодняшнего дня не включены в рабочий арсенал методов судебных гистологов. Не определены также и морфологические критерии их оценки. Отсутствие таковых затрудняет решение важнейших вопросов судебно-медицинской экспертизы ЧМТ в динамике раннего и позднего посттравматических периодов ДАП (в том числе по определению давности и травматической этиологии аксональных повреждений, особенно при незначительности макроскопических изменений), что создает объективные предпосылки для экспертных ошибок. Указанные аспекты обуславливают актуальность подобной работы.

Исследования в данном направлении перспективны также в отношении изучения механизмов развития (патогенеза) диффузных аксональных повреждений травматического генеза, ранее связываемых исключительно с т.н. "первичной" (т.е. возникающей непосредственно в момент травматического воздействия) аксо-

томией. Вместе с тем данные экспериментальных наблюдений последних лет свидетельствуют о значимой патогенетической роли отсроченных повреждений аксонов (т.н. "вторичной" аксотомии), обусловливаемых нарушениями протеолитической деградации поврежденных белков цитоскелета. В этой связи результаты изучения белков – маркеров функционального состояния систем внутриклеточного протеолиза на материале судебно-медицинских вскрытий могут оказаться востребованными для уточнения механизма аксональных повреждений.

Также важно рассмотреть вопрос о нетравматической аксотомии при различных заболеваниях нервной системы. Это особенно актуально по причине значительного числа ошибочных экспертных суждений при гипер- гиподиагностике ДАП в подобных случаях.

На данном этапе диагностики повреждений ткани головного мозга начинают активно использоваться ИГХ методики, которые являются более чувствительными и информативными. На примере ряда экспериментов повреждения нейронов *in vivo* и *in vitro* изучены различные белки, которые можно использовать в качестве маркеров повреждения нейронов. Для возможной диагностики предложено более 50 пептидов, которые появляются как вследствие повреждения клетки и выхода содержимого во внешнюю среду, так и последующих реакций элиминации повреждений, иммунного ответа и реакций регенерации. «Подробно описаны преимущества и недостатки наиболее используемых из них: протеина S-100 β , нейрон-специфической енолазы (NSE), глиального фибриллярного кислого протеина (GFAP), протеина C-tau, маркеров апоптоза и других белков. Но в своем большинстве изученные белки-маркеры обладают низкой чувствительностью и слабой специфичностью. Хотя поиск и исследование биомаркеров ведется более 20 лет, «идеальные» биомаркеры повреждения вещества головного мозга не найдены» [90, 103]. Таким образом, необходимо найти и изучить оптимальный маркер повреждения вещества головного мозга, экспрессия которого возникает рано и сохраняется длительное время, чему в наибольшей степени соответствует β -APP протеин. Также необходимо сформулировать четкие рекомендации по проведению ИГХ исследования экспрессии β -APP белка при диагностике повреждения

аксональных отростков, сформулировать рекомендации по дифференциальной диагностике результатов ИГХ реакции с данным белком, связанной с повреждениями отростков нейронов при ЧМТ и могущей иметь место при смерти от причин, не связанных с травмой, и таким образом имитировать картину аксонального повреждения. В связи с этим тема данного диссертационного исследования является актуальной.

Цель научного исследования

С помощью ИГХ метода исследовать β -APP белок как наиболее ранний маркер повреждения аксонов при ЧМТ и выявить достоверные информативные иммуногистохимические критерии аксонального повреждения в различные периоды выживания после получения ЧМТ.

Задачи исследования

1. Систематизировать гистологические признаки аксонального повреждения вследствие ЧМТ при окраске гематоксилином и эозином.
2. Проанализировать имеющиеся данные по различным иммуногистохимическим маркерам, характерным для повреждения вещества головного мозга.
3. Определить критерии оценки экспрессии β -APP белка при ИГХ исследовании аксонального повреждения при ЧМТ.
4. Проанализировать наличие связей между выявленными критериями экспрессии β -APP пептида и такими показателями, как пол, возраст, срок переживания после травмы.
5. Установить закономерности между выявленными критериями экспрессии β -APP белка при ИГХ реакции и сроком выживаемости после травмы.
6. Разработать практические рекомендации по применению гистологических и иммуногистохимических критериев при диагностике аксонального повреждения.

Научная новизна работы

Впервые в Российской Федерации выполнено комплексное исследование, в результате которого проведена оценка экспрессии β -APP белка при аксональном повреждении, сопровождающем черепно-мозговую травму, установлены диффе-

ренциальные признаки экспрессии β -APP белка в случаях смерти, не связанных с черепно-мозговой травмой.

Выявлены патологические состояния, приводящие к накоплению β -APP белка в нейронах и аксональных отростках и положительной его экспрессии, обнаруживаемые при иммуногистохимическом исследовании.

Установлены этапные закономерности изменений экспрессии β -APP белка при аксональном повреждении в различные сроки после травмы.

Определена возможность использования новых критериев иммуногистохимической диагностики ДАП в судебно-медицинской практике.

Теоретическая и практическая значимость работы

Применительно к целям и задачам судебно-медицинской экспертизы обоснован и предложен метод ИГХ диагностики накопления β -APP белка в нейронах и отростках, возникающего как следствие аксонального повреждения при ЧМТ, так и в результате нарушения кровообращения, не связанного с травмой головного мозга. Разработаны и предложены диагностические дифференциальные критерии этих состояний, которые могут применяться в практической деятельности судебно-медицинского эксперта и патологоанатома.

Методология и методы исследования

В методологическую основу диссертационной работы вошло изучение отечественной и зарубежной литературы по теме исследования, использованы традиционные методы окраски гематоксилином и эозином, а также для реализации поставленной цели и задач применен такой высокотехнологический метод как иммуногистохимическое исследование аутопсийного материала; была проведена статистическая обработка полученных в ходе научной работы результатов. Предметом изучения послужили препараты головного мозга двух групп умерших. Первая группа состояла из случаев смерти вследствие черепно-мозговой травмы с различным сроком переживаемости посттравматического периода. Вторая группа явилась группой сравнения, куда были отнесены случаи, где причина смерти не была связана с ЧМТ. В исследование кроме аутопсийного материала был включен гистологический архивный материал, набранный на базе ГБУЗ «Бюро судебно-

медицинской экспертизы Департамента здравоохранения города Москвы». Иммуногистохимическое исследование было выполнено на базе ФГБУ "Российский центр судебно-медицинской экспертизы" МЗ РФ.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Выявление β -APP белка – достоверный иммуногистохимический признак аксотомии, выявляющийся при ИХГ исследовании в ранние сроки после черепно-мозговой травмы.

2. Разные сроки переживаемости черепно-мозговой травмы имеют типичные иммуногистохимические признаки экспрессии β -APP белка.

3. Диагностические алгоритмы экспрессии β -APP белка помогают в установлении судебно-медицинского диагноза в случаях с минимально выраженными макроскопическими изменениями вещества головного мозга при черепно-мозговой травме.

4. Оценка других белков - маркёров повреждения вещества головного мозга доказывает, что наиболее эффективным маркёром в ранние сроки после черепно-мозговой травмы является β -APP белок.

5. Дифференциальная диагностика повреждения вещества головного мозга нетравматического генеза.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность результатов проведенного диссертационного исследования подтверждается достаточным для статистической обработки количеством случаев с ЧМТ (58 случаев) и группы сравнения (59 случаев), использованием классических и современных высокоинформативных методов исследования, адекватным выбором методов статистического анализа исследуемого материала. Основные результаты диссертационного исследования представлены в докладах на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «История Российского центра судебно-медицинской экспертизы в лицах и фактах, к 85-летию со дня образования» (г. Москва, ноябрь 2016 г.), на Международном конгрессе и научно-практической школе «Актуальные вопросы судебной медицины и экспертной практики – 2018» (г. Москва, МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского,

апрель 2018 г.) и на VIII Всероссийском съезде судебных медиков с международным участием «Достижения российской судебно-медицинской науки XX–XXI столетия: к 100-летию со дня образования современных судебно-экспертных школ» (г. Москва, ноябрь, 2018 г), а также на научно-практических конференциях государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Бюро судебно-медицинской экспертизы Департамента здравоохранения города Москвы» 2020–2023 гг.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедры судебной медицины и медицинского права ФГБОУ ВО «МГМСУ им А.И.Евдокимова» Минздрава России, кафедр судебной медицины ФГБОУ ВО «Кировский ГМУ» Минздрава России, ФГБОУ ВО «Кемеровский ГМУ» Минздрава России, ФГАОУ ВО «РУДН» Минобрнауки России, в практическую деятельность ГБУЗ «Бюро судебно-медицинской экспертизы Департамента здравоохранения города Москвы», ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России в ходе исполнения и реализации положений государственного задания на 2015–2017 гг. при выполнении фундаментальных научных исследований по теме НИР: «Иммуногистохимическое изучение белков – маркёров диффузного аксонального повреждения головного мозга при смерти от черепно-мозговой травмы». По теме НИР утверждены методические рекомендации: «Судебно-медицинская оценка β -APP белка – маркера аксонального повреждения головного мозга при смерти от черепно-мозговой травмы гистологическими и иммуногистохимическими методами».

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту научной специальности: 3.3.5. Судебная медицина (медицинские науки), изучение различных причин смерти, механизмов ее наступления, процесса умирания, посмертных процессов при разных видах насильственной и ненасильственной смерти, разработка методов установления давности наступления смерти (пункт 1).

Личный вклад автора

Все этапы исследования, включающие в себя набор материала, гистологическое, иммуногистохимическое исследования, выполнены автором лично. Танатологическое исследование, набор материала, работа с медицинской документацией осуществлялась в танатологических отделениях №6 и №10 ГБУЗ «Бюро судебно-медицинской экспертизы Департамента здравоохранения города Москвы» в 2016-2018 гг. Гистологическое, иммуногистохимическое исследования проводились на базе лаборатории патоморфологических и постмортальных исследований Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Москва). Анализ литературы, изложение результатов полученных данных, их статистическая обработка, составление заключения, формулирование выводов, разработка практических рекомендаций выполнены автором лично. Общий вклад автора – 94%.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертационного исследования опубликовано 13 научных работ, в том числе 7 в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для публикации материалов диссертационных исследований. Из них 3 статьи опубликованы в журнале, входящем в базу данных Scopus [24, 26, 29, 31, 32].

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 110 печатных страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания методов и материалов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка использованной литературы. Диссертация иллюстрирована 20 таблицами, 55 рисунками. Библиографический указатель включает 32 отечественный и 148 зарубежных источников.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Актуальные аспекты судебно-медицинской диагностики диффузного аксонального повреждения (ДАП)

Диффузное аксональное повреждение (ДАП) относится к наиболее тяжелым типам черепно-мозговой травмы и является предметом пристального изучения клиницистов, морфологов и судебно-медицинских экспертов [7; 11; 68; 77; 81; 112; 121; 128; 146; 161].

Важной особенностью этого вида травмы головного мозга является отсутствие при секционном исследовании макроскопических признаков повреждения структур черепа и вещества мозга.

В ряде случаев выявляются лишь «мелкие периваскулярные кровоизлияния в белом веществе мозга, преимущественно мозолистом теле, внутренней и наружной капсулах мозга, структурах ствола головного мозга.

Причиной повреждения аксонов служит их перерастяжение с разрывом клеточных мембран, вызванное смещением мозговых структур относительно друг друга, что зачастую происходит при травмах с ротационным механизмом. К таким травмам относятся, прежде всего, полученные при дорожно-транспортных происшествиях, спортивные травмы, особенно повторяющиеся» [168].

«Частота развития ДАП при тяжелых ЧМТ составляет 28–55%, летальность - от 47 до 70%» [10; 16; 49; 108].

«В последние 20 лет значительно изменились подходы к диагностике тяжелой ЧМТ, особенно в случаях диффузного повреждения мозга. Это обусловлено тем, что информация, получаемая традиционными методами диагностики, не позволяет полноценно оценить наличие и распространенность повреждения, особенно в случаях со скудной макроскопической картиной» [21].

Поэтому возникла необходимость в новых более информативных и специфичных методах диагностики в случаях ДАП, которые можно применять при судебно-медицинских экспертизах.

1.2. История изучения механизмов возникновения и морфологии диффузного аксонального повреждения

Интерес к указанной патологии возник давно в связи с тем, что при вскрытии выявлялось несоответствие между макроскопической картиной морфологических изменений головного мозга и тяжелой клинической мозговой симптоматикой. Впервые подобные случаи были описаны А. Voirel еще в 1677 г. [53] затем А. Litre [114] в 1705 г. и J.L. Petit в 1774 г [141].

В 1835 г. J. P. Gama обосновал «вибрационную теорию подобных повреждений головного мозга при травме» [75]. «Значению вибрации в происхождении повреждений мозга придавал Н. И. Пирогов» [11].

В 1882 году А. Ferrari высказывал «идею, что причиной сотрясения мозга при ЧМТ является внезапное повышение внутричерепного давления» [72].

«Несколько иначе влияние удара на мозг объяснял Т. Duret. Делая быстрые и небольшие впрыскивания воды в полость черепа, он заметил, что околосозговая жидкость быстро уходит по направлению водопровода мозга в 3-й и 4-й желудочки мозга, расширяет их полости и ударяет о стенки, так что иногда можно заметить и появление в них кровоизлияний» [70].

«В конце прошлого столетия стали проводиться экспериментальные исследования на животных, позволившие выявить отсутствие выраженных морфологических изменений при смертельной и не смертельной травмах головы в случаях сотрясения мозга» [8].

«W. Koch, W. Filehne провели один из первых таких исследований, поколачивая молоточком по голове животных с постепенным усилением механического воздействия; при этом развивались симптомы сотрясения мозга без образования видимых анатомических его изменений» [105].

«L. Witkowski провел аналогичное экспериментальное исследование. Он оглушал лягушек, ударяя их головой о стол» [173].

«Микроскопическое изучение мозга выявило только петехиальные геморрагии в белом веществе при отсутствии каких – либо органических нарушений самой сосудистой стенки. Т. Jackson, вызывая сотрясение мозга на кроликах, обезь-

янах, наблюдал распространенную дегенерацию белого вещества, которая охватывала весь мозг и не могла быть объяснена фокальным поражением. Автор сделал вывод, что причина дегенерации нервных волокон – их травматическое повреждение, которое бывает либо обратимым, либо необратимым» [93].

«К. Н. Третьяков и А. Л. Землянская описали дегенерацию нервных волокон при экспериментальной травме головного. По их мнению для сотрясения мозга особенно характерным является дегенерация аксонов в виде вздутий, веретенообразных утолщений, а также разрывов с образованием "терминальных шаров и колб". Первичные изменения белого вещества при травме отличаются от вторичных аксональных дегенераций быстротой развития и бессистемным расположением в пучках, не связанных между собой» [20].

«А. М. Гринштейн поддерживал аналогичный подход» [3].

«А. Н. S. Holbourn, создав физическую модель головы, подвергал ее вращательным движениям в различных плоскостях и отмечал, что при ротации головы в полости черепа возникают "срезающие" напряжения, которые приводят к разрывам мозговой ткани и сосудов. На основании этого им была сформулирована ротационная теория повреждения головного мозга» [89].

«R.H. Pudenz, C.H. Sheldon усовершенствовали технику экспериментальных исследований и подтвердили факт возникновения сложных вращательных движений мозга в полости черепа» [145].

«R. D. Wright использовал данные указанных исследований для объяснения повреждений ствола мозга при закрытой травме головы» [174].

«S. J. Strich первой описала патоморфологическую картину ДАП. В 1956 г. она описала морфологию 5 случаев ЧМТ, когда пострадавшие в дорожно-транспортном происшествии находились в коме с грубыми очаговыми неврологическими нарушениями. При исследовании трупов этих лиц морфологические проявления ЧМТ были минимальными. Только у одного пострадавшего имелся перелом черепа; макроскопически оболочки и вещество мозга выглядели почти не измененными. Определялись лишь различной давности кровоизлияния в мозолистом теле и, реже, в верхних ножках мозжечка, иногда встречались бурые кисты в

семиовальном центре, подкорковых ядрах и перивентрикулярном веществе. Гистологическая картина в этих случаях была очень яркой: повсюду в белом веществе выявлялась диффузная дегенерация нервных волокон, что очень походило на валлеровское перерождение. Такая картина наблюдалась в обоих полушариях (асимметрично), в стволе, в мозолистом теле» [161]. «Наиболее важным с морфологической точки зрения было обнаружение так называемых ретрагированных (аксональных) шаров, служащих, как полагала S. J. Strich, прямым свидетельством механического повреждения аксонов, так как при разрыве нервного волокна аксоплазма вытекает из концов поврежденных отростков и происходит булавовидное их утолщение» [163].

«S. J. Strich позже дала описание еще 15 аналогичных случаев, практически не отличавшихся от первоначального. и сформулировала вывод: что повреждения аксонов нейронов возникают в момент травмы головы, предложила рассматривать диффузную аксональную дегенерацию как следствие травматического повреждения аксонов, вызванного ротацией головного мозга» [15; 161; 162].

Исследования, проведенные в Пенсильванском университете, «имеют большое значение в изучении проблемы ДАП при травме головы. Данные исследований, проведенных на приматах с помощью специального устройства, воспроизводившего различные виды движений головы при травмах, во многом способствовали уточнению патогенеза ДАП. В своих опытах авторы полностью исключили такие осложнения церебральной травмы, как отек головного мозга, внутричерепная гипертензия, аноксия, сосудистые нарушения, и при этом определили морфологическую картину ДАП, описанную S. J. Strich. Тем самым они доказали именно травматическую природу аксонального повреждения. Исследователи также доказали возможность сочетанных повреждений мозга, а именно очаговых и диффузных, причем в клинической картине посттравматические церебральные реакции могут накладываться на морфологический субстрат, утяжеляя состояние пострадавшего и ухудшая прогноз» [8] (см. также [33; 34; 78; 110]).

«J. H. Adams и соавторы на секционном и экспериментальном материале определили три характерных патологических изменения структур мозга при ДАП:

- 1) диффузные изменения аксонов;
- 2) местные повреждения в одном или обоих дорсолатеральных квадрантах ростральных отделов ствола мозга;
- 3) местные (локальные) повреждения в мозолистом теле» [35].

«В 1982 году J. H. Adams и соавт. был предложен термин "диффузное аксональное повреждение" Под этим термином они подразумевали локальные разрушения в мозолистом теле и их эволюцию» [35]. «ДАП также было определено как "диффузная дегенерация белого вещества". Также для определения ДАП использовали термины: "режущее повреждение", "диффузное режущее повреждение белого вещества", "внутричерепная травма"» [11; 12; 81].

«В классическом варианте считается, что диффузное травматическое повреждение головного мозга не всегда сопровождается очагами его ушиба или внутричерепными гематомами» [170]. «Однако ушибы мозга и внутричерепные гематомы также могут сопровождаться его диффузным повреждением» [36; 39], аналогичной точки зрения придерживается ряд исследователей: E. F. Aldrich и соавт. (1996 г.) [42], С. Ю. Касумова (2001 г.) [4] и др.

П. О. Ромодановский изучал диффузное аксональное повреждение в ходе диссертационной работы, в которой рассматривался механизм возникновения ДАП, его клиничко-морфологической картина в зависимости от сроков выживаемости, гистологических методов диагностики ДАП [15].

«Одним ранних исследователей, занимавшихся аспектами морфологии ДАП, был N.C. Nevin. В первые 24 часа после травмы им было отмечено набухание миелиновых оболочек при сохранности осевых цилиндров. В период от одних до семи суток после травмы определялись выраженные изменения в белом веществе. Они были представлены множественными "аксональными шарами" и макрофагами, нагруженными распадающимся миелином. После 7 дней после травмы мозг повсюду "показывал" дегенеративные изменения по типу валлеровского перерождения» [132].

«D. R. Oppenheimer исследовал динамику реакции микроглии при ДАП и выяснил, что наименьший срок, при котором наблюдаются изменения со стороны

микроглии – 15 часов. Между 24–48 часами – реакция микроглии была более или менее выраженной. В течение первых двух недель микроглиальные клетки увеличивались в объеме, у них формировались псевдоподии. К 6 месяцам отмечалась диффузная пролиферация микроглии на фоне выраженных дегенеративных изменений миелиновых оболочек и осевых цилиндров» [135].

«Первичные повреждения ствола мозга при травме головы изучались М. R. Crompton. При исследовании ствола мозга у погибших в первые 24 часа после травмы он определял участки повреждений аксонов, субстратом которых считал множественные "аксональные шары" и дегенеративные изменения, как со стороны миелиновых оболочек, так и со стороны цилиндров» [67].

«J. M. Clark исследовал патоморфологические изменения мозга при ДАП в плане механогенеза, с особым вниманием к динамике микроглиальной реакции. Спустя 24 часа после травмы автор находил в зонах поражения белого вещества скопления микроглиальных клеток и появление у них отростков. При более длительном переживании травмы, примерно до 2 недель, J. M. Clark определял значительные скопления микроглиальных клеток, у которых имелось большое количество отростков. В то же время им отмечен переход клеток микроглии в *липидонагруженные фагоциты*» [63].

«H. Bostrom и C. G. Helanger изучали ДАП у пострадавших с травмой головы провели, распределив пациентов на две группы: 1) умерших в течение первых 24 часов после травмы и 2) умерших через несколько дней и более. В первой группе авторы находили только геморрагии в зонах, где обычно встречаются повреждения белого вещества, а во второй группе выявили признаки разрывов аксонов, часто локализующихся по центральным трактам нервных пучков и в их проекциях» [54].

T. A. Gennarelli с соавт., J. H. Adams с соавт. [36] «определяли "аксональные шары" через 5–6 часов после травмы на секционном материале» [38; 39]. «Затем проводили оценку времени появления "аксональных шаров" после травмы. Результаты экспериментального исследования на приматах, когда голове животные

придавалось ротационное ускорение, выявили “аксональные шары” через 2 часа после нанесения травмы» [78; 79; 36].

«Т. Imajo с соавт. наблюдали более раннее появление “аксональных шаров” на секционном материале. “Аксональные шары” уже определялись в пределах двух часов после травмы, а к 4 часам они становились хорошо выраженными» [92].

«J. T. Povlishock при световой микроскопии через 12 часов после дозированной умеренной закрытой травмы головы отмечал очаговое реактивное набухание аксонов, гетерогенность которого становилась отчетливой спустя 7–21 сутки» [143].

«W. L. Maxwell с соавт. рассматривали динамику изменений аксонов в сроки острого посттравматического периода. Было установлено, что степень изменения структур зависит от тяжести травмы. Используя замораживающее скалывание и технику тонких срезов, определяли интактность глиально-аксональных стыков в пределах одного часа после травмы. После 3-4 часов структуры глиально-аксональных стыков исчезали, а к 6 часам – миелиновые пластины отделялись от аксональных остатков. Миелиновые дислокации (частично свободные участки) отсутствовали до 1 часа переживания травмы и были выраженными к 5 часам» [123, 124]. Аналогичные результаты были получены D. E. Erb и J.T. Povlishock [72].

На современном этапе «при исследовании поврежденного аксона с помощью электронной микроскопии были выделены полный (аксонотомия) и неполный (внутреннее аксональное повреждение) разрывы аксона. В месте разрыва аксона содержимое клетки – аксоплазма – изливается и скапливается в виде небольших пузырьков (так называемые аксональные шары). Аксональный транспорт продолжается до момента разрыва в цитоскелете клеток, что приводит к накоплению продуктов транспорта в аксоне и последующему отеку. Через 24 часа после ДАП в дистальных отрезках нервных волокон намечаются дегенеративные изменения осевого цилиндра и мякотной оболочки, которые неуклонно нарастают, вызывая некроз волокна» [13, 16; 65].

«Неполный разрыв аксона может восстановиться, что будет способствовать благоприятному исходу, или может перейти во вторичную аксонотомию, что приведет к ретроградной транснейрональной и каскадной валлеровской дегенерации с потерей функции. Вторичный механизм повреждения включает нарушение функции ионных каналов, демиелинизацию, нарушение функций митохондрий, цитотоксичность, изменения глиально-аксональных муфт, действие оксида азота и появление антител к ганглиозиду» [85; 107].

Избирательное аксональное повреждение может произойти при соматическом или дендритическом повреждении. Аксоны зачастую отходят на значительное расстояние от исходного нейрона и могут повреждаться при различных соматических патологиях. Как показали эксперименты, «аксональное повреждение ассоциируется с различными нарушениями, включающими увеличение проницаемости аксональной мембраны, негативные внутриклеточные каскадные реакции, дисфункцию аксонального транспорта и нарастающую дегенерацию» [151; 170].

«Физическая деформация, энергетический дефицит, ацидоз и нейровоспалительные нарушения служат причиной активации ионных каналов, приводящей к патологическому увеличению интрааксонального транспорта Na^+ и Ca^{2+} . Увеличенный натриевый транспорт снижает АТФазную активность (АТФ – аденозинтрифосфат), нарушает реверсную деятельность градиентзависимых ионных каналов. Нарушения аксолеммы обычно сопровождаются интервенцией Ca^{2+} внутрь аксона. Ca^{2+} является основным медиатором аксонального повреждения и дегенерации. Переизбыток кальция приводит к нарушению работы митохондрий с последующим увеличением проницаемости пор митохондриальной мембраны, пропускающих молекулы менее 1,5 кДа, что вызывает обезвоживание и необратимое повреждение митохондрий. Поврежденные митохондрии служат критерием субклеточных нарушений, ассоциированных с цитохромом С» [152], расположенным в перимитохондриальном пространстве. Активация кальций активируемых цистеинпротеаз и/или каспаз усугубляет дегенерацию аксонального цитоскелета и повреждение органелл, что приводит к смерти аксона [152].

1.3 Клиническая картина ДАП

Диффузное аксональное повреждение мозга в клинике характеризуется длительным коматозным состоянием, возникающим с момента травмы, при отсутствии светлого промежутка, в сочетании с грубой стволовой и полушарной симптоматикой или без таковых (случаи с комой и лишь общемозговой симптоматикой). Далее кома может перейти в вегетативное состояние с развитием синдрома функционального и (или) анатомического разобщения больших полушарий головного мозга, подкорковых структур и мозгового ствола. Отмечена «высокая летальность больных с ДАП через различные промежутки времени после травмы от экстрацеребральных септических причин» [8]. В единичных случаях в поздние сроки посттравматического периода «возможен выход из комы, регресс очаговой и общемозговой неврологической симптоматики» [9; 120; 132; 157].

1.4 Прижизненная диагностика ДАП лабораторными и инструментальными методами

«При ДАП инструментальные исследования КТ и МРТ – могут не выявлять каких-либо церебральных изменений, и мозг почти в 30 % случаев может выглядеть интактным» [67].

Патогномоничными признаками ДАП при КТ являются мелкоочаговые повышения плотности ткани мозга в семиовальном центре, мозолистом теле и в других отделах белого вещества. При этом может выявляться картина диффузного набухания с компрессией желудочков и субарахноидальных щелей, чаще у детей.

«При ДАП МРТ определяет изменения в белом веществе лобных и височных долей, в коллене, стволе и валике мозолистого тела. Кроме того, при МРТ определяются повреждения ствола, локализующиеся в дорсальных отделах, тогда как при КТ повреждения в стволе практически не визуализируются в связи с техническими трудностями в проведении оптимального среза сканирования» [9; 100].

С развитием молекулярной биологии диагностика аксонального повреждения перешла на новый уровень – установление маркеров повреждения нервных

клеток в крови и спинномозговой жидкости (СМЖ) пациентов [2; 20; 35; 97; 102; 108; 155; 172; 177].

«На сегодняшний день с целью диагностики и прогноза ДАП в периферической крови определяют уровень не только структурных составляющих клеток нервной системы (S-100 β и глиальный фибриллярный кислый белок) и ферментов, находящихся в нейронах (нейронспецифическая эналаза, креатинфосфокиназа, лактатдегидрогеназа), но и различных продуктов деградации клеточных структур, возникающих в результате протеолиза (тау-белки, α -II-спектрин и продукты его деградации, амилоид- β 1-42, аполипопротеин E)» [1] (см. также [20; 45; 48; 55; 70; 90; 104; 126; 127; 130; 134; 141; 149; 166; 169]).

Наиболее перспективным является изучение биомаркеров нервной системы, которые могут быть специфичными не только для диагностики повреждения нервной ткани, но и для прогноза тяжести состояния и динамики восстановления после нейротропной терапии [25; 39; 44; 46; 98; 102; 113; 135; 136; 167].

Таким образом, структурные компоненты нейронов и клеток нейроглии, внутриклеточные ферменты могут потенциально использоваться для диагностики ЧМТ, в том числе для выявления пациентов с более тяжелой травмой, чем это представляется клинически [23; 99; 101; 178; 180].

1.5. Посмертная диагностика ДАП: классические гистологические методы исследования

«Для гистологической верификации ДАП предложен комплекс методов окраски, которыми следует пользоваться с учётом сроков посттравматического периода. Основными из них являются методики, позволяющие обнаружить изменения осевых цилиндров (импрегнация серебром по Бильшовскому и Глису), миелиновых оболочек (импрегнация осмием по Марки для выявления ранней демиелинизации, окраска по Шпильмейеру для обнаружения поздней демиелинизации). При необходимости исследуют тела нейроцитов (окраска гематоксилином и эозином, по Нисслю и др. классические нейроморфологические окраски), микроглию

и астроглию (окраска по Мийагава-Александровской и Кахалу соответственно)» [16].

Импрегнация серебром (по Билышовскому и Глису) позволяет решать вопрос о наличии повреждений белого вещества в различные сроки посттравматического процесса, наиболее демонстративной является в сроки от 2 дней до 1 недели. Начиная с 5 дня, повреждения аксонов лучше определяются при импрегнации осмием по Марки. При переживании травмы более 2 месяцев участки повреждения аксонов хорошо выявляются при окраске препаратов по методу Шпильмейера, можно увидеть очаги отсутствия миелина.

Однако применяемые в настоящее время в практике судебно-гистологических исследований традиционные методы диагностики ДАП, включая импрегнацию серебром, не обладают достаточной чувствительностью и специфичностью. В ранние сроки после травмы, когда морфологические изменения в ткани головного мозга минимально выражены, эти методы не смогут выявить повреждение аксонов. Поэтому для расширения диагностических возможностей гистологического исследования необходимо применить метод диагностики, обладающий высокой специфичностью.

1.6. Исследование белков-маркеров повреждения нервной ткани с помощью покадровой микроскопии и масс-спектрометрического анализа

В связи с ограниченными возможностями традиционных методов исследования в течение последних десятилетий большое внимание уделяется изучению роли биомаркеров в диагностике черепно-мозговой травмы. Поэтому в практику врача судебно-медицинского гистолога начинают внедряться методы ИГХ исследования для выявления белков, появляющихся на тканевых срезах при повреждении вещества головного мозга. Особую актуальность методы ИГХ приобретают при исследовании секционного материала в сложных диагностических случаях, когда макроскопические признаки травмы отсутствуют или выражены минимально, а характерные микроскопические признаки еще не успели сформироваться.

«Для диагностики повреждения нейронов изучается большое количество биомаркеров, однако специфических, как, например, биомаркеры повреждения миокарда, не найдено» [103; 138].

Это связано с тем, что биомаркеры повреждения мозговой ткани обнаруживаются не только при травме, но и при заболеваниях ЦНС, связанных с повреждением нейронов [22; 66; 74; 93; 175; 176].

Для поиска оптимальных маркеров, которые можно использовать при диагностике аксонального повреждения, было выполнено значительное количество исследований, часть которых проводилась на животных *in vivo*. При этом создавались модели, наиболее близкие к изменениям, которые возникают у людей при ДАП [40; 47; 57; 58; 59; 61; 84; 86; 109; 129; 137; 171; 179].

Кроме того, для выбора какого-либо белка в качестве маркера аксонального повреждения «требуется полное понимание основных клеточных и молекулярных механизмов вторичного повреждения нейронов после ЧМТ» [64; 145].

Разнообразие клеток в месте повреждения после ЧМТ, таких как нейроны, глия, воспалительные и эндотелиальные, позволило отследить последствия травмы на конкретных видах клеток в течение различных временных промежутков. «Ценным дополнительным инструментом является моделирование травмы *in vitro* на клеточной культуре. Модели использовались для идентификации возможных биомаркеров, установления их клеточного источника и функции, для дальнейшей их оценки в естественных условиях. Было установлено, что клеточные модели *in vitro* близки на 90% к процессам, протекающим в естественных условиях, *in vivo*» [124, 125].

Разработано несколько различных моделей ЧМТ: статическое механическое повреждение (рассечение, сжатие и баротравма), динамическая механическая травма (ускорение/замедление), гидродинамическая травма, модели клеточного растяжения [62; 92; 117; 122; 152].

Несмотря на некоторое упрощение этих моделей *in vivo*, многие аспекты посттравматических изменений воспроизводились в культивируемых клетках, осо-

бенно ультраструктурные изменения, ионные нарушения, изменения в электрофизиологии и продукция свободных радикалов [115; 116; 130; 147]).

«Благодаря своей простоте модель имела некоторые ограничения, но при этом явилась хорошим инструментом для скрининга биомаркеров» [147]. «Путем ИГХ и покадровой микроскопии для подробного изучения изменений белков, экспрессирующих на различных этапах после травмы, исследовали такие обще-клеточные процессы, как деление, гибель клеток, миграция, синтез актина» [158].

Покадровая микроскопия позволила рассмотреть процессы регенерации различных видов нервных клеток. С помощью масс-спектрометрического анализа провели поиск возможных биомаркеров травмы нервной ткани как внеклеточных, так и внутриклеточных белков, рано выявляющихся после травмы. В результате очень строгого отбора критериев рассматривали 53 белка в среде после травмы.

1.7. Анализ белков – маркеров повреждения нервной ткани

Появление после травмы во внеклеточном пространстве белков, которые в нормальных условиях находятся исключительно внутриклеточно, обуславливает возможность их использования в качестве биомаркеров травмы [14; 19; 80].

«Актин является одним из наиболее распространенных белков в клетке и функционирует в клеточной структуре во время миграции» [111], пролиферации и фагоцитоза. Из 53 специфичных травме белков 15 (28%) были связаны с актином. Белки, родственные актину, свободно выходят во внеклеточное пространство при черепно-мозговой травме. Поврежденные клетки имели более низкую экспрессию актин- ассоциированных белков (4 из 46,9%). «Два актин-ассоциированных белка, эзрин и мезин, представляют интерес, так как их экспрессия повышается после травмы мозга *in vivo*» [123]. Активный эзрин выполняет еще несколько функций – «внутриклеточно стимулирует филаменты актина вокруг фагосом и имеет важное значение для правильного слияния лизосом» [119]. «ИГХ с применением специфических антител к ERM и pERM показывает, что в дополнение к их присутствию в ламеллоподиях астроцитов ERM белки выражено манифестируют вокруг мертвых клеток как *in vitro*, так и *in vivo*» [148].

Астроциты являются наиболее вероятным источником внеклеточных эрина и моззина, найденных в среде после травмы. Обнаружены еще «два актин-ассоциированных белка, специфичных для травмы: калпонин и кофилин-1. Калпонин приводит к эндотелиальному сокращению и гипоперфузии после ЧМТ» [106]. «Кофилин-1 участвует в реорганизации актина в дендритные шипики, его количество повышается в течение 24 ч после ЧМТ» [94; 107].

Обнаружен белок ARP2, который является важным фактором для роста аксонов [105].

Внеклеточно также обнаружили нуклеозиддифосфаткиназу А (NDKA), «представляющую научный интерес, так как было показано, что она стимулирует рост аксонов» [173].

Травма приводит к гибели значительного количества клеток и воспалительной реакции, что в настоящее время считают важным компонентом ЧМТ [14; 83; 87; 118; 144].

Быстрое очищение от мертвых клеток имеет жизненно важное значение для уменьшения вторичного некроза и элиминации цитотоксического материала, усиливающего воспалительную реакцию. «Астроциты могут поглощать целые мертвые клетки после травмы, как *in vitro*, так и *in vivo*» [115; 150].

Активация и сбор воспалительных клеток в зоне травмы, а именно Т-лимфоцитов и нейтрофилов, достигают пика через 24 часа после травмы. «Макрофаги и микроглия активируются значительно позже, и пик активации выявляется в течение 7 суток после травмы» [63]. Обнаружены уникальные белки, связанные с захватом (фагоцитоз, макропиноцитоз и аутофагия) или разрушением клеток как в среде, так и в клеточной фракции после травмы. Так, в среде клеточной фракции обнаружили два белка, участвующих в фагосомальном созревании – lamp1 и lamp2. Установили, «что двойные мутации lamp1 и lamp2 ухудшают процесс разрушения клеток вследствие снижения способности слияния лизосом и фагосом» [89; 91].

Во время фагоцитоза повреждается мембрана клеток, и активируются процессы ее восстановления, увеличивается количество синтазы жирных кислот фер-

мента, участвующего в синтезе мембран, который специфически найден в среде после травмы [56; 88; 153].

При диагностике и установлении давности ЧМТ, в том числе ДАП, отечественные и зарубежные ученые оценивают морфологическое состояние астроцитов и их белков [5; 18; 21; 37; 60].

Рассмотрим некоторые из белков, используемых как маркеры повреждения нервной ткани.

«S-100 протеины являются кальций-связывающими белками с низкой молекулярной массой (до 20 кДа); они имеют 3 подтипа, состоящих из димерной комбинации α - и β -цепей. Белок S-100 β ($\beta\beta$; 10-12 кДа) является специфичным для ткани мозга. Он обнаруживается в цитоплазме астроцитов и шванновских клеток, но может быть выявлен в цитоплазме адипоцитов, хондроцитов и меланоцитов» [21]. При повреждении вещества головного мозга концентрация белка S-100 увеличивается в плазме крови и СМЖ. «У протеина S-100 β есть один главный и существенный недостаток, ограничивающий его широкое использование – низкая специфичность. Поскольку белок S-100 β содержится, помимо нервной системы, в других нормальных тканях организма и экспрессируется некоторыми опухолями, то травма другого органа, где расположен этот маркер, или любое хирургическое вмешательство, или сопутствующее нейродегенеративное, или аутоиммунное заболевание, могут вести к увеличению содержания протеина S-100 β в биологических средах, тем самым приводя к ложноположительной интерпретации результатов. Так, R. E. Anderson и соавт. (2001), проведя исследование протеина S-100 β в сыворотке крови у пострадавших с сочетанной травмой без сопутствующей ЧМТ, отметили резкое увеличение уровня S-100 β в первые сутки после травмы, пик которого приходился на первые 6 ч» [21]. «Такое увеличение содержания протеина S-100 β обуславливает массивной травмой скелетной мускулатуры у пациентов с политравмой» [21] (см. также [42; 73; 131]).

«Нейрон-специфическая енолаза (NSE — от англ. neuron-specific enolase) является гликолитическим ферментом цитоплазмы клеток с молекулярной массой 78 кДа. В нормальных условиях NSE присутствует в клетках нейроэктодермаль-

ного происхождения, нейронах головного мозга, нейроэндокринных клетках и периферической нервной ткани. Увеличение содержания NSE в сыворотке крови и ЦСЖ наблюдают при различных неврологических заболеваниях, сопровождающихся нарушением целостности ГЭБ (эпилепсии, нетравматическом субарахноидальном кровоизлиянии, болезни Крейтцфельда - Якоба), при повреждении клеток (инсульт, ЧМТ), а также при развитии опухолей нейроэктодермального или нейроэндокринного происхождения, лейкозах» [21]. «Несмотря на то, что NSE является высокоспецифичным белком нейронов, при экспериментальных и клинических исследованиях при сочетанной травме, гемолизе, геморрагическом шоке, переломах бедренной кости, печеночной и почечной недостаточности уровень биомаркера повышался как в случаях с ЧМТ, так и без нее» [139]. «У пациентов с тяжелой сочетанной травмой без повреждения головного мозга отмечалось повышение уровня NSE в течение первых 48 часов после травмы» [138].

«Глиальный фибриллярный кислый протеин (GFAP — от англ. glial fibrillary acid protein) — это мономерный белок с молекулярной массой 50-52 кДа, который является главной составляющей цитоскелета клеток астроглии. GFAP высвобождается во внеклеточное пространство при нарушении целостности глиальных клеток и высокоспецифичен для центральной нервной системы. Главным недостатком широкого использования GFAP в клинике в качестве биохимического маркера является его дорогостоящее и трудоемкое определение в биологических средах (сыворотке крови, ЦСЖ). GFAP обладает высокой специфичностью в отношении повреждения именно клеток астроглии» [21]. В ЦНС после повреждения (будь то результат травмы, заболевания, генетического нарушения) астроциты в результате типичного поведения отвечают астроглиозом, при котором отмечается быстрый синтез GFAP [71; 133].

«Протеин С-tau (от англ. cleaved — расщепленный) представляет собой фрагмент расщепленного с помощью протеолитических ферментов протеина MAP-tau (от англ. microtubule-associated protein tau). Протеин MAP-tau является структурным белком цитоскелета нейронов и локализуется, главным образом, в аксонах, где принимает участие в формировании пучков микротрубочек. Пучки

микротрубочек в аксонах — это важные элементы аксоплазматического транспорта белков. Таким образом, MAP-tau является одним из важнейших структурно-функциональных протеинов ЦНС» [21]. «Неотъемлемым компонентом ЧМТ является повреждение аксональных микротубул, что приводит к высвобождению и протеолизу микротубуло-ассоциированных тау-белков. Уровень биомаркера в ликворе начинал повышаться в течение первых шести часов после травмы, достигая пика через 168 часов» [41; 142].

1.8 Предшественник β -амилоида (β -APP белок)

«Несмотря на рассмотренный довольно широкий спектр белков, образующихся при повреждении ткани ЦНС и последующих реакциях, наиболее перспективна ИГХ диагностика белков, выходящих из нейрона при его повреждении. Один из самых чувствительных, а поэтому наиболее широко исследуемый маркер — это β -APP белок. Его наличие чувствительно и специфично выявляет поврежденные аксоны. Этот белок принимает участие в формировании ткани мозга» [154]. «В нормально функционирующих нейронах белок транспортируется быстрым транспортом от тела нейрона по аксону и никогда не выявляется на тканевом срезе вне клетки. Нейроны с нарушенным транспортом аксоплазмы накапливают белок

β -APP вплоть до места повреждения» [164].

Белок β -APP «выявляется довольно рано, уже через 35 минут после повреждения» [90], и остается позитивным длительное время — более одного месяца, а по данным Blumbergs и соавт. — до 99 дней [52].

Исследование β -APP белка предложено проводить при исследовании умерших детей. Наибольшее применение этот метод получил при ЧМТ у детей [43]. В более поздних исследованиях L. Jensen и соавт. [95] изучали манифестацию β -APP в нервной ткани при внезапной и ранней смерти детей.

Ряд исследователей [79; 156] описывают динамику накопления β -APP протеина в ткани мозга, пропорционально сроку выживания после травмы. Первые признаки начинают обнаруживаться в течение 3 часов (от 35 минут) после остро-

го события, которым может быть как травма мозга, так и состояние, приводящее к нарушению кровообращения. Далее количество накопленного маркера и соответственно, положительно окрашенных нейронов увеличивается и достигает максимума в течение 24 часов. На этом уровне β -APP белок сохраняется и легко распознается в сроке выживания до 10–14 дней. После этого периода интенсивность окрашивания начинает уменьшаться и может отсутствовать через 3–4 недели, или может обнаруживаться гранулированное окрашивание в структуре аксона при исследовании на большом увеличении.

При ИГХ исследовании необходимо четко понимать, что β -APP белок как маркер повреждения аксонов – это неспецифический, хотя и чувствительный, маркер нарушения быстрого аксонального транспорта, и, следовательно, положительная ИГХ реакция на β -APP белок выявляет аномальные аксоны не только при аксональном повреждении вследствие ЧМТ. К подобным состояниям относятся процесс старения, инфаркт мозга, образование гематомы, вокруг опухолей и абсцессов, а также вследствие различных интоксикаций [82]. При детальном исследовании Dolinac D. и соавторы [69; 84] обнаружили, что глобальная ишемическая гипоксия, возникающая вследствие сердечного приступа и эпилептического статуса, является причиной нарушения аксонального транспорта, при этом обнаруживаются признаки повышения внутричерепного давления. Однако корреляция не является абсолютной, и при анализе патологических данных при отсутствии некроза-давления на парагиппокампальной борозде [34] часто описывали различную степень выраженности отека мозга, возможное сглаживание извилин или степень асимметрии полушарий головного мозга.

Другими словами, может быть ряд ситуаций, которые приводят к тяжелой гипоксии, повышению внутричерепного давления, следствием которых является нарушение быстрого аксонального транспорта, при котором обнаруживается положительная реакция на β -APP белок [160; 165].

Поэтому интерпретация любой положительной реакции на β -APP критически зависит от оценки того, было ли повышено внутричерепное давление на протяжении всей жизни.

Диагноз "аксональное повреждение" не следует выставлять в отсутствие травмы в анамнезе, а картина аксонального повреждения, имитирующая ДАП, должна быть квалифицирована, как "гипоксическая", или "ишемическая", или "возникающая" в связи с повышением внутричерепного давления".

1.9. Резюме

Таким образом, анализ литературы продемонстрировал актуальность дальнейшего изучения патологии ДАП с применением методов иммуногистохимии. ИГХ методы исследования на сегодняшний день широко применяются в патологической анатомии для различных целей, осуществляются попытки использования их и в судебно-медицинской гистологии, поэтому, определение биологических маркеров, перечисленных выше, было бы целесообразно адаптировать к судебно-медицинскому материалу и затем ввести новый метод в повседневную практику в целях диагностики ДАП.

Основным маркером аксонального повреждения, по данным зарубежной литературы, считается β -APP белок. Это связано с его специфичностью и высокой чувствительностью, а также с ранним появлением после повреждения нервной ткани. В отечественной практике таких исследований не проводилось. Поэтому существует необходимость в разработке ИГХ методики с использованием антител к β -APP белку и проведении с ее помощью исследования на аутопсийном материале, а также оценке результатов.

Для правильной интерпретации полученных результатов необходимо учитывать все клинические и морфологические данные. Хорошо проанализированный клинический материал, несомненно, будет способствовать правильному построению экспериментальных моделей для ответов на эти вопросы [75; 76; 82; 96].

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для достижения поставленных целей и реализации запланированных задач потребовалось разделить диссертационное исследование на два этапа. Основные макроскопические закономерности проявления аксонального повреждения и их морфологические эквиваленты на уровне рутинного исследования были изучены в рамках секционного этапа, который был проведен на базе танатологических отделений № 6 и № 10 "Бюро судебно-медицинской экспертизы»" Департамента здравоохранения города Москвы (далее "БСМЭ" ДЗ г. Москва). Следующий этап – проведение гистологических и иммуногистохимических исследований, микроскопическое изучение танатогенетических закономерностей и морфологических эквивалентов изучаемых повреждений. Исследование проводилось на базе лаборатории патоморфологических и постмортальных исследований ФГБУ "Российский центр судебно-медицинской экспертизы" Министерства здравоохранения РФ г. Москвы (далее ФГБУ "РЦСМЭ" МЗ РФ).

2.1. Объем и материал проводимых исследований

В рамках проводимого исследования был осуществлен набор материала, представленный случаями смерти вследствие черепно-мозговой травмы - экспериментальная группа и случаями смерти от других причин, не связанными с черепно-мозговой травмой – группа сравнения (Таблица 1). Взятие трупного материала для проведения научного гистологического исследования и в его рамках ИГХ исследования осуществлялось собственноручно во время проведения судебно-медицинского исследования трупов в моргах "БСМЭ" ДЗ города Москвы, а также был проведен ретроспективный анализ случаев с 2011 по 2015 гг. по изъятым гистологическим блокам (материал, залитый парафином). Из указанного количества наблюдений было вырезано 510 кусочков, изъято 856 блоков, приготовлено 1200 гистопрепаратов.

Таблица 1 – Общая характеристика исследуемых групп по возрасту и количеству случаев

<i>Группы случаев</i>	<i>Экспериментальная</i>	<i>Сравнения</i>
Возраст	17–88 лет	17– 89 лет
Количество случаев	59 (жен. – 17, муж. – 42)	58 (жен. – 18, муж. – 40)

По нозологии случаи травмы распределились следующим образом (Таблица 2).

Таблица 2 – Распределение 59 случаев травмы головного мозга по нозологиям

<i>Показатели</i>	<i>Нозологии</i>						
	ДАП	ДТП	Огнестрельная травма	Падение с высоты			ЧМТ
				Лестничный марш	С большой высоты	Собственный рост	
Количество	4	17	5	1	3	3	26
%	7	9	8	2	5	5	44

Больше всего случаев пришлось на ЧМТ, как закрытой, так и открытой – 26 (44%) далее – случаи ДТП, 17 (29%), огнестрельная травма – 5 (8%), 4 (7%) случая ДАП, далее поровну по 3 (5%) – падение с большой высоты и высоты собственного роста, падение на лестничном марше – 1 (2%).

Случаи группы сравнения, не связанные с травмой мозга, распределились следующим образом (Таблица 3).

Таблица 3 – Распределение 58 случаев смерти от других причин по нозологиям

<i>Нозологии</i>													
<i>Показатели</i>	Механическая асфиксия	ЦВБ	ОИБС	Отравление наркотиками	КМП	ХАИ	Рак	Разрыв аневризмы аорты	ОНМК	Отравление СО	ТЭЛА	Колотые раны	Острое кровоотечение
Кол-во	5	2	13	6	4	10	2	3	5	2	2	3	1
%	8	4	22	10	7	17	4	5	8	4	4	5	2

Среди группы сравнения случаи распределились следующим образом: ИБС – 13 (22%), ХАИ – 10 (17%), отравление наркотиками – 6 (10%), механическая асфиксия и ОНМК – поровну, 5 (8%), КМП – 4 (7%), поровну – 3 (5%): разрыв анев-

ризмы аорты, колото-резанные раны, по 2(4%) – ЦВБ, рак, отравление СО и ТЭЛА. 1 случай (2%) – острое кровотечение из расширенных вен пищевода.

При проведении исследования было использовано следующее оборудование и расходные материалы:

- 1) стандартный секционный набор;
- 2) автомат для обработки (проводки) биологических тканей;
- 3) станция для заливки биологических тканей в парафин;
- 4) микротом ротационный;
- 5) иммуногистостейнер;
- 6) аппарат для заключения срезов под покровное стекло;
- 7) формалин 10% забуференный;
- 8) предметные стекла, в том числе стекла с адгезивным покрытием для ИГХ срезов;
- 9) лабораторная посуда, инструменты, маркер для надписи на предметных стеклах, расходные материалы, реактивы и красители, используемые в повседневной работе судебно-гистологических отделений;
- 10) реагенты для ИГХ метода: моноклональные антитела к β -APP белку, система визуализации на основе пероксидазы;
- 11) микроскоп проходящего света.

Характеристика моноклонального антитела приведена в Таблице 4.

Таблица 4 – Характеристика моноклонального антитела к β -APP белку

<i>Наименование антитела</i>	<i>Описание выявляемого белка</i>
Кроличьи моноклональные антитела к белку-предшественнику амилоида [clone Y188] (Amyloid Precursor Protein)	β – APP белок – мембранный белок, располагается в нейронах головного мозга, транспортируется аксоплазмой по аксону. Во время созревания незрелый APP (N-гликозилированный в эндоплазматической сети) перемещается комплекс Гольджи, где происходит полное созревание (O - гликозилированный и сульфатированный). После расщепления альфасекретазой растворимый APP высвобождается во внеклеточное пространство, и C-конец интернализуется в эндосомы и лизосомы. Некоторое количество APP накапливается в секреторных транспортных пузырьках, покидающих поздний отсек Гольджи, и возвращается на поверхность клетки

2.2. Методика изъятия и подготовки материала для гистологического и иммуногистохимического (ИГХ) исследования

ДАП возникает в результате травмы головного мозга по механизму ускорение-торможение с элементами ротации. Также, возможен гидроудар жидкостей мозга на уровне сосудов микроциркуляторного русла с перераспределением объема циркулирующей крови и длительной последующей вазодилатацией. При этом наибольшее натяжение возникает в нервных волокнах мозолистого тела, ножек мозга и ножек мозжечка. В этих участках выявляются макроскопические и микроскопические изменения при ДАП [9]. Поэтому для полноценного исследования ткани головного мозга с целью выявления повреждения аксонов набирали материал белого вещества из всех перечисленных зон левого и правого полушарий головного мозга – передний, средний, задний отделы мозолистого тела, внутренняя капсула, наружная капсула, верхние ножки мозжечка, ножки мозга и мост, продолговатый мозг (Рисунки 1, 2, 3).

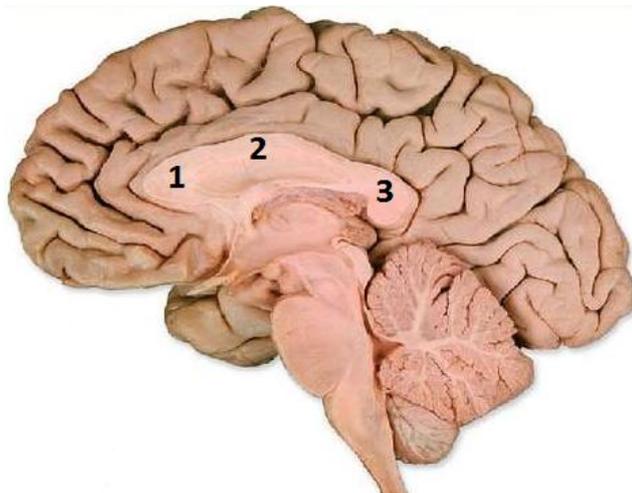


Рисунок 1 – Строение мозолистого тела: 1 – передний отдел; 2 – средний отдел; 3 – задний отдел

Фрагменты головного мозга вырезали толщиной до 1 см и площадью не менее 1,5×1,5 см. Информативность исследования при меньшем количестве материала снижается. Во всех случаях для получения сопоставимых результатов процедура гистологического и количественного морфологического исследования была максимально стандартизирована.

Учитывая тот факт, что кроме стандартных гистологических методик применялось ИГХ исследование, материал изымался у трупов с давностью наступления смерти до 48 часов. При этом необходимым условием являлось хранение трупов в холодильнике при температуре от (не ниже) 0^0 до $+5^0$ С.

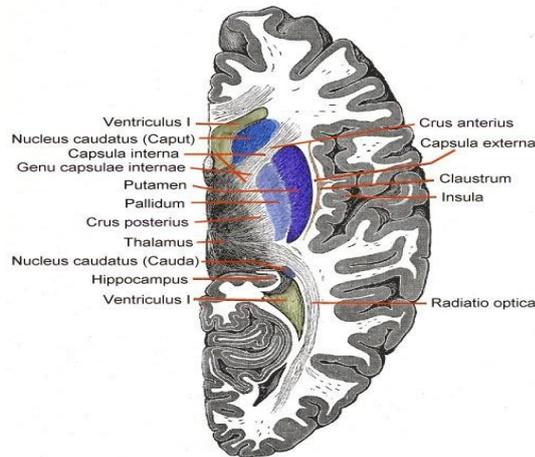


Рисунок 2 – Строение внутренней капсулы

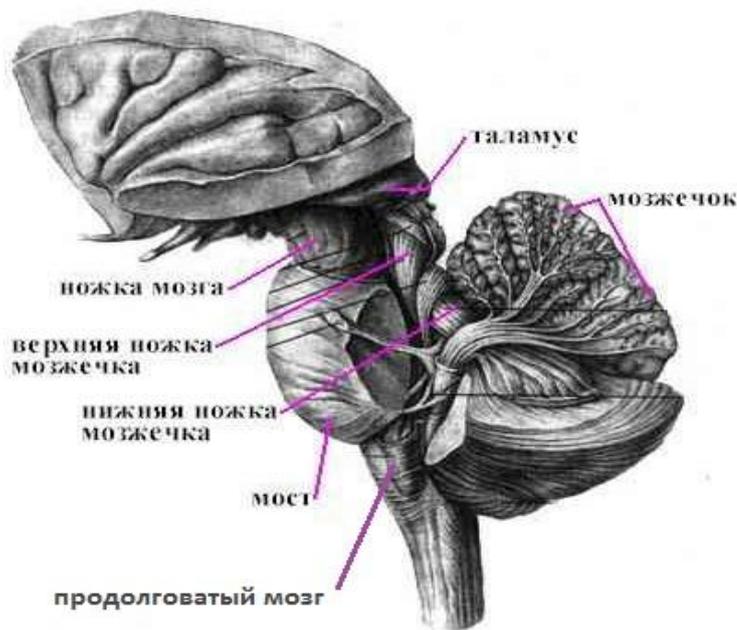


Рисунок 3 – Ствол мозга

В качестве фиксатора использовали 10%-й забуференный формалин. Изъятый на исследование материал помещали в фиксирующую жидкость очень быстро, в течение 20-30 минут. Минимальное время фиксации составляло 1 час на 1 мм среза, оптимальная продолжительность – 24 часа, допустимое (максимальное) время фиксации – 48 часов.

Необходимо обратить внимание на то, что материал с разрушенной антигенной структурой (т.е. с выраженными аутолитическими изменениями и тем более гнилостно измененный) заведомо не пригоден для ИГХ исследования. Toupalík P., Bouska I., Jezková J. в своей статье о влиянии аутолитических изменений на возможность гистохимического исследования ЦНС [166] доказали сохранность белка до начала фиксации в течение 7 суток, то есть фиксация может быть начата в пределах 7 суток после взятия материала [27]. Тем не менее, для исключения возможных артификальных эффектов, в нашей работе мы придерживались канонического времени фиксации, составляющего не более 48 часов.

Проведение гистологического исследования включало следующие этапы:

- 1) стандартная изопропиловая проводка [2];
- 2) изготовление парафиновых блоков;
- 3) приготовление срезов на микротоме;
- 4) депарафинизация и демаскировка (для ИГХ исследования);
- 5) окраска гематоксилином и эозином или проведение ИГХ реакции;
- 6) анализ препаратов под световым микроскопом.

Проводка гистологических тканей в спиртах и заливка их в парафин производилась по общепринятым стандартным и сертифицированным схемам. Использовался парафин с известным сроком годности. Тщательно контролировалось, чтобы температура парафина была не выше 60 °С. Так как материал в парафиновых блоках может храниться длительное время без какого-либо изменения структуры антигенов, мы использовали парафиновые блоки для повторных ИГХ экспериментальных исследований.

Из парафиновых блоков на микротоме изготавливали срезы толщиной 5 мкм, наклеивали их на стекла, для ИГХ реакции использовали специальные стекла с адгезивным покрытием. Адгезивное покрытие необходимо для того, чтобы срезы не отклеивались и не смывались при промывке во время постановки ИГХ реакций. Далее срезы высушивали в течение 1 ч при 60 °С (строго!), депарафинировали и регидратировали стандартными методами. Депарафинизация была проведена качественно, до полного удаления парафина, иначе при наличии остатков

парафина при постановке ИГХ реакции можно получить фоновое окрашивание. Далее часть препаратов окрашивали гематоксилином и эозином, с другой частью после демаскировки проводили ИГХ реакцию.

2.3. Постановка ИГХ исследования и оценка результатов

ИГХ метод заключается в реакции со специфическими (первичными) антителами, с мечеными вторичными антителами, гистохимическом выявлении метки. Нами были использованы коммерческие антитела, сертифицированные для применения их территории Российской Федерации, для которых уже прописаны стандартные протоколы проведения ИГХ реакции.

После стандартных проводки, заливки парафином, приготовления срезов и депарафинизации, описанных выше, проводили демаскировку антигенов. Вследствие формалиновой фиксации в ткани образуются кальциевые мостики, блокирующие некоторые антигены, которые становятся недоступными для антител. Демаскировка позволяет открыть эпитопы антигенов для связывания с антителом. Для этой цели проводили высокотемпературную обработку при температуре 95 °С в "ТРИС-ЭДТА" буфере с высоким рН (9) в течение 20 минут. Стекла остывали до 65 °С и промывались промывочным буфером: три смены по 3 минуты в каждой.

После демаскировки стекла устанавливались в иммуногистостейнер и далее проводили ИГХ реакцию по указанному протоколу:

1. Блокирование эндогенной пероксидазы коммерческим блокирующим раствором в течение 10 минут.
2. Промывка промывочным буфером: три смены по 3 минуты в каждой.
3. Инкубация срезов с первичными моноклональными антителами (кроличьи) в течение 40 минут (при комнатной температуре).
4. Инкубация срезов с вторичными антителами (смесь антикроличьих биотинилированных антител) в течение 30 минут при комнатной температуре во влажной камере.
5. Промывка промывочным буфером: три смены по 3 минуты в каждой.

6. Инкубация срезов с рабочим разведением диаминобензидина (ДАБ хромоген) в течение 10 минут.
7. Промывка промывочным буфером: три смены по 3 минуты в каждой.
8. Промывка дистиллированной водой.
9. Докрашивание гематоксилином Майера в течение 2 минут.
10. Промывка срезов дистиллированной водой.
11. Дегидратация в восходящей батарее спиртов.
12. Заключение срезов в синтетический бальзам.

При ИГХ окрашивании использовали антитела к β -APP белку в разведении 1:500 (фирма "Abcam").

При оценке результатов выявляли наличие и степень выраженности окрашивания. Поиск экспрессии антигенов осуществлялся в нейронах и аксональных отростках. Для проверки достоверности результатов обязательно учитывали результаты отрицательного и положительного контроля.

В качестве положительного контроля использовали ткань с заведомо известными содержанием и локализацией исследуемого антигена, в нашем случае это были препараты из группы сравнения – срезы опухоли головного мозга (глиобластома) с полученной реакцией на β -APP белок при патологоанатомическом исследовании.

Отрицательные контроли подразумевали использование ткани с заведомо известным отсутствием заданного антигена (в нашем случае это были препараты кожи), а также исследуемые срезы головного мозга без нанесения первичных антител.

Для постановки ИГХ-реакций использовали иммуностейнер модель «Autosteiner Link 48» фирмы «ДАКО».

Осуществлялась полуколичественная оценка площади окраски поля зрения, для каждой градации использованы цифры от 0 до 4 (Таблица 5).

Для достоверности полученных результатов в каждом препарате оценивали 10 различных полей зрения при увеличении 200 и фиксировали средний результат.

Таблица 5 – Полуколичественная оценка ИГХ реакции по количеству структур с экспрессией β -APP белка

<i>Количество структур, %</i>	<i>Оценка (в баллах)</i>
0	0
1–25	1
26–50	2
51–75	3
76–100	4

Оценка интенсивности реакции осуществлялась с применением полуколичественного метода путем градации от 0 до 3 баллов (Таблица 6).

Таблица 6 – Полуколичественная оценка интенсивности окраски

<i>Интенсивность окраски нейронов и отростков</i>	<i>Количественная оценка (в баллах)</i>
Отсутствует	0
Слабовыраженная	1
Выраженная	2
Интенсивная	3

Данная методика оценки полученных ИГХ результатов была предложена Кононовым А. В. и соавт. (2014), при оценке ИГХ реакции при исследовании гастробиоптатов [6].

Статистическая обработка данных проводилась с помощью программ Microsoft Office Excel 2007, Minitab Statistical Software 18. Для оценки связи между показателями использовали Chi-Square Test for associations. Критический уровень значимости при проверке гипотез $p = 0,05$.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Судебно-медицинская оценка и статистический анализ случаев смерти от травмы головного мозга

Для полноценного исследования и сравнения были созданы две группы: первая включает случаи травмы головного мозга, в том числе с диагнозом "ДАП", количеством 59 и вторая - случаи смерти, не связанные с черепно-мозговой травмой, количеством 58.

В первую группу вошло 59 случаев, возрастом от 17 до 88 лет, 42 мужчины и 17 женщин, более подробный анализ представлен в Таблице 7.

Таблица 7 – Распределение случаев травмы по возрасту и полу

<i>Возрастной период</i>	<i>Возраст</i>	<i>Количество</i>	<i>Мужчин (%)</i>	<i>Женщин (%)</i>
Юность, 0	До 21	3 (5%)	3 (100%)	0
Молодость, 1	22–35	16 (27%)	10 (62,5%)	6, 37,5%
Зрелость, 2	36–60	21 (36%)	18 (86%)	3, 14%
Пожилой, 3	61–75	12 (20%)	8 (67%)	4, 33%
Старческий, 4	76–89	7 (12%)	4 (57%)	3, 43%
Итого:		59	43 (73%)	16, 27%

Для удобства анализа показателей их распределили в группы (классификация АПН СССР): было выделено 5 возрастных групп: 0 – юность (до 20 лет мужчины, до 21 – женщины), 1 – молодость (20-35, 21-35), 2 – зрелость (36-60), 3 – пожилой возраст (61-75), 4 – старческий возраст (76-89).

Случаям с мужчинами присвоена группа 1, женщинам – 2.

Применялись следующие критерии оценки количества окрашенных структур: 0 – нет окраски, 1 – 1-25% окрашенных структур, 2 – 26-50%, 3 – 51-75%, 4 – 76-100%.

Интенсивность экспрессии антигена разделена на: 0 – отсутствие экспрессии, 1 – слабовыраженная экспрессия антигена, 2 – выраженная экспрессия антигена, 3 – интенсивная экспрессия.

Время выживаемости после травмы или острого события до смерти разделено также на группы: 1 – до 3 часов, 2 – до суток, 3 – до 14 суток, 4 – более 14 суток.

Соотношение по полу составило 43 мужчины (73%) и 16 женщин (27%).
Случаев юного возраста наблюдалось 3 (5%), все мужчины. Молодого возраста было 16 человек (27%), из них 10 мужчин (62,5%) и 6 женщин (37,5%). К зрелому возрасту относится 21 человек (36%), 18 мужчин (86%) и 3 женщины (14%). Пожилого возраста было 12 человек (20%), 8 мужчин (67%) и 4 (33%) женщины. 7 человек (12%), принадлежали старческому возрасту, 4 (57%) мужчины и 3 (43%) женщины.

Таким образом, в данной группе преобладают мужчины - 73%, по группам возраста распределение произошло следующим образом: зрелость – 36%, молодость – 27%, пожилой период – 20%.

Далее проведен анализ по выявленной экспрессии антигена, зависимости от % и интенсивности экспрессии антигена тел нейронов и их отростков (от 0 до 3), результат приведен в Таблице 8.

Таблица 8 – Результаты оценки экспрессии β -APP белка в поле зрения у мужчин и женщин

<i>Количество выявленных окрашенных структур, %</i>	<i>Количество; %</i>	<i>Мужчин; %</i>	<i>Женщин; %</i>
0	3; 5%	2; 67%	1; 33%
1–25	30; 51%	20; 67%	10; 33%
26–50	15; 25%	13; 87%	2; 13%
51–75	10; 17%	8; 80%	2; 20%
76–100	1; 2%	0	1; 100%
Итого:	59	43; 73%	16; 27%

Реакция на β -APP белок была отрицательной в 3 случаях (5%), процент количества окрашенных структур распределился следующим образом: максимальное количество случаев – 30 (51%) пришлось на случаи с окраской до 25%, из них мужчин 20 (67%), женщин 10 (33%). Затем 15 случаев (25%) с окраской от 26 до

50%, из них 13 (87%) мужчин и 2 (13%) женщины. 10 случаев (17%) окрашенных структур от 51 до 75%, из них 8 (80%) мужчин, 2 (20%) женщины, 1 случай (2%) был с окраской более 76%, женщина.

Таблица 9 – Полуколичественный метод оценки окрашенных структур в различных возрастных периодах

Количество окрашенных структур / возрастной период		1	2	3	4	Итого
0	0	0	2, 67%	1, 33%	0	3, 5%
1–25	0	13, 43%	8, 27%	5, 17%	4, 13%	30, 51%
26–50	2, 14%	2, 14%	5, 33%	5, 33%	1, 6%	15, 25%
51–75	1, 10%	1, 10%	6, 60%	1, 10%	1, 10%	10, 17%
76–100					1, 100%	1, 2%
Итого:	4, 7%	16, 27%	21, 36%	12, 20%	7, 10%	59

Также был проведен количественный анализ случаев по интенсивности окраски и количеству выявленных окрашенных структур, Таблица 10.

Таблица 10 – Количественный анализ интенсивности и количества выявленных окрашенных структур

Количество выявленных окрашенных структур	Интенсивность (баллы)				Итого
	0	1	2	3	
0	3; 100%	0	0	0	3; 5%
1–25	0	3; 43%	7; 24%	10; 33%	30; 51%
26–50	0	0	8; 53%	7; 47%	15; 25%
51–75	0	0	5; 50%	5; 50%	10; 17%
76–100	0	0	1; 100%	0	1; 2%
Итого	3; 5%	13; 22%	21; 36%	22; 37%	59

Наибольшее количество случаев было с количеством выявленных структур с экспрессией антигена от 1 до 25%, 30 (51%), из них экспрессия антигена слабой интенсивности (1 балл) – 13 случаев (43%), выраженной интенсивности (2 балла) – 7 (24%), интенсивной (3 балла) – 10 (33%).

15 случаев, 25% - экспрессия антигена в поле зрения от 26 до 50%, результаты распределились практически поровну между выраженной степенью интенсивности (2 балла) и интенсивной окраской (3 балла), 8 (53%) и 7 (47%) соответственно. Из 10 случаев (17%) результаты поровну распределились по 5 случаев (50%) между выраженной (2 балла) и интенсивной (3 балла) экспрессией. Выявлен 1 случай (2%) окраски морфологических структур от 76 до 100%, отнесен к выраженной интенсивности окраски (2 балла).

Далее был проведен анализ выживаемости и количества структур, проявивших экспрессию антигена, Таблица 11.

Среди случаев с отсутствием окраски 2 (67%) случая пришлось на 4 группу выживаемости, 1 (33%) – на 2-ю. В случаях окраски до 25% 16 (53%) пришлось на первую группу выживаемости, 9 (30%) на 3 группу, 5 (17%) – на 4. В 3-ю группу окраски максимальное количество случаев – 8 (53%) пришлось на 3-ю группу выживаемости, поровну – 3 (20%) на 1-ю и 2-ю группы, 1 (7%) – на 4-ю группу выживаемости. В 4-ю группу 5 (50%) пришлось на 3-ю группу выживаемости, 3 (30%) на первую и 2 (20%) – на вторую группу выживаемости. 1 случай (100%) пришелся на количество выявленных окрашенных структур более 76%, 4 группы выживаемости (Таблица 11).

Таблица 11 – Анализ выживаемости и количества окрашенных структур

Количество окрашенных структур, %	Выживаемость				
	1	2	3	4	Итого
1, 0	0	1; 33%	0	2; 67%	3; 5%
2, 1–25%	16; 53%	0	9; 30%	5; 17%	30; 51%
3, 26–50%	3; 20%	3; 20%	8; 53%	1; 7%	15; 25%
4, 51–75%	3; 30%	2; 20%	5; 50%	0	10; 17%
5, 76–100%	0	0	0	1; 100%	1; 2%
Итого:					59

Как видно из Рисунка 4, наибольшее количество случаев со слабовыраженной интенсивностью окраски (1 балл) пришлось на первую группу выживаемости (до 3 часов), что вполне объяснимо слишком малым временем для накопления

маркера. На 3-й период выживаемости приходится своеобразный пик (до 50%) случаев для выраженной (2 балла) и интенсивной (3 балла) окраски, меньшее количество – для слабовыраженной интенсивности окраски (1 балл). Это можно объяснить более широким временным интервалом – от 1 суток до 14, что обусловлено сохранением уровня маркера и длительным периодом его накопления.

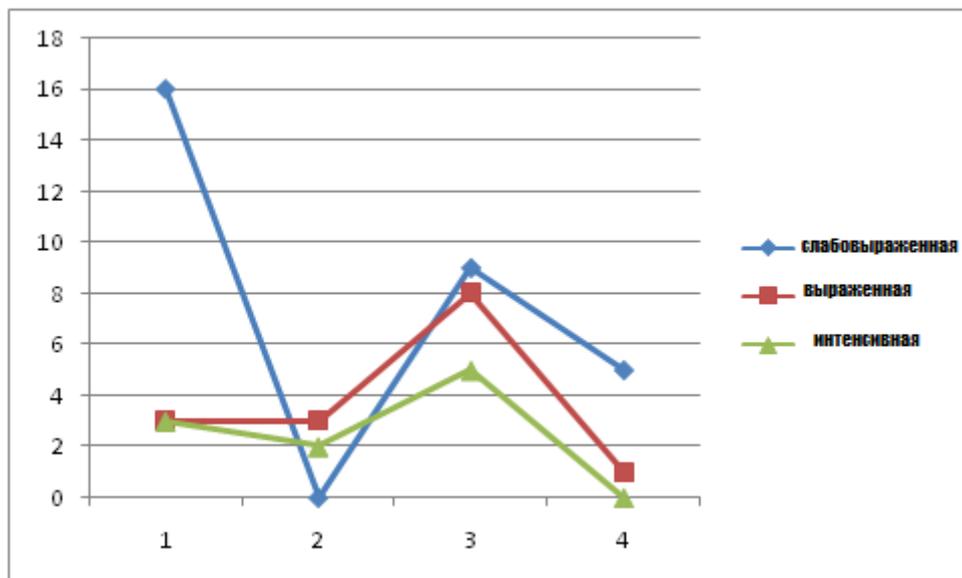


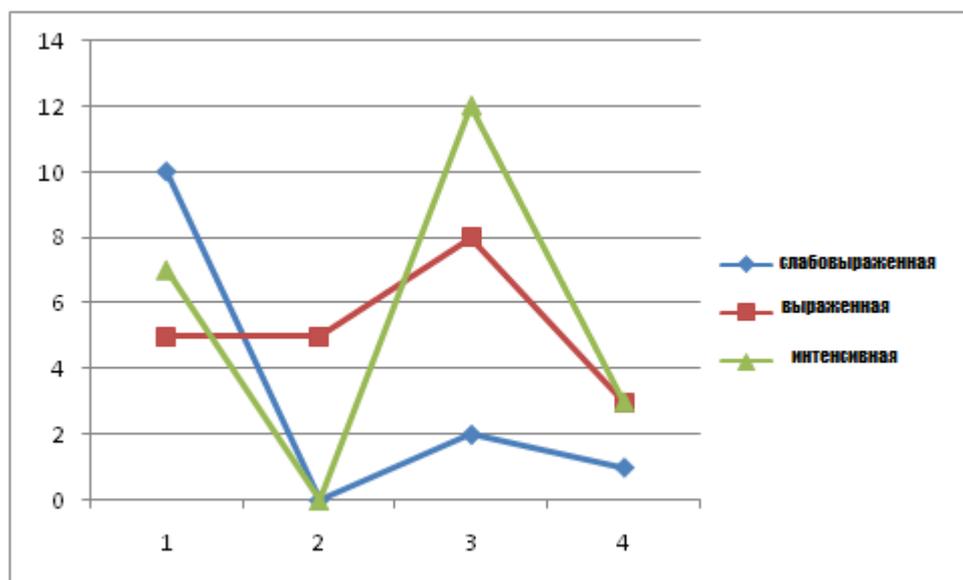
Рисунок 4 – Распределение случаев по выживаемости и интенсивности окраски

Среди случаев с отсутствием окраски 2 (67%) случая пришлось на 4 группу выживаемости, 1 (33%) – на 2-ю. Группа слабовыраженной интенсивности окраски (1 балл) распределилась следующим образом: 10 случаев (77%) – первый период выживаемости, 0 случаев – второй период, 2 (15%) – 3-й период выживания, и на 4-й пришелся 1 (8%) случай. Основная масса случаев выраженной интенсивности окраски (2 балла) – 8 (38%) пришлось на 3-ю группу выживаемости, поровну – 5 (24%) – на 1-ю и 2-ю группы, 3 (24%) случая – на 4-ю группу выживаемости. 12 случаев (55%) интенсивной окраски (3 балла) пришлось на 3-ю группу выживаемости, 7 (32%) – на 1-ю группу, 3 (24%), ни одного случая – 2-й группы (Таблица 12).

Таблица 12 – Анализ выживаемости и интенсивности окраски

Количество окрашенных структур, %	Выживаемость				
	1	2	3	4	Итого
0		1; 33%		2; 67%	3; 5%
1	10; 77%	0	2; 15%	1; 8%	13; 22%
2	5; 24%	5; 24%	8; 38%	3; 24%	21; 36%
3	7; 32%	0	12; 55%	3; 13%	22; 37%
Итого:					59

По графику общего распределения случаев с различной степенью интенсивности (Рисунок 5), определяется два пика – в 1-й и 3-й группах выживаемости. На 1-ю группу приходится наибольшее количество случаев слабовыраженной окраски (1 балл), что объяснимо малым временем накопления пептида. Пик на 3-м периоде выживаемости также обусловлен временем накопления маркера, именно в этот период 2-14 суток определяется максимальное накопление β -APP белка.

**Рисунок 5** – Распределение случаев по выживаемости интенсивности окраски

Так как для удобства обработки данных были получены дискретные величины, далее проведен корреляционный анализ, проанализированы пол, возрастные группы и период выживаемости после травмы (Рисунок А.1, Приложение А).

Вывод: $P\text{-Value} > 0,05$, поэтому пол не влияет на выживаемость, в то же время по 2 группам выживаемости имеются значения меньше 5, что делает данный анализ менее достоверным.

Укрупним группы выживаемости (Рисунок А.2, Приложение А).

Вывод: $P\text{-Value} > 0,05$, поэтому пол не влияет на выживаемость. Это подтверждается и в укрупненных группах выживаемости

Для анализа выживаемости и возрастных групп (Рисунок А.3, Приложение А), учитывая ничтожное количество в 0 возрастной группе, присоединим ее к первой и воспользуемся укрупненными группами выживаемости (Рисунок А.4, Приложение А).

Вывод: $P\text{-Value} > 0,05$, поэтому связи между возрастом и периодом выживаемости не установлено. Графический анализ также подтверждает этот вывод.

Для анализа выживаемости и количества структур, продемонстрировавших экспрессию антигена (Рисунок А.5, Приложение А) необходимо укрупнение групп в силу ничтожного количества людей с 0-й, 3-й и 4-й группой площади структур в поле зрения, проявивших экспрессию антигена. 0-ю группу присоединим к 1-й, 3-ю и 4-ю – ко 2-й (Рисунок А.6, Приложение А).

Вывод: визуально графики показывают, что чем выше группа выживаемости, тем выше группа процента структур, показавших экспрессию антигена, однако статистически это не подтверждается, т.к. $P\text{-Value} > 0,05$.

Для статистической достоверности анализа интенсивности экспрессии и выживаемости (Рисунок А.7, Приложение А) необходимо объединить 0 и 1 группу интенсивности (Рисунок А.8, Приложение А).

Вывод: $P\text{-Value} > 0,05$, выживаемость не влияет на интенсивность экспрессии, что также подтверждается графическим анализом.

Проведем анализ между количеством структур с экспрессией антигена и интенсивностью окраски (Рисунок А.9, Приложение А).

Вывод: $P\text{-Value} < 0,05$, количество структур с экспрессией антигена и интенсивность связаны между собой. Графический анализ показывает, что чем выше

интенсивность окраски, тем большее количество окрашенных структур выявляется.

3.2. Судебно-медицинская оценка и статистический анализ случаев смерти, не связанных с травмой мозга

В группу смертей, не связанных с повреждением головного мозга, вошло 58 случаев, возрастом от 17 до 88 лет, 38 мужчин и 20 женщин, более подробный анализ представлен в Таблице 13.

Возрастные периоды условно обозначены цифрами от «0» до «4».

Таблица 13 – Распределение случаев острой смерти по возрасту и полу

<i>Возрастной период</i>	<i>Возраст</i>	<i>Количество</i>	<i>Мужчин, %</i>	<i>Женщин, %</i>
Юность, 0	До 20–21	1	1, 100%	0
Молодость, 1	21–35, 20–35	10	8, 80%	2, 20%
Зрелость, 2	36–60	25	18, 72%	7, 28%
Пожилой, 3	61–75	9	8, 89%	1, 91%
Старческий, 4	76–89	13	5, 38%	8, 62%
Итого:		58	40, 69%	18, 31%

Далее проведен анализ по количеству окрашенных структур, в зависимости от процента окраски и интенсивности окраски тел нейронов и их отростков (от 0 до 3), результаты приведены в Таблице 14.

Таблица 14 – Полуколичественный метод оценки количества окрашенных структур, %, в случаях смерти, не связанных с травмой головного мозга

<i>Количество окрашенных структур, %</i>	<i>Количество, %</i>	<i>Мужчин, %</i>	<i>Женщин, %</i>
0	40, 69%	26, 65%	14, 35%
1–25	15	12, 80%	3, 20%
25–50	3	2, 67%	1, 33%
51–75	0		
76–100	0		
Итого:	58	40, 69%	18, 31%

Таблица 15 – Полуколичественный метод оценки количества окрашенных структур в группе сравнения

Возрастной период		Степень окраски				Итого
		1	2	3	4	
0	0	7, 18%	19, 47%	6, 15%	8, 20%	40, 69%
1–25	1, 7%	3, 20%	6, 40%	3, 20%	2, 13%	15, 26%
25–50					3, 100%	3, 5%
51–75						0
76–100						0
Итого:						58

Также был проведен количественный анализ случаев по интенсивности окраски и количеству окрашенных структур, Таблица 16.

Таблица 16 – Количественный анализ интенсивности и количества окрашенных структур, %, в группе сравнения

Интенсивность (баллы)	Количество окрашенных структур, %				Итого
	0	1	2	3	
0	40	0	0	0	40, 69%
1–25	0	5, 33%	2, 13%	8, 54%	15, 26%
26–50	0	0	0	3, 100%	3, 5%
51–75	0	0	0	0	0
76–100	0	0	0	0	0
Итого:	40, 69%	5, 9%	2, 3%	11, 19%	58

Далее был проведен анализ выживаемости и интенсивности окраски (Таблица 17).

Среди случаев с отсутствием окраски 37 (92,5%) случаев пришлось на 1-ю группу выживаемости, 2 (5%) – на 3-ю и 1 случай (2,5%) – на 4-ю.

В случаях окраски до 25% 14 (93%) пришлось на первую группу выживаемости, 1 (7%) на 3-ю группу. В 3-й группе окраски все случаи – 3 (100%) пришлось на 1-ю группу выживаемости.

Таблица 17 – Анализ выживаемости и количества окрашенных структур, %, в группе сравнения

<i>Выживаемость</i>	<i>Количество окрашенных структур, %</i>				
	1	2	3	4	Итого
1, 0	37, 92,5%	0	2, 5%	1, 2,5%	40, 69%
2, 1–25%	14, 93%	0	1, 7%	0	15, 26%
3, 26–50%	3, 100%	0	0	0	3, 5%
4, 51–75%					0
5, 76–100%					0
Итого:					58

Таблица 18 – Анализ выживаемости и интенсивности окраски в группе сравнения

<i>Выживаемость</i>	<i>Интенсивность окраски (баллы)</i>				
	1	2	3	4	Итого
0	37, 92,5%	0	2, 5%	1, 2,5%	40, 69%
1	4, 80%	0	1, 20%	0	5
2	2, 100%	0	0	0	2
3	11, 100%	0	0	0	11
Итого:					58

Среди случаев с отсутствием окраски 37 (92,5%) случаев пришлось на 1-ю группу выживаемости, 2 (5%) – на 3-ю и 1 случай (2,5%) – на 4-ю. Основная масса всех остальных случаев относилась к первому периоду выживаемости: 4 (80%) слабовыраженной интенсивности окраски (1 балл), 2 (100%) выраженной интенсивности окраски (2 балла) и 11 (100%) интенсивной окраски (3 балла).

Для установления зависимости во второй группе недостаточно случаев с положительной реакцией на β -APP белок. Выборка представлена 18 записями, 17 из которых относятся к 1-й группе выживаемости, поэтому дополнительный анализ влияния факторов на группу выживаемости нецелесообразен. Оценим взаимное влияние количества окрашенных структур и интенсивности окраски (Рисунок А.10, Приложение А).

Вывод: У второй группы, как и у первой, статистически не подтверждено влияние на группы выживаемости ни одного из факторов. Разница в причинах:

если у первой группы отсутствие влияния удалось подтвердить статистически, то по второй группе это невозможно сделать в силу ничтожной выборки и доминирования в ней выживаемости 1-й группы. По аналогичным причинам не подтверждена взаимосвязь количества окрашенных структур и интенсивности окрашивания.

Глава 4. МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЕЩЕСТВА МОЗГА

4.1. Морфологическое исследование вещества мозга в случаях смерти, связанных с черепно-мозговой травмой

4.1.1. Судебно-медицинская макроскопическая характеристика ДАП

«При исследовании трупов морфологические проявления ЧМТ были минимальными, макроскопически оболочки и головной мозг выглядели практически неизменными, и на вскрытии нельзя было определить ни причину смерти, ни тяжелую клиническую симптоматику» [16] (Рисунок 6, Рисунок 7). «В случае смерти пострадавших в течение первых 3 суток после травмы определялось набухание ткани головного мозга с гиперемией мягких мозговых оболочек. Морфологическими маркерами ДАП являются мелкоочаговые или очаговые некрозы геморрагического характера (в некоторых случаях кровоизлияния) в мозолистом теле. В дальнейшем при переживании травмы формируются бурые кисты в зонах повреждения» [16].



Рисунок 6 – Головной мозг без макроскопических изменений.
Судебно-медицинский диагноз: ДТП



Рисунок 7 – Головной мозг при вскрытии по Вирхову без видимых макроскопических изменений. Судебно-медицинский диагноз: ДТП

4.1.2. Судебно-медицинская характеристика гистологических изменений вещества мозга при ДАП, окраска гематоксилином и эозином

«Степень изменения структур зависит от тяжести травмы и сроков выживаемости. W. Maxwell и соавторы отмечали интактность глиально-аксональных стыков в пределах одного часа после травмы. Спустя 3-4 часа структуры глиально-аксональных стыков исчезали, а через 6 часов после травмы миелиновые пластины отделялись от аксональных остатков. Миелиновые дислокации (частично свободные участки отсутствовали до 1 часа переживания травмы и были выраженными спустя 5 часов» [123]

В первые 3 суток в зонах повреждения белого вещества обнаруживаются множественные аксональные шары – морфологический субстрат ДАП [33–38; 159]. Аксональные шары можно обнаружить уже через 6–12 часов после травмы: на гистологических препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, они выглядят в виде эозинофильных округлых образований с нечеткими контурами. «При переживании травмы более 2 недель наблюдали уменьшение, а к концу 1 месяца – полное исчезновение аксональных шаров.

Вблизи аксональных шаров аксоны имели признаки начальной дегенерации, были неровными, набухшими, неравномерно воспринимали окраску. К концу первой недели дегенеративные изменения распространялись по всей длине поврежденного аксона. Нервные волокна имели извитой вид, варикозные утолще-

ния, фрагментировались на участки различной длины. Исследования нейроцитов не выявили структурных изменений.

На протяжении 2 недели после травмы, помимо описанных изменений, выявляли признаки вторичной дегенерации белого вещества (неповрежденные в момент травмы аксоны) вблизи места разрыва. В местах первичных разрывов аксонов отмечалась очаговая макрофагальная реакция с формированием зернистых шаров» [16].

При окраске гематоксилином и эозином не наблюдается специфических изменений (Рисунок 8), характерных для аксонального повреждения. При исследовании материала данной окраски выявлены следующие изменения: отек вещества головного мозга, полнокровие сосудов, набухание нейронов, гиперхромия и увеличение ядер нейронов, исчезновение ядрышек, что не является специфическими изменениями. В единичных препаратах обнаружены структуры, напоминающие аксональные шары (Рисунок 8), мелкие диапедезные кровоизлияния.

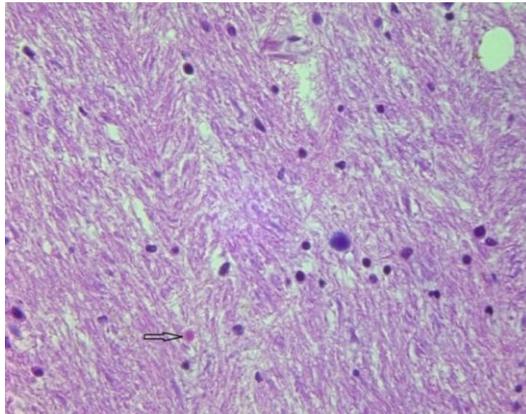


Рисунок 8 – Аксональный шар в стволе головного мозга. 2 сутки после травмы. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 400

При выживаемости после травмы до 3 часов отмечались кровоизлияния в мягкие мозговые оболочки, полнокровие артерий, вен, капилляров, отек вещества головного мозга (Рисунок 9), отек и разволокнение аксонов, их фрагментация (Рисунок 10).

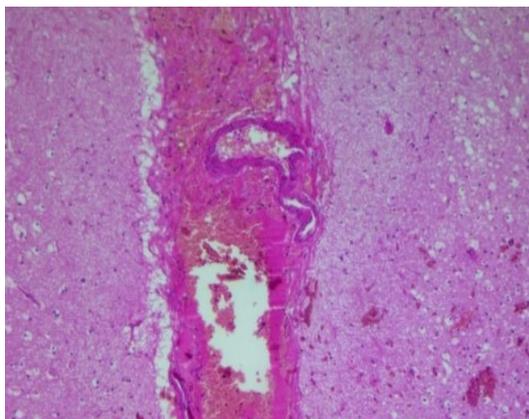


Рисунок 9 – Белое вещество, выживаемость после травмы до 3 часов. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 200.

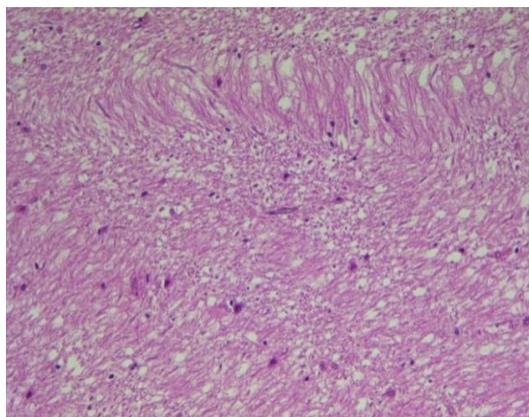


Рисунок 10 – Белое вещество головного мозга, выживаемость после травмы до 3 часов. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 200

При выживаемости после травмы до 24 часов в срезах головного мозга были видны мелкоочаговые кровоизлияния из неизмененных эритроцитов (Рисунок 11), перичеллюлярный и периваскулярный отек, множественные диапедезные кровоизлияния, полнокровие артериол (Рисунок 12).

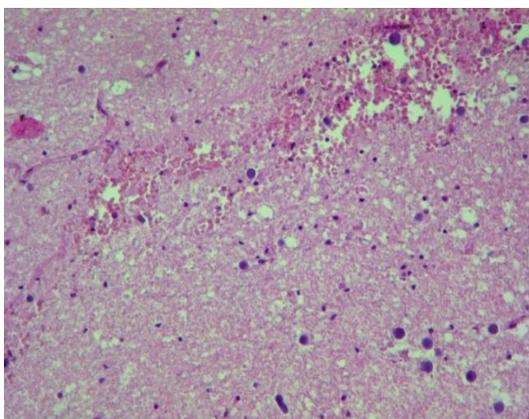


Рисунок 11 – Внутренняя капсула, выживаемость после травмы 24 часа. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 200

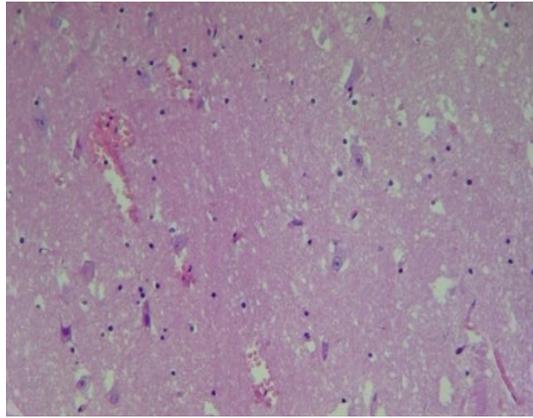


Рисунок 12 – Белое вещество головного мозга, выживаемость после травмы 24 часа. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 200

При давности повреждения около 36 суток наблюдалась глиально-мезенхимальная пролиферация, перичеселлюлярный отек вещества головного мозга (Рисунок 13).

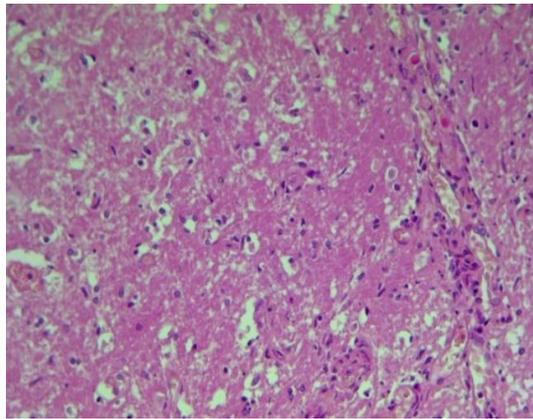


Рисунок 13 – Подкорковая область, выживаемость после травмы 36 суток. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 200

4.1.3. Иммуногистохимическое исследование ткани головного мозга при черепно-мозговой травме (ЧМТ)

Как было описано выше, наиболее чувствительным методом диагностики аксонального повреждения является иммуногистохимическое исследование, которое выявляет накопление белков-маркеров даже в тех случаях, когда окраска гематоксилином-эозином не выявляет признаков поражения аксонов или они минимальны (Рисунок 14).

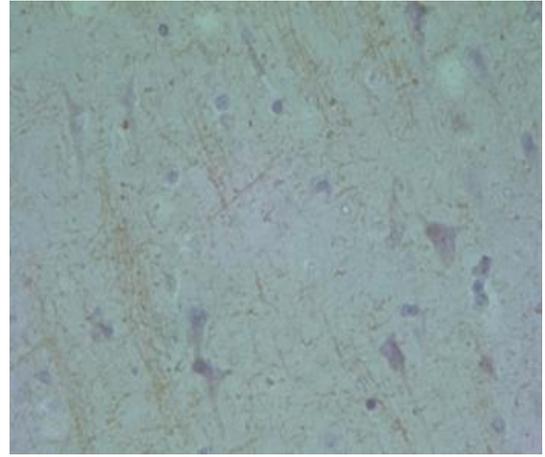
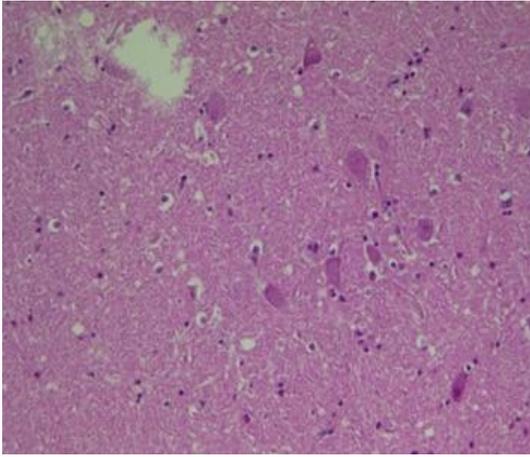


Рисунок 14 – Ствол головного мозга, выживаемость после травмы до 3 часов. Окраска гематоксилином-эозином и экспрессия β -APP белка. Увеличение 200

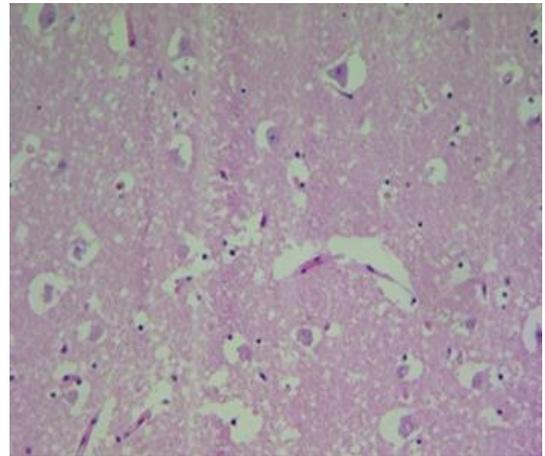
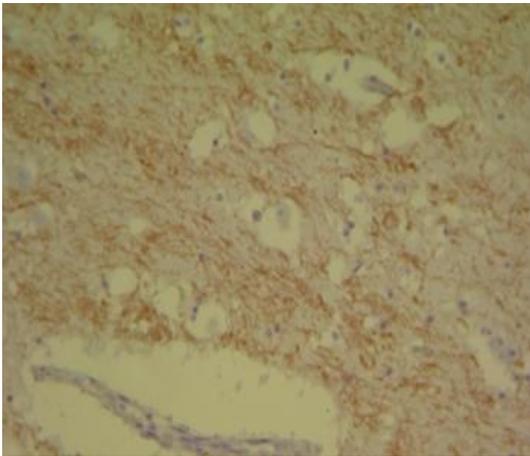


Рисунок 15 – Ствол головного мозга, выживаемость после травмы 1-е сутки. Окраска гематоксилином-эозином и экспрессия β -APP белка. Увеличение 200

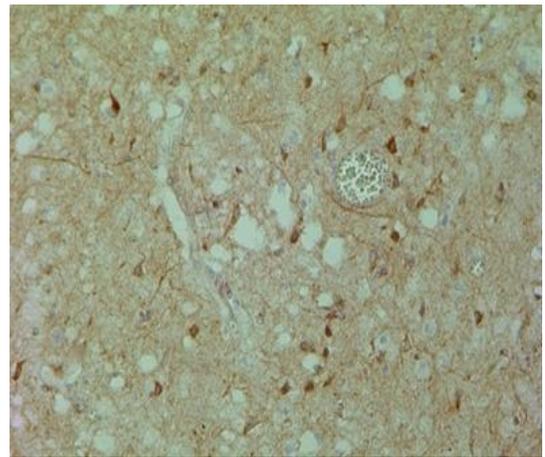
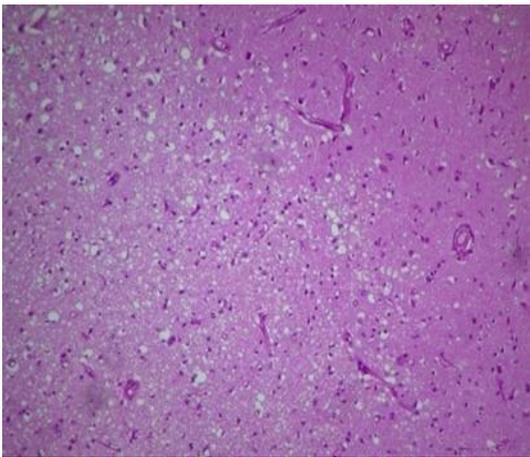


Рисунок 16 – Белое вещество головного мозга, выживаемость после травмы 6 суток. Окраска гематоксилином-эозином и экспрессия β -APP белка. Увеличение 100, 200

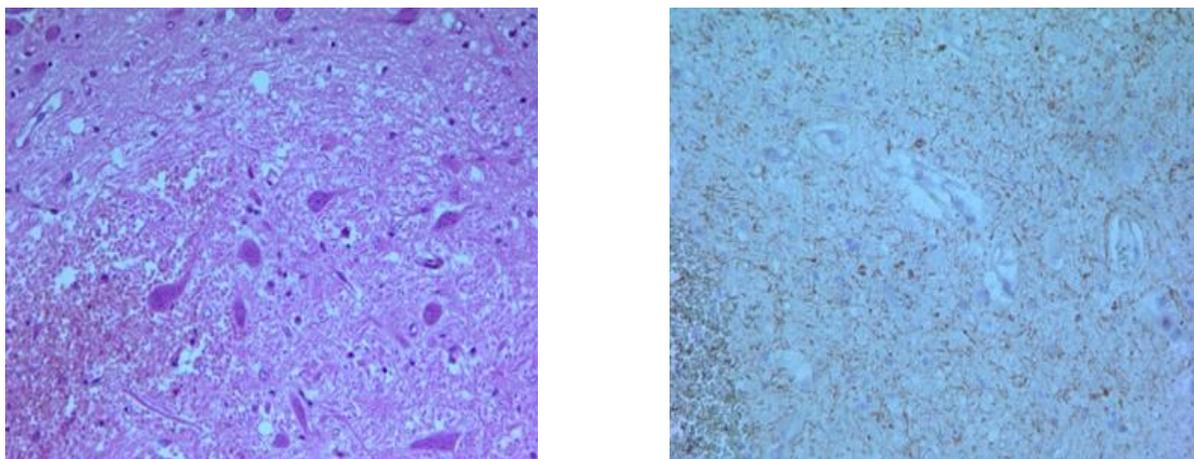


Рисунок 17 – Ствол головного мозга, выживаемость после травмы 36 суток. Окраска гематоксилином-эозином и экспрессия β -APP белка. Увеличение 200

В литературе описана динамика накопления β -APP протеина в ткани мозга, пропорционально сроку выживания после травмы [50; 79; 156]. Первые признаки начинают обнаруживаться в течение 3 часов после острого события, которым может быть как травма мозга, так и состояние, приводящее к нарушению кровообращения. Далее количество накопленного маркера и, соответственно, положительно окрашенных нейронов увеличивается и достигает максимума в течение 24 часов. На этом уровне β -APP белок сохраняется и легко распознается в сроке выживания до 10–14 дней. После этого периода интенсивность окрашивания уменьшается и может отсутствовать через 3–4 недели, или может обнаруживаться гранулированное окрашивание в структуре аксона при исследовании на мощном увеличении. Именно благодаря такой динамике накопления и деградации β -APP белка в теле и отростках нейронов и разделили группы исследуемых. Были выделены следующие группы:

- 1) острая смерть, до 3 часов, когда появляются первые признаки положительной реакции на маркер;
- 2) суточная выживаемость, время, в течение которого окраска достигает максимального уровня;
- 3) от 1 до 14 суток, период, когда уровень окраски сохраняется на максимальном, стабильном уровне;
- 4) период деградации β -APP пептида, который начинается с 14-го дня периода выживания от острого состояния.

Мы рассмотрели достоверную связь между количеством окрашенных структур и интенсивностью окраски в предыдущей главе, теперь рассмотрим по количеству случаев (Таблица 19).

Все случаи 13 (100%) слабовыраженной окраски (1 балл) относились к низкой доле (количеству) окрашенных структур – 1–25%, выраженной интенсивности окраски (2 балла): 7 (33%) – 1–25%, 8 (38%) – 26–50%, 5 (24%) – 51–75%, и 1 случай (5%) – 76–100% окраски поля зрения. Случаи интенсивной окраски (3 балла) распределились следующим образом: 10 (45%) – 1–25%, 7 (32%) – 26–50% и 5 случаев (23%) – 51–75%, группа окраски более 76% отсутствовала.

Таблица 19 – Количественный анализ интенсивности и доли (количества) окрашенных структур, %

Доля окрашенных структур, %	Интенсивность (баллы)			Итого
	1	2	3	
1–25	13; 100%	7; 33%	10; 45%	30; 51%
26–50	0	8; 38%	7; 32%	15; 25%
51–75	0	5; 24%	5; 23%	10; 17%
76–100	0	1; 5%	0	1; 2%
Итого:	13; 100%	21; 100%	22; 100%	56

Анализ распределения показывает, что количество структур с экспрессией антигена следует учитывать во вторую очередь, а большее внимание уделять интенсивности окраски нейронов или их отростков. Также следует учесть тот факт, что случаи со слабовыраженной интенсивностью экспрессии всегда охватывали не более 25% поля зрения. Можно предположить, что степень интенсивности зависит от степени предсуществующего внутриаксонального транспорта β -APP белка или локальной степени его выработки, что может зависеть от состояния метаболизма индивида или функциональной нагрузки на эти нейроны.

Следующая таблица показывает взаимоотношение выживаемости после травмы мозга и интенсивностью реакции на маркер (Таблица 20).

Таблица 20 – Анализ выживаемости и интенсивности экспрессии антигена

Интенсивность окраски (баллы)	Выживаемость				Итого
	1	2	3	4	

1	10; 45%	0	2; 9%	1; 14%	13; 22%
2	5; 23%	5; 100%	8; 36%	3; 43%	21; 36%
3	7; 32%	0	12; 55%	3; 43%	22; 37%
Итого:	22; 39%	5; 9%	22; 39%	7; 13%	56

В группе выживаемости до 3 часов основное количество – 10 (45%) были со слабовыраженной интенсивностью экспрессии антигена (1 балл), 7 (32%) – интенсивной экспрессии (3 балла) и 5 (23%) – выраженной интенсивности (2 балла). Группа досуточной выживаемости – 5 (100%) вся была представлена случаями выраженной интенсивности экспрессии антигена (2 балла). Группа 2-14 суток в основной массе – 12 (55%) представлена интенсивной экспрессией (3 балла), 8 (36%) - случаями выраженной интенсивности (2 балла) и 2 (9%) – слабовыраженной интенсивности экспрессии (1 балл). Группа выживаемости более 15 суток распределилась следующим образом: поровну 3 (43%) – в группах выраженной (2 балла) и интенсивной реакции (3 балла), 1 (14%) – слабовыраженная экспрессии (1 балл). Это распределение подтверждает исследования, полученные ранее.

4.1.4. Иммуногистохимическое исследование ткани головного мозга при ЧМТ, срок выживаемости до 3 часов

Наибольший клинический интерес в практике судебно-медицинского эксперта вызывают случаи острой смерти, особенно без морфологических признаков какой-либо патологии или повреждения, поэтому подробно рассмотрим микрофотографии случаев первой группы выживаемости, с начальными признаками накопления β -APP белка (Рисунки 18–26).

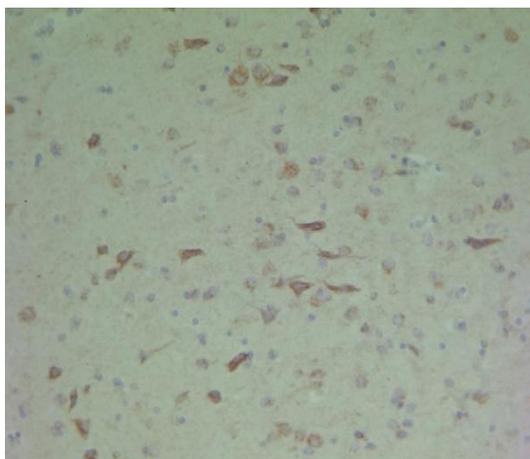


Рисунок 18 – Белое вещество мозга, выживаемость после травмы до 3 часов.
Экспрессия β -APP белка в цитоплазме нейронов Увеличение 200

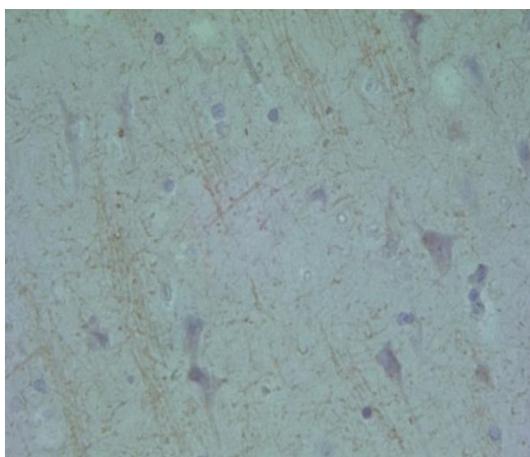


Рисунок 19 – Белое вещество мозга, выживаемость после травмы до 3 часов.
ИГХ реакция на β -APP белок, слабо выраженная экспрессия. Увеличение 200

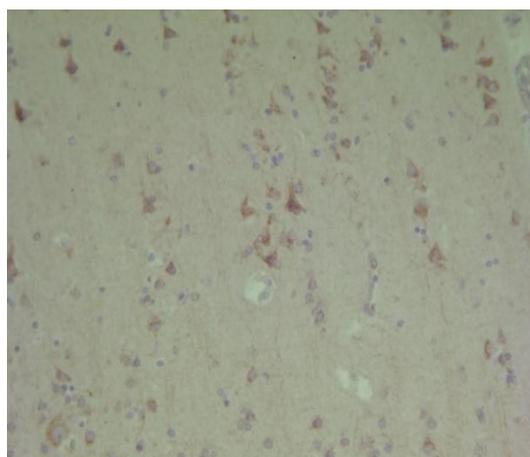


Рисунок 20 – Белое вещество мозга, выживаемость после травмы до 3 часов.
ИГХ реакция на β -APP белок. Увеличение 200

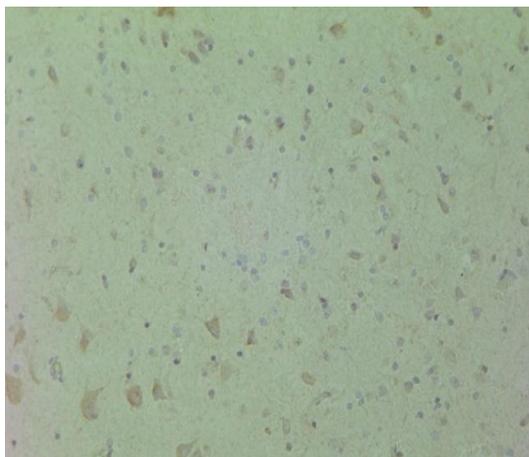


Рисунок 21 – Белое вещество мозга, выживаемость после травмы до 3 часов. ИГХ реакция на β -APP белок. Увеличение 200

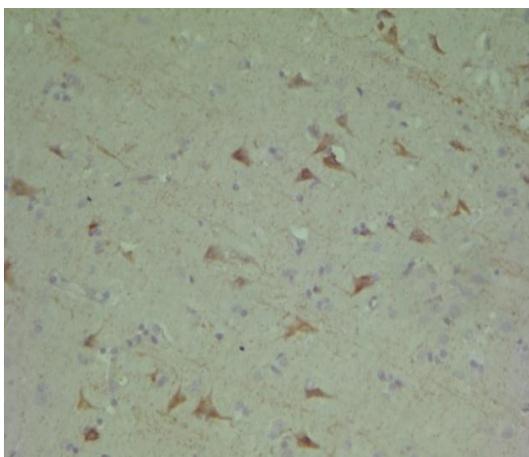


Рисунок 22 – Белое вещество мозга, выживаемость после травмы до 3 часов. ИГХ реакция на β -APP белок. Увеличение 200

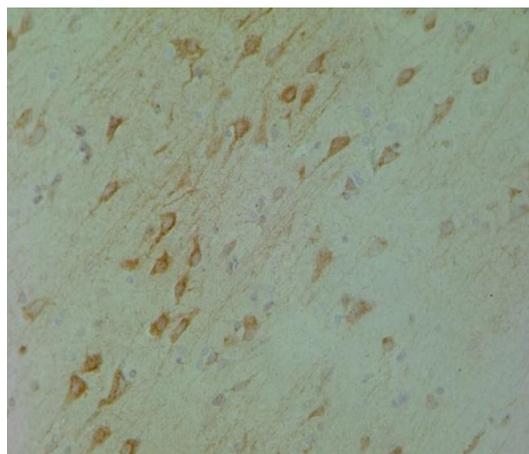


Рисунок 23 – Белое вещество мозга, выживаемость после травмы до 3 часов. ИГХ реакция на β -APP белок. Увеличение 200

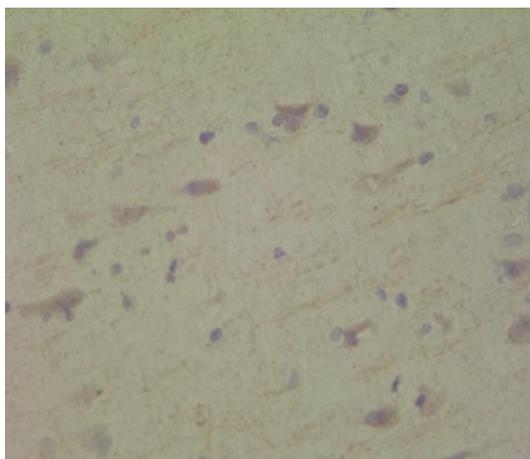


Рисунок 24. Белое вещество мозга, выживаемость после травмы до 3 часов. ИГХ реакция на β -APP белок. Увеличение 200



Рисунок 25. Внутренняя капсула, выживаемость после травмы до 3 часов. ИГХ реакция на β -APP белок. Увеличение 200

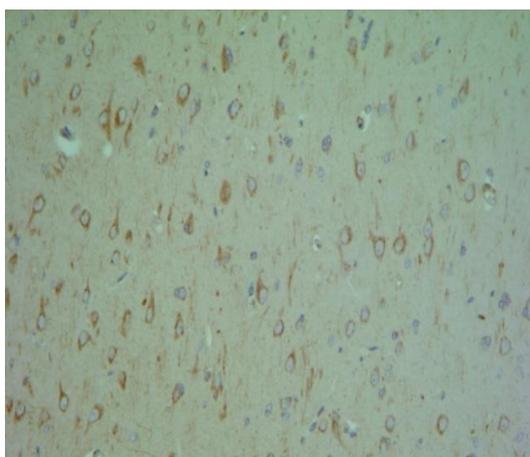


Рисунок 26 – Белое вещество мозга, выживаемость после травмы до 3 часов. ИГХ реакция на β -APP белок. Увеличение 200

Данная группа выживаемости характеризуется периодом от травмы до смерти не более 3 часов, периодом начального проявления положительной реакции на маркер. Поэтому большинство случаев этой группы представлена слабовыраженной

экспрессией антигена (1 балл) преимущественно тел нейронов и незначительной степенью окраски отростков, реакция начинает переходить с тела нейрона на отростки, количеством структур с экспрессией до 25%. Достоверно установлена связь интенсивности и количеством структур, проявивших экспрессию антигена. Случаи этой группы, как правило, относятся к первым группам по интенсивности экспрессии (слабовыраженная – 1 балл) и количеству выявленных структур с экспрессией (1–25%). Однако и в этой группе может проявиться интенсивная реакция (3 балла) (Рисунки 27, 28), но с преимущественной экспрессией антигена тел нейронов и начальными признаками реакции отростков, количество прореагировавших структур не будет обширным, как и в случаях слабовыраженной интенсивности реакции.



Рисунок 27 – Белое вещество мозга, выживаемость после травмы до 3 часов. ИГХ реакция на β -APP белок. Увеличение 200

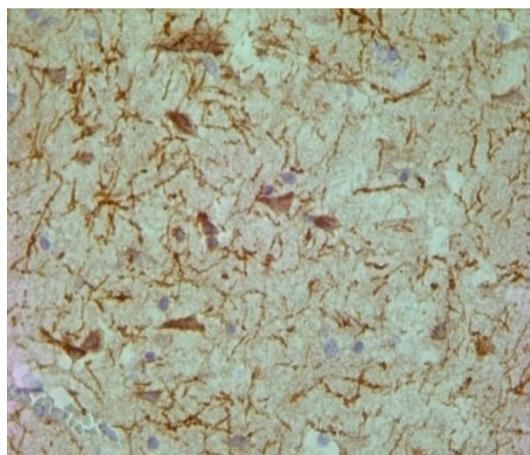


Рисунок 28 – Белое вещество мозга, выживаемость после травмы до 3 часов. ИГХ реакция на β -APP белок. Увеличение 200

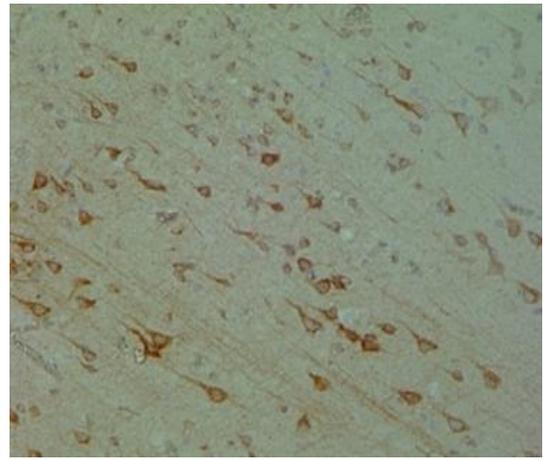
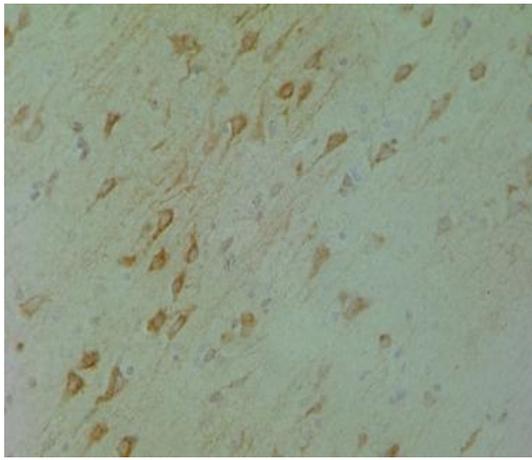


Рисунок 29 – Белое вещество мозга, мост и продолговатый мозг, выживаемость после травмы до 3 часов. ИГХ реакция на β -APP белок. Увеличение 200

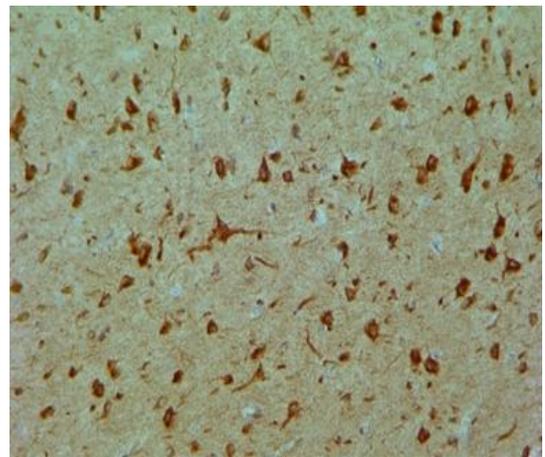
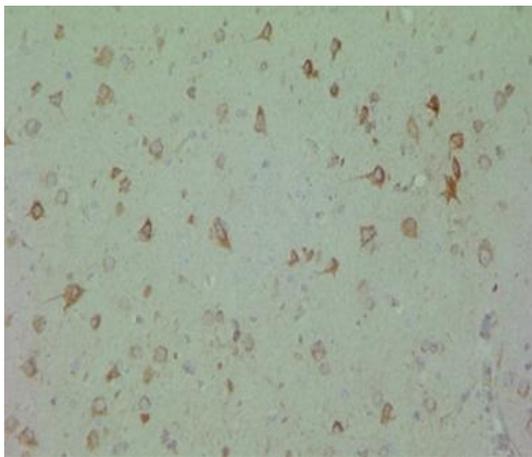
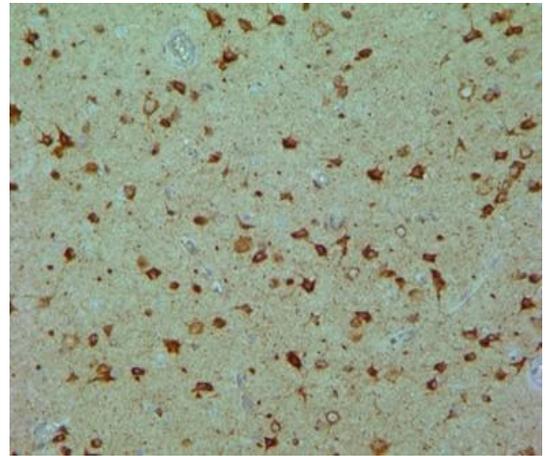
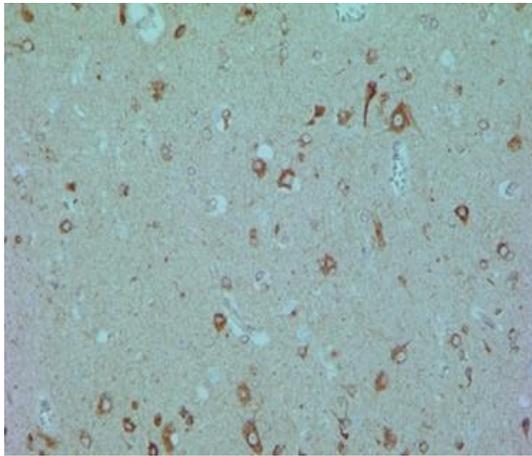


Рисунок 30 – Белое вещество мозга, мост и продолговатый мозг, выживаемость после травмы до 3 часов. ИГХ реакция на β -APP белок. Увеличение 200

Резюме: большинство случаев группы выживаемости после травмы до 3-х часов представлена слабой экспрессией белка β -APP преимущественно в телах нейронов и в незначительной степени в отростках, то есть белок начинает распространяться с тела нейрона на отростки, с количеством прореагировавших струк-

тур до 25%. Достоверно установлена связь интенсивности и количеством структур с экспрессией антигена. Случаи этой группы, как правило, проявляли слабо-выраженную интенсивность экспрессии антигена (1 балл) и незначительное количество прореагировавших структур (до 25%).

4.1.5. Иммуногистохимическое исследование ткани головного мозга при травме мозга, срок выживаемости до 1 суток

В данный временной период происходит увеличение уровня накопления β -APP белка, поэтому может быть представлен случаями любой интенсивности экспрессии антигена, но в нашем исследовании – только выраженной интенсивностью (2 балла) (Рисунки 31–33).

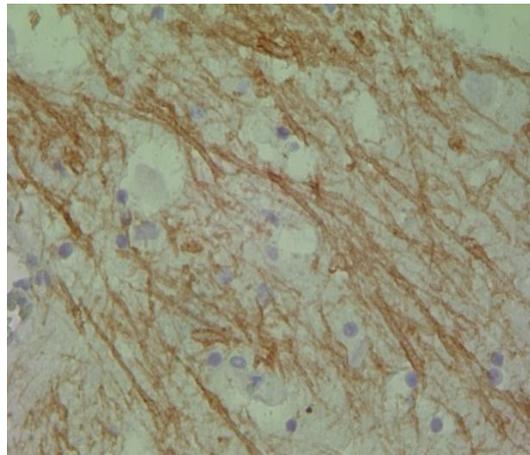


Рисунок 31 – Белое вещество мозга, выживание после травмы 1 сутки. ИГХ реакция на β -APP белок. Увеличение 400

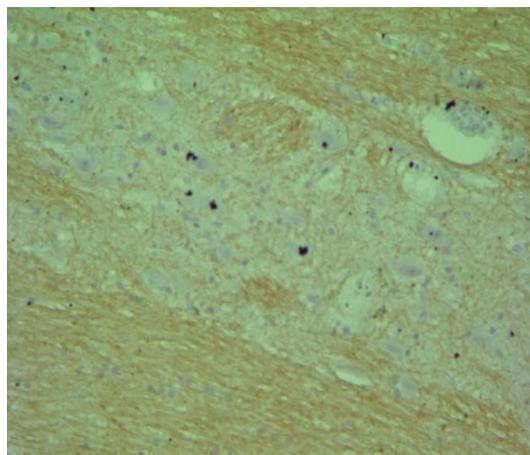


Рисунок 32 – Белое вещество мозга, выживание после травмы 1 сутки. ИГХ реакция на β -APP белок. Увеличение 200

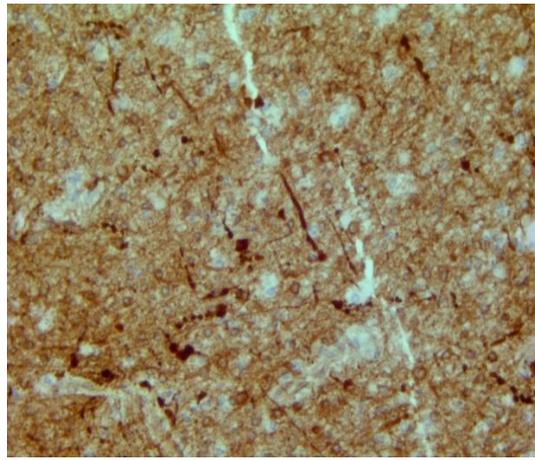


Рисунок 33 – Белое вещество мозга, выживание после травмы 1 сутки. ИГХ реакция на β -APP белок. Увеличение 200

В одном случае также может наблюдаться тенденция к различной картине положительной реакции (Рисунок 34).

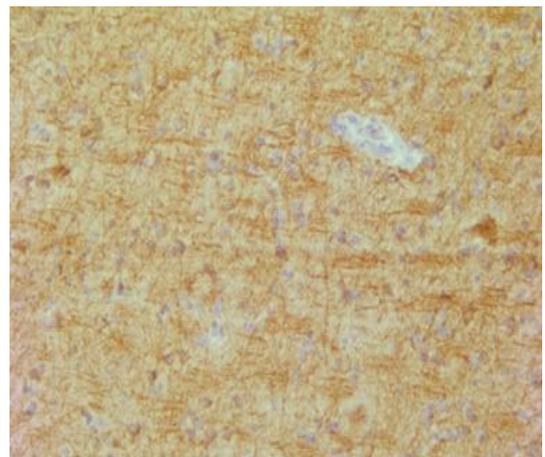
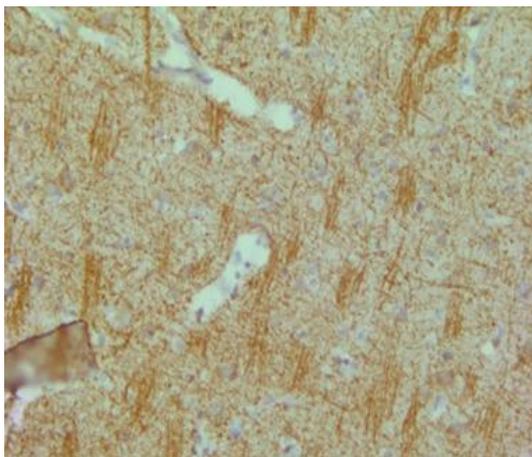
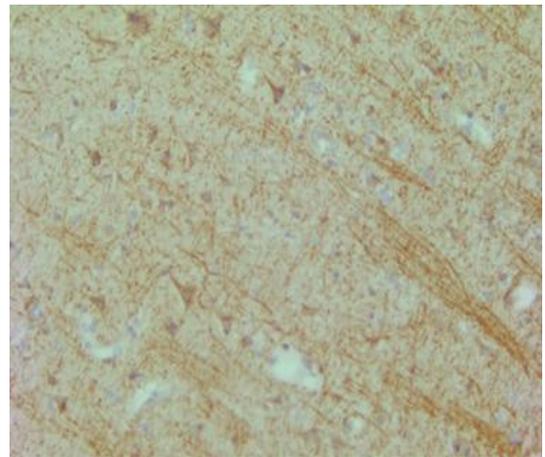
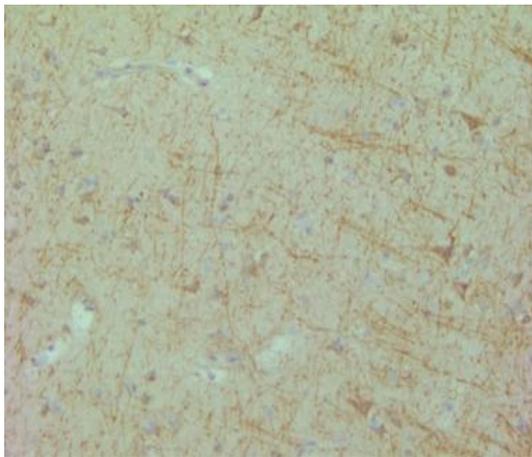


Рисунок 34 – Белое вещество мозга, мозолистое тело, выживание после травмы 1 сутки. ИГХ реакция на β -APP белок. Увеличение 200

Резюме: второй период - суточной выживаемости после травмы мозга - характеризуется нарастанием уровня β -APP белка до максимальных значений; слу-

чаи характеризуются уже тотальной экспрессией антигена в аксонах, более распространенной реакцией структур (26-50%).

4.1.6. Иммуногистохимическое исследование ткани головного мозга при ЧМТ, срок выживаемости от 2 до 14 суток

Случаи 3-й группы выживаемости от 2 до 14 суток характеризуется сохранением максимального индивидуального уровня накопленного белка-маркера, который нарастал в течение первых суток после повреждения и выраженной экспрессией антигена как в ядре клетки, так и в отростках (Рисунки 35–37).

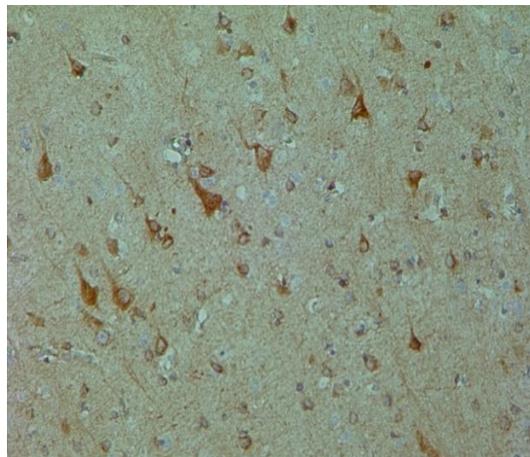


Рисунок 35 – Белое вещество мозга, выживание после травмы 11 суток. ИГХ реакция на β -APP белок. Увеличение 400

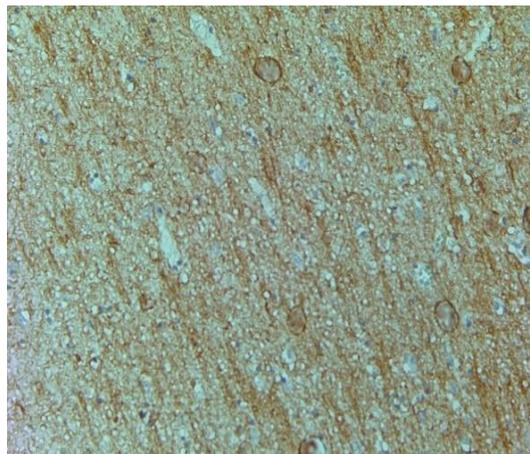


Рисунок 36 – Белое вещество мозга, выживание после травмы 14 суток. ИГХ реакция на β -APP белок. Увеличение 400

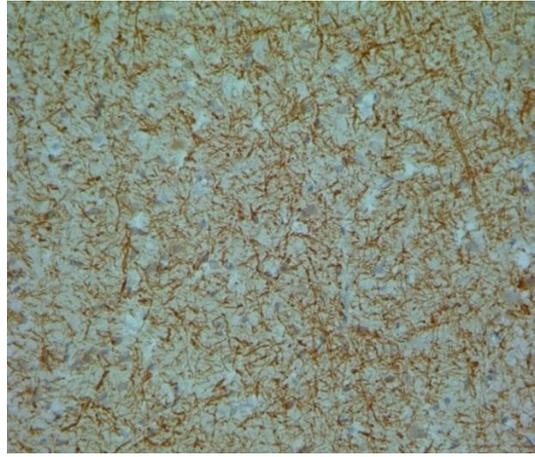


Рисунок 37 – Белое вещество мозга, выживание после травмы 4 суток. ИГХ реакция на β -APP белок. Увеличение 400

В некоторых случаях этой группы исследования (Рисунки 38, 39) обнаружены начальные признаки деградации прореагировавшего β -APP белка – различные степени распада, что проявляется различной степенью зернистости окраски.

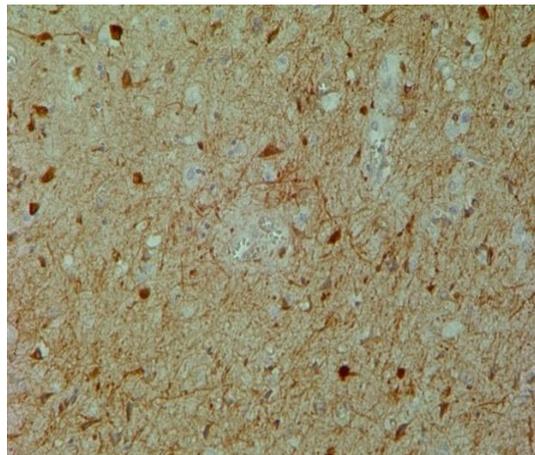


Рисунок 38 – Белое вещество мозга, выживание после травмы 6 суток. ИГХ реакция на β -APP белок. Увеличение 400

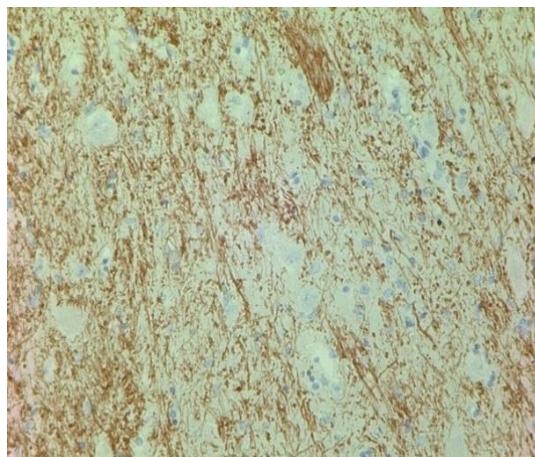


Рисунок 39 – Белое вещество мозга, выживание после травмы 6 суток. ИГХ реакция на β -APP белок. Увеличение 400

Резюме: в третьем периоде – выживание после травмы мозга от 2 до 14 суток – сохраняется экспрессия белка β -APP с достигнутым максимумом в течение первых суток, поэтому в ряде случаев картина реакции нейронов на маркер напоминает таковую во 2-й период. Однако в ряде случаев можно получить признаки начальной деградации белка –тенденция к гранулярной окраске.

4.1.7. Иммуногистохимическое исследование ткани головного мозга при ЧМТ, срок выживаемости более 14 суток

4-й период выживания – более 15 суток после травмы, период деградации β -APP протеина, поэтому он характеризуется уменьшением интенсивности реакции, проявлением ее в виде гранулярной структуры (Рисунки 40–44).

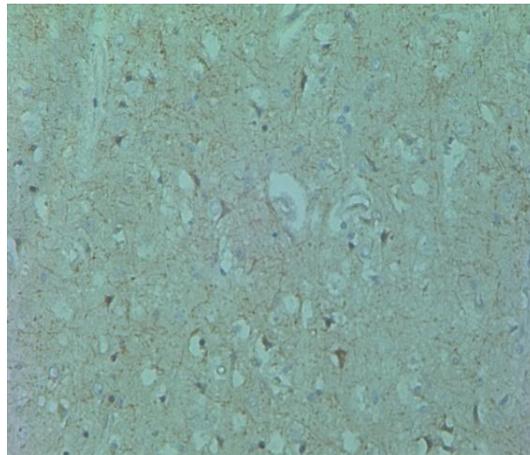


Рисунок 40 – Мозолистое тело. Выживание после травмы 24 суток. ИГХ реакция на β -APP белок. Увеличение 200

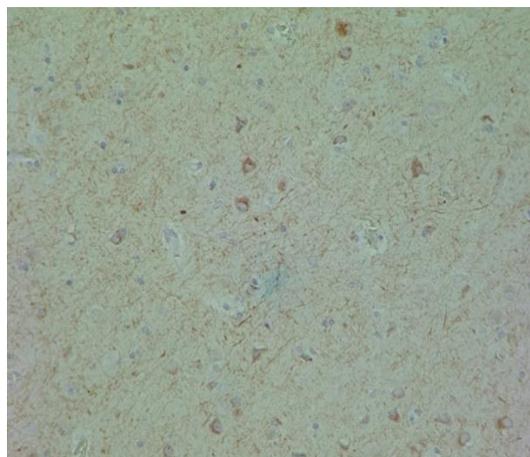


Рисунок 41 – Мозолистое тело. Выживание после травмы 35 суток. ИГХ реакция на β -APP белок. Увеличение 200

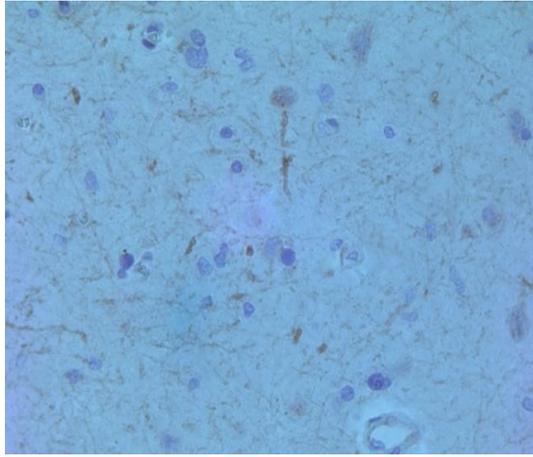


Рисунок 42 – Ствол головного мозга. Выживание после травмы 36 суток. ИГХ реакция на β -APP белок. Увеличение 200

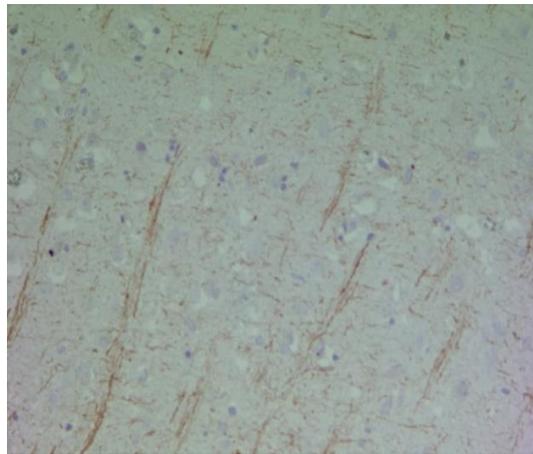


Рисунок 43 – Ствол головного мозга. Выживание после травмы 16 суток. ИГХ реакция на β -APP белок. Увеличение 200

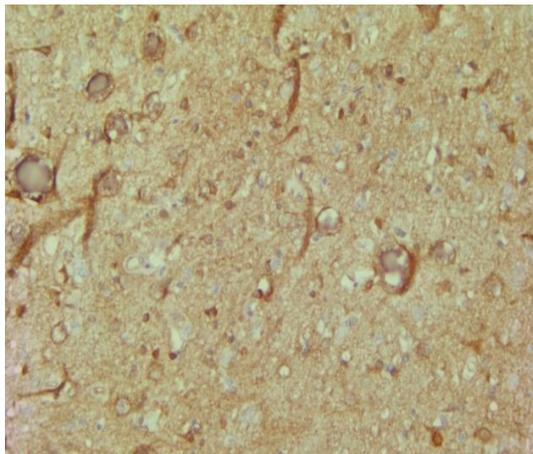


Рисунок 44 – Ствол головного мозга. Выживание после травмы 24 суток. ИГХ реакция на β -APP белок. Увеличение 200

В одном и том же случае также может наблюдаться различная картина экспрессии данного белка (Рисунок 45).

Резюме: реакция на β -APP белок в периоде выживания после 14 суток характеризуется признаками деградации белка, что проявляется в виде слабовыраженной окраски, как тел нейронов, так и их отростков, расположением пигмента в виде цепочек из различного размера гранул.

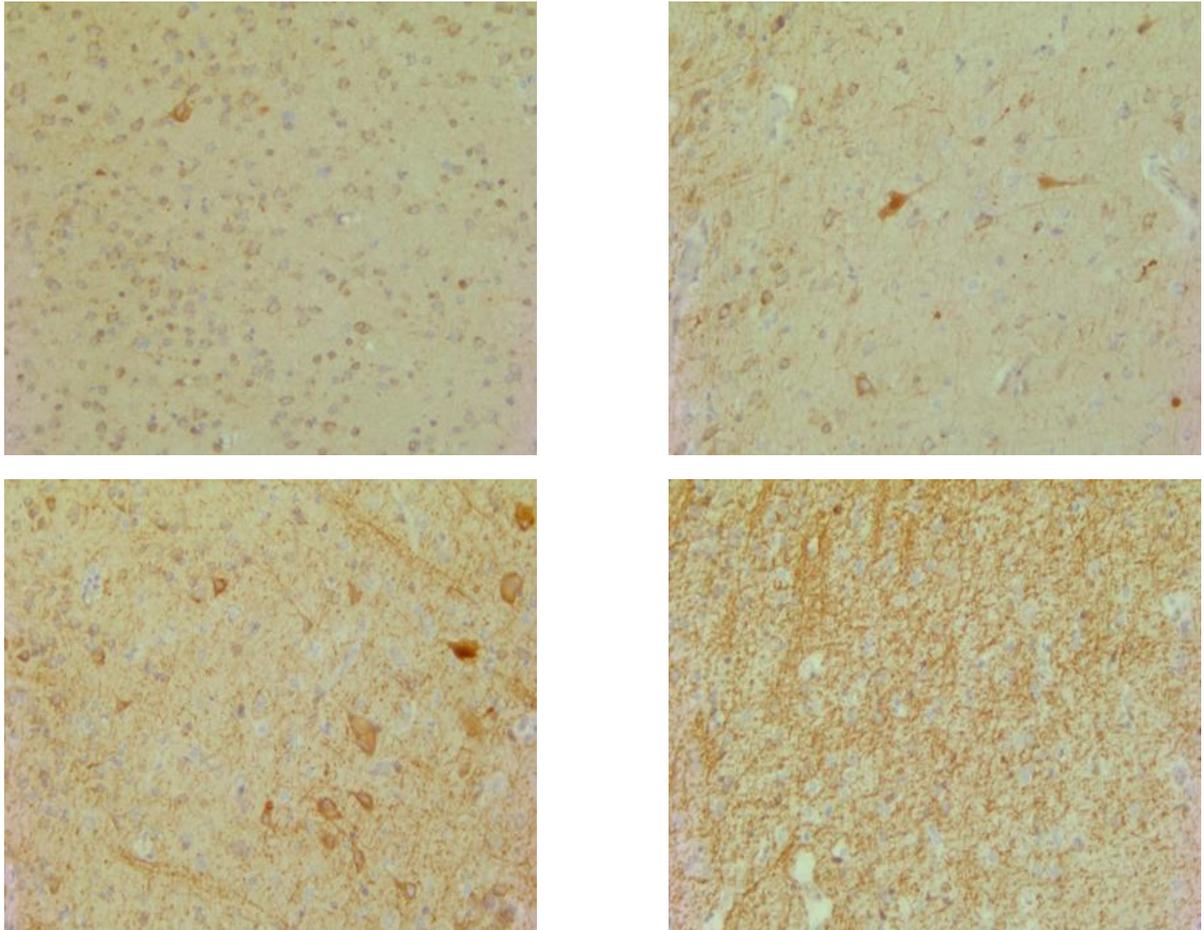


Рисунок 45 – Внутренняя и наружная капсула. Выживание после травмы 64 суток. ИГХ реакция на β -APP белок. Увеличение 200

4.2. Иммуногистохимическое исследование вещества головного мозга в случаях смерти, не связанных с травмой головного мозга

Была изучена реакция на β -APP протеин в случаях острой смерти, не связанной с травмой мозга. Патогенез накопления маркера в данных случаях будет связан с нарушением функции аксонального транспорта пептида вследствие ухудшения или прекращения кровотока и не связано с нарушением целостности волокон (Рисунки 46–52).

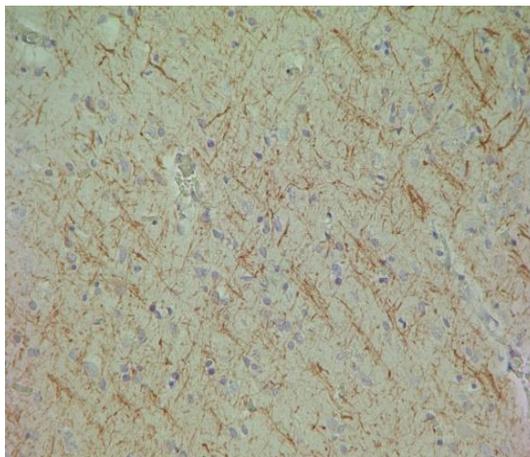


Рисунок 46 – Цереброваскулярная болезнь. Белое вещество мозга. ИГХ реакция на β -APP белок. Увеличение 200

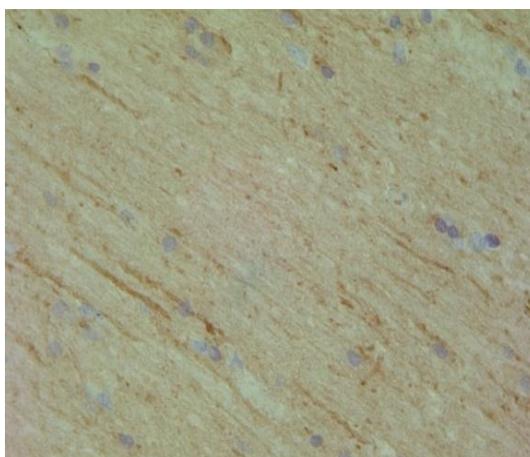


Рисунок 47 – Ишемический инсульт. Белое вещество мозга. ИГХ реакция на β -APP белок. Увеличение 400

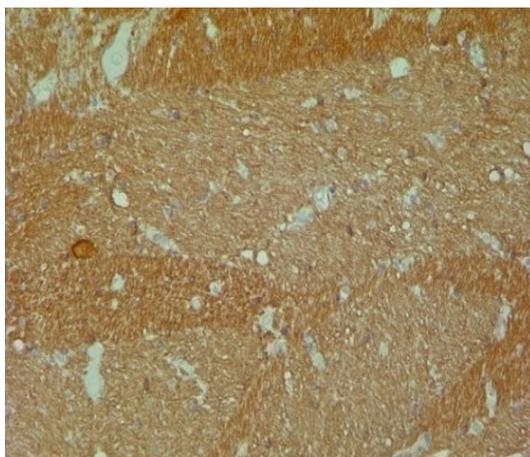


Рисунок 48 – Механическая асфиксия – утопление. Белое вещество мозга. ИГХ реакция на β -APP белок. Увеличение 200

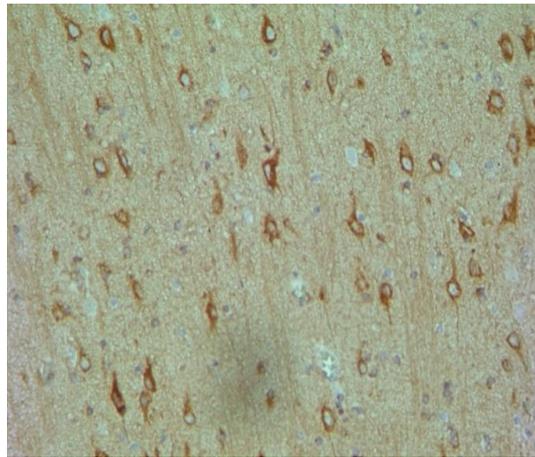


Рисунок 49 – Отравление наркотиками. Кора головного мозга.
ИГХ реакция на β -APP белок. Увеличение 200

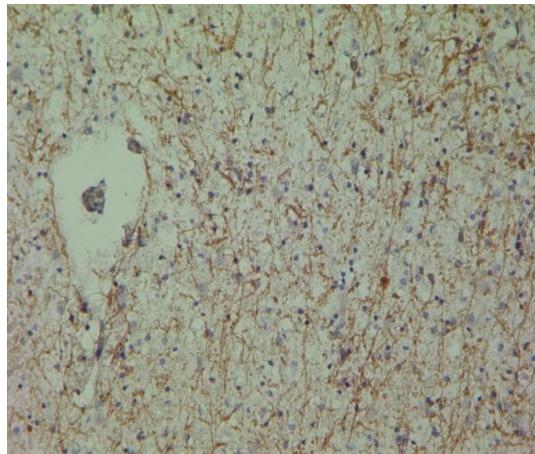


Рисунок 50 – Гипертоническая болезнь, ИБС. Белое вещество мозга.
ИГХ реакция на β -APP белок. Увеличение 200

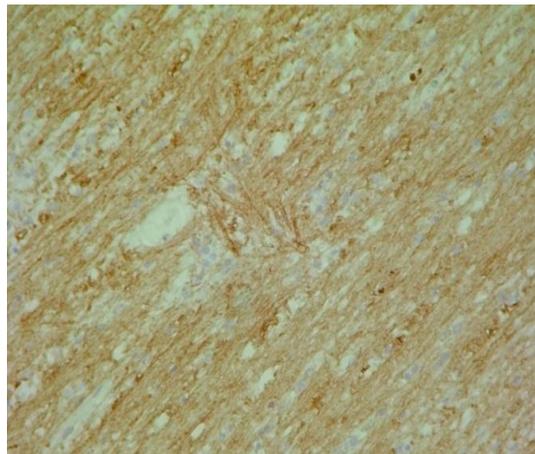


Рисунок 51 – Механическая асфиксия. Белое вещество головного мозга.
ИГХ реакция на β -APP белок. Увеличение 200

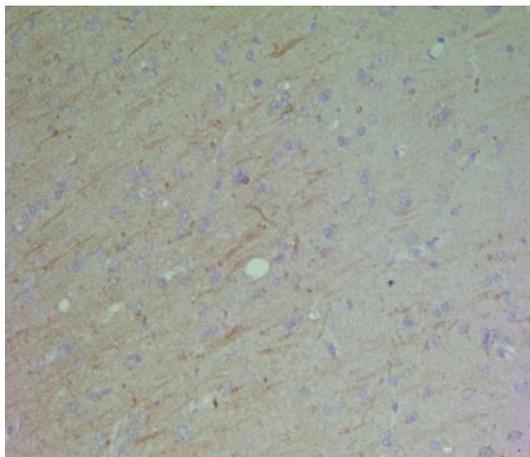


Рисунок 52 – Отравление угарным газом. Белое вещество мозга. ИГХ реакция на β -APP белок. Увеличение 200

Экспрессия антигена случаев этой группы напоминает экспрессию препаратов, связанных с черепно-мозговой травмой, однако, во всех случаях обращает на себя диффузная реакция на антиген в поле зрения препарата, в отличие от более локального расположения пигмента в случаях травмы. Еще одной чертой, которую следует рассмотреть, можно считать экспрессию антигена преимущественно в отростках нейронов. В одном из случаев в различных участках мозга определятся относительно одинаковая картина, с сохранением диффузной реакции и экспрессии антигена во всех волокнах во всех препаратах (Рисунок 53).

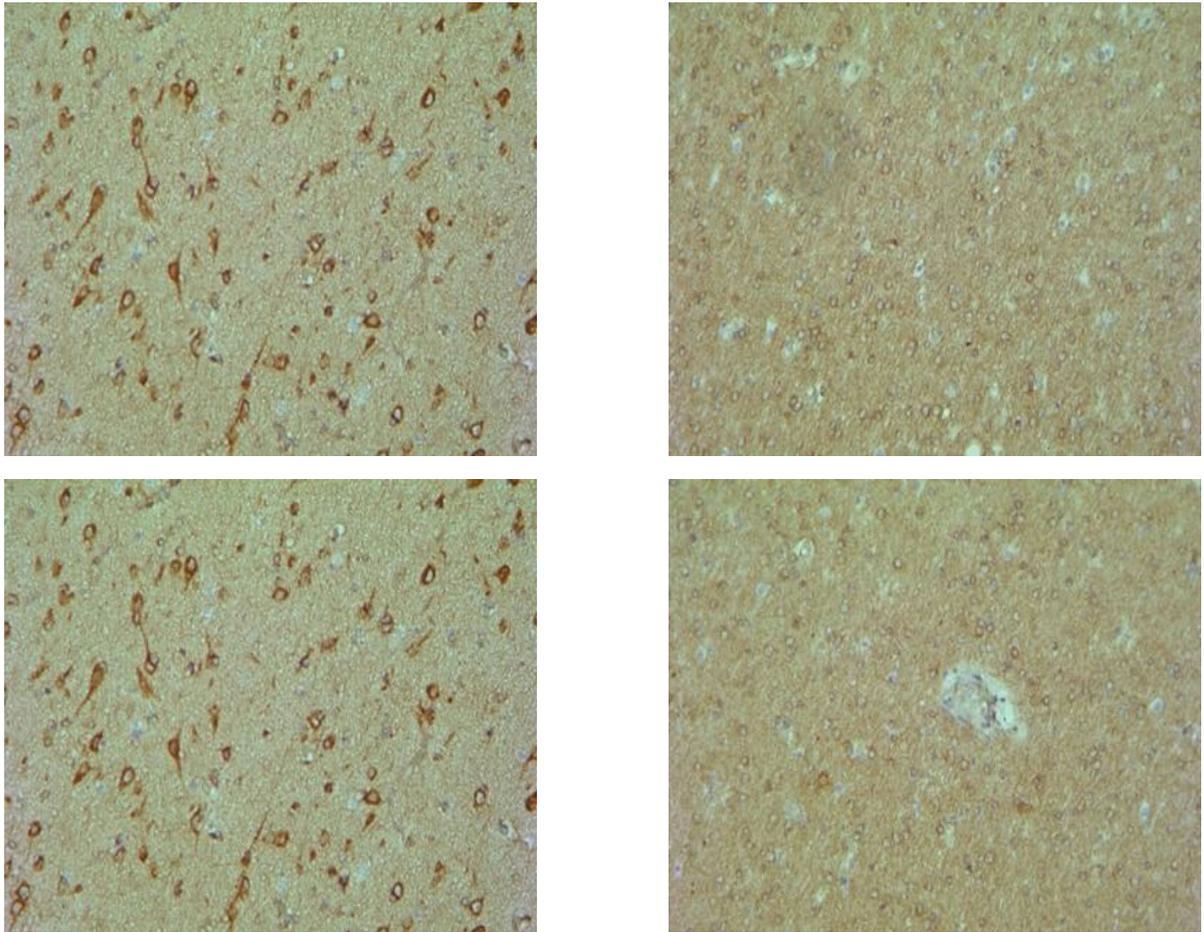


Рисунок 53 – Отравление наркотиками. Микрофотография положительной ИГХ реакции на β -APP белка. Увеличение 200

Резюме: несмотря на похожесть ИГХ реакции на β -APP протеин в случаях ЧМТ, при внимательном рассмотрении можно найти отличия.

Первое из них состоит в различном механизме накопления маркера – в случаях с травмой транспорт по аксонам нарушается вследствие механического повреждения, надрыва или разрыва волокна, поэтому положительная реакция имеет тенденцию к более локализованному проявлению, различной картине в разных участках мозга.

В случаях острой смерти накопление носит скорее функциональный характер, связанный с нарушением кровотока, поэтому нарушение носит диффузный характер, со сходной картиной окраски в различных отделах одного головного мозга.

4.3. Внедрение иммуногистохимического исследования на β -APP белок в судебно-медицинскую практику при подозрении на ЧМТ: случай из практики

Данная методика нами была применена в целях выявления предполагаемого ДАП в рамках выполнения повторной комиссионной экспертизы [31].

Мужчине 52 лет были нанесены неоднократные (не менее 5) удары по голове, после чего он, стоя на коленях, продолжал высказывать угрозы в адрес нападавших, один из которых впоследствии нанёс удар ногой в область нижней челюсти слева. После этого удара мужчина упал на спину, сразу наступила потеря сознания, и началось кровотечение в полости рта (со слов как самого подозреваемого, так и всех очевидцев мужчина после этого «не шевелился», «оставался лежать в этом положении, изо рта пошла кровь»). Была вызвана бригада скорой медицинской помощи, которая по прибытию констатировала следующее состояние: «Общее состояние тяжёлое. Сознание отсутствует (коматозное). Зрачки: Реакция на свет: нет. Кожные покровы бледные. Акроцианоз: нет. Мраморность: нет. Отеки есть: лицо, область шеи. Сыпь: нет. Дыхание ослабленное. Хрипы: нет. Тоны сердца: глухие. Пульс: слабого наполнения на сонных артериях, на периферии нет. Язык: сухой. АД 30/0. Пульс 100'. ЧСС 100. Локальный статус: Пострадавший находится без сознания. Голова и лицо в крови. Дыхание урежено, болевой порог снижен. Асимметрия лица, патологическая подвижность нижней челюсти. Кровоточивость в полости рта». После санации полости рта произведена транспортировка пострадавшего в стационар под прикрытием инфузионной терапии, с диагнозом «Закрытая черепно-мозговая травма». По прибытию в стационар начаты реанимационные мероприятия, которые проводились в течение 30 минут без эффекта, после чего была констатирована смерть пострадавшего. На момент травмы пострадавший не имел заболеваний нервной системы, отравлений.

При судебно-медицинском исследовании трупа были выявлены: открытый перелом нижней челюсти слева (разгибательный – в области угла, сгибательный – между альвеолярными отростками 1-2 зубов с разрывами слизистой оболочки

полости рта в проекции переломов, с интенсивным кровоизлиянием в окружающие мягкие ткани), кровоподтёк на верхнем и нижнем веках правого глаза, кровоизлияние в белочную оболочку правого глаза; кровоизлияния в мягкие ткани левой (1) и правой (1) височных областей; кровоизлияния в слизистую оболочку верхней губы в проекции «передних» зубов верхней челюсти (1), в слизистую оболочку нижней губы справа в проекции 2-3 зубов нижней челюсти (1). При этом макроскопические признаки черепно-мозговой травмы отсутствовали (переломы костей свода и основания черепа, кровоизлияния в вещество, над и под оболочки головного мозга, внутрижелудочковые кровоизлияния не обнаружены); отмечено, что «Борозды мозга умеренно сужены, извилины умеренно уплощены». Патологических изменений сосудов головного мозга не выявлено. Также было установлено в верхних дыхательных путях скопление жидкой крови с мелкими фрагментами свёртков крови. Ткань лёгкого неравномерно воздушная, «с темно-красными очагами, где ткань легких пониженной воздушности и светло-розовыми участками, где ткань легких повышенной воздушности. С поверхности разрезов, без надавливания на ткань легких, стекает большое количество кровянистой жидкости, а из пересеченных бронхов различного калибра местами выдавливаются мелкие, темно-красные свертки крови». При судебно-гистологическом исследовании субарахноидальные кровоизлияния и очаги ушиба головного мозга обнаружены не были (изъято 12 кусочков головного мозга); в просветах бронхиол и альвеол выявлена кровь. Признаков хронических заболеваний и острых отравлений не выявлено. При судебно-химическом исследовании обнаружен этиловый спирт в концентрации в крови 2,5 промилле, в моче – 4,6 промилле.

На основании указанных данных, как при первичной экспертизе, так и при последующих комиссионных экспертизах было констатировано, что смерть наступила от тупой травмы головы в виде открытого двойного перелома нижней челюсти, приведшего к аспирации крови, которая явилась непосредственной причиной смерти. Однако, в связи с отсутствием повреждений вещества и оболочек головного мозга, а также наличием этилового спирта в крови в concentra-

ции 2,5 промилле, осложнение в виде аспирации крови носило случайный характер, а потому между причинённой травмой и наступлением смерти прямая связь отсутствует.

При исследовании материалов уголовного дела и результатов судебно-медицинских экспертиз, появилась необходимость в назначении повторной комиссионной судебно-медицинской экспертизы.

Учитывая все вышеизложенные обстоятельства, нами при проведении повторной судебно-медицинской экспертизы, было высказано предположение о наличии у погибшего диффузного аксонального повреждения головного мозга. При исследовании гистологических препаратов головного мозга были выявлены только диапедезные/мелкоочаговые/очаговые кровоизлияния в мягкой мозговой оболочке, веществе головного мозга, отёк головного мозга; при исследовании ткани лёгких – наличие крови в просветах большинства бронхиол и альвеол (аспирация крови). В связи с коротким промежутком времени для диагностирования ДАП (смерть наступила в течение двух часов после причинения повреждения), нами было принято решение о проведении иммуногистохимического исследования имеющихся фрагментов головного мозга.

Иммуногистохимическое исследование проводили с применением кроличьих моноклональных антител к белку-предшественнику амилоида [clone Y188] (Amyloid Precursor Protein) в разведении 1:500 (фирма «Abcam»). При оценке результатов выявляли наличие и интенсивность окрашивания.

В результате исследования нами установлено следующее: во всех исследованных срезах головного мозга (24 среза) отмечается выраженная экспрессия антигена β -APP в цитоплазме нейронов, а также по ходу аксонов; наличие участков разрывов аксонов.

Результаты данного исследования позволили нам установить диагноз диффузного аксонального повреждения. Учитывая характерную особенность клинического течения этого вида травмы – коматозное состояние сразу после причинения травмы, которое обуславливает вынужденное положение (в данном случае горизонтальное на задней поверхности тела), а также наличие источника крово-

течения в виде открытого перелома нижней челюсти, явившегося местом приложения травмирующей силы, нами была установлена прямая причинная связь между причинением повреждений и наступлением смерти.

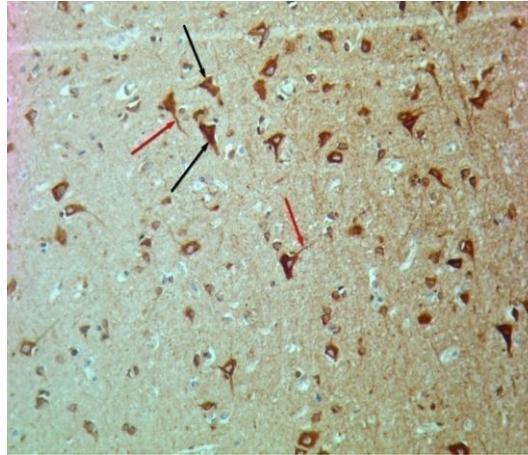


Рисунок 54 – Выраженная экспрессия β -APP белка в цитоплазме нейронов (указано чёрными стрелками) и в начальных отделах аксонов (указано красными стрелками) в коре головного мозга. Увеличение 200

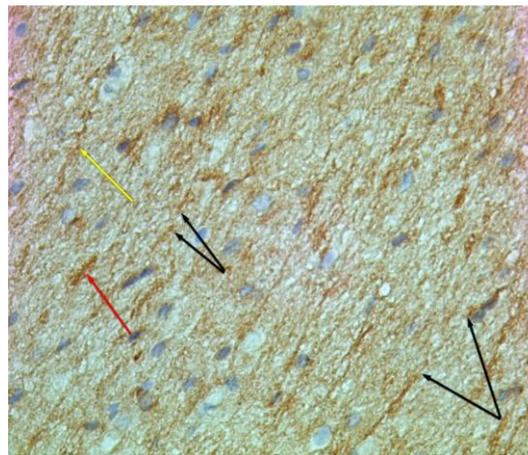


Рисунок 55 – Белое вещество головного мозга – выраженная экспрессия β -APP белка. Фрагментация (указана чёрными стрелками), утолщение (указано красными стрелками) и извилистость (указана жёлтой стрелкой) аксонов. Увеличение. 400

Таким образом, нами подтверждена эффективность использования иммуногистохимических методов исследования в диагностике ДАП в ранние сроки, что в свою очередь позволило объективно и категорично ответить на вопрос о причинно-следственной связи между причинением повреждений и наступлением смерти.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диагностика диффузного аксонального повреждения головного мозга является актуальной проблемой современной нейротравматологии и судебно-медицинской экспертизы. Трудности диагностики данного повреждения вызывают минимальные морфологические проявления травмы головы в остром периоде: как правило, мозговые оболочки и мозг выглядят интактными; могут выявляться мелкоочаговые диапедезные кровоизлияния и геморрагические некрозы в мозолистом теле и стволе головного мозга. В нашем исследовании все случаи ДАП при макроскопическом исследовании имели неспецифические морфологические изменения с мелкоочаговыми диапедезными кровоизлияниями в веществе головного мозга, в случаях ДТП отмечались очаговые кровоизлияния в мягких мозговых оболочках. Во всех случаях ДАП и в некоторых случаях ДТП пострадавшие впадали в кому сразу после травмы или через небольшой промежуток времени. Аксональные шары были выявлены в одном случае диффузного аксонального повреждения в стволе головного мозга, в остальных случаях черепно-мозговой травмы аксональные шары обнаружены не были. Для образования аксональных шаров необходимо время, 6-12 часов, самое раннее время их появления, которое было зафиксировано — 3 часа. Отсутствие аксональных шаров не является доказательством отсутствия аксональных повреждений. Для верификации повреждения аксонов принято использовать специальные гистологические окраски: импрегнация серебром по Билышовскому и Глису, импрегнация осмием по Марки, по Шпильмейеру, окраска по Мийагава-Александровской и Кахалу. Однако эти методы большей частью не относятся к рутинным, не отработаны из-за редкости применения и не обладают достаточной чувствительностью и специфичностью. Эти методы требуют квалификации в постановке реакции и в трактовке результатов. Поэтому для расширения диагностических возможностей гистологического исследования необходимо применить иммуногистохимический метод диагностики, обладающий высокой специфичностью.

Особую актуальность методы ИГХ приобретают при исследовании секционного материала в сложных диагностических случаях, когда макроскопические признаки травмы отсутствуют или выражены минимально, а характерные микро-

скопические признаки еще не успели сформироваться. Использование ИГХ методик в случае посмертной диагностики аксональных повреждений является целесообразным, так как основано на механизмах повреждения клеток нервной ткани. Разнообразии клеток в месте повреждения после ЧМТ, таких как нейроны, глия, воспалительные и эндотелиальные клетки, позволяет отследить последствия травмы на конкретных видах клеток в течение различных временных промежутков. При повреждении клеток экспрессируются белки-маркеры, специфичные для определенной клеточной группы. Однако большинство исследований проводилось на клеточных культурах *in vitro*. Так, С. Loov и соавт. (2012, 2013), «использовали модель «травмы-царапины» на смешанной культуре первичных нейронов, астроцитов и олигодендроцитов без каких-либо элементов микроглии, чтобы определить белки, которые специфически экспрессируются непосредственно и в клетках, и в окружающей среде через 24 ч после травмы с последующим установлением маркеров, которые можно исследовать с целью диагностики ДАП» [116, 117].

В результате очень строгого отбора критериев обнаружили 53 белка, появляющиеся в среде после травмы. При более детальном изучении биомаркеров повреждения нервной ткани было установлено, что белки, которые появлялись при повреждении глиальных клеток, астроцитов и другие структурные белки не обладают достаточной специфичностью и чувствительностью, их уровень может повышаться при травме других органов, кроме травмы головного мозга. Были выделены и изучены следующие белки: S-100 β (кальций-связывающий белок, маркер повреждения глиальных клеток), GFAP (глиальный фибриллярный кислый протеин),NSE (нейрон-специфическая енолаза), С-tau белок. Однако использование этих белков имеет свои недостатки, и они не могут быть однозначными показателями аксонального повреждения.

Например, белок S-100 β имеет главный недостаток – низкую специфичность, так как содержится, помимо нервной системы, в других нормальных тканях организма и экспрессируется некоторыми опухолями, а также травма другого органа, где расположен этот маркер, или любое хирургическое вмешательство, или

сопутствующее нейродегенеративное или аутоиммунное заболевание, могут вести к увеличению содержания протеина S-100 β , тем самым приводя к ложноположительной интерпретации результатов.

GFAP обладает высокой специфичностью в отношении повреждения клеток астроглии. В ЦНС после повреждения (будь то результат травмы, заболевания, генетического нарушения) астроциты в результате типичного поведения отвечают астроглиозом, при котором отмечается быстрый синтез GFAP, что также может привести к ложноположительному результату.

«Несмотря на то, что NSE является высокоспецифичным белком нейронов, при экспериментальных и клинических исследованиях при сочетанной травме, гемолизе, геморрагическом шоке, переломах бедренной кости, печеночной и почечной недостаточности уровень биомаркера повышался как в случаях с ЧМТ, так и без нее» [21].

Уровень C-tau белка начинает повышаться только через 6 часов после травмы.

Несмотря на то, что существует широкий спектр белков, который обнаруживается после травмы, есть необходимость в поиске биомаркера, который бы точно указывал на повреждение аксонов и определялся бы в ранние сроки после ЧМТ. Такой белок был обнаружен после долгих исследований. Это белок, который выявляется при повреждении нейрона, а точнее, аксона – белок β -амилоидный предшественник (β -APP). Он транспортируется от тела нейрона по аксону быстрым транспортом и при повреждении отростка выявляется через 35 минут после травмы, может длительно сохраняться. Этот биомаркер может точно указать на повреждение аксонов при минимальных макроскопических изменениях в головном мозгу в раннем посттравматическом периоде.

В нашей работе мы проводили ИГХ реакцию на β -APP белок в различные сроки выживания после ЧМТ, оценивали и анализировали экспрессию белка и сравнивали с гистологической картиной при обзорной окраске гематоксилином и эозином. Интенсивность окраски и количество прореагировавших нейронов в нашем исследовании полностью соответствует предыдущими исследованиям [79;

50; 51; 156], в которых говорится, что первые признаки могут обнаруживаться в течение 3 часов выживания после травмы, далее количество положительно окрашенных нейронов увеличивается в течение 24 ч. и достигает своеобразного "плато", β -APP белок легко распознается после выживания до 10–14 дней. После этого периода интенсивность окрашивания уменьшается и через 3–4 недели с трудом идентифицируется, хотя при исследовании на мощном увеличении часто обнаруживается гранулированное окрашивание в структуре аксона, особенно в препаратах ствола мозга. Но критерии оценки реакции в этих работах не были разработаны. В нашем исследовании по результатам исследования были разработаны следующие критерии оценки экспрессии β -APP белка. При оценке препарата следует учитывать интенсивность окраски, которую мы разделили на слабовыраженную, выраженную и интенсивную, а также количество окрашенных структур, для которых применяли 5 градаций: 0 - отсутствие, 1 - 1-25%, 2 - 26-50%, 3 - 51-75%, 4 - 76-100%. Также следует анализировать распространенность накопления маркера в телах нейронов и их отростках.

Вместе со случаями травмы головного мозга была обнаружена положительная реакция на β -APP белок при других патологических состояниях, не связанных с черепно-мозговой травмой – при отравлении угарным газом, гипогликемии, сердечной смерти, при эпилепсии, опухолях, абсцессах, при старении. При этом возникает тяжелая гипоксия, при которой в клетках повреждаются митохондрии, это приводит к нарушению синтеза АТФ, который необходим для аксонального транспорта. Происходит замедление транспорта белков по аксонам, β -APP белок участвует в быстром аксональном транспорте, при его замедлении происходит накопление β -APP протеина.

В нашей работе мы проводили ИГХ реакцию и в группе сравнения, в которой случаи смерти не связаны с ЧМТ. Это были случаи наркотической интоксикации, механической асфиксии, ИБС, цереброваскулярная болезнь.

Отмечалась положительная реакция на β -APP белок, она напоминала экспрессию белка в случаях с черепно-мозговой травмой, однако, во всех случаях

группы сравнения обращает на себя диффузное окрашивание поля зрения препарата, в отличие от более локального расположения пигмента в случаях травмы.

В практике встречаются случаи глобальной гипоксии, при которой обнаруживается положительная реакция на β -APP белок, обусловленная сосудистыми осложнениями при повышении внутричерепного давления, хотя морфологические изменения при этом могут быть неразличимы. Поэтому интерпретация любого положительного β -APP белка зависит от оценки того, повышалось ли внутричерепное давление в течение жизни.

Кроме того, необходимо учесть тот факт, что существуют внекортикальные кровоизлияния, к которым относят кровоизлияния в средний и задний (варолиев мост, продолговатый мозг) мозг, в подкорковую область, в мозолистое тело, которые без оказания медицинской помощи приводят к летальному исходу пострадавшего и по признаку опасности для жизни причиняют тяжкий вред здоровью. В соответствии с международной классификацией болезни 10-го пересмотра (МКБ-10) эти кровоизлияния имеют собственный шифр. В МКБ-11 ДАП имеет 4 подгруппы внутри кода АВ 0.2, а фокальные повреждения мозга, к которым собственно и относятся ВКГМ, разделены на 25 категорий. Также следует отметить, что петехиальные кровоизлияния в различные вегетативные ядра головного мозга могут развиваться самостоятельно, без связи с другими патологическими очагами и располагаться в белом веществе семиовального центра, в мозолистом теле, стволе мозга, в стенках желудочковой системы (так называемые кровоизлияния Дюре). Возникает острая ишемия и вызывая тканевую гипоксию, обуславливает повреждение цитоскелета белого вещества как результат реакции нейрональных образований на повреждение. Вследствие этого часть проводящих нервных волокон в мозолистом теле, ножках мозга и ножках мозжечка подвергается процессам, сходным с валлеровским перерождением. Набухание клеток мелкой глиии отражает тяжесть деструктивных изменений. В отсроченный острый период глубина ишемии возрастает, явления, зафиксированные в белом веществе изученных образований, сходны с таковыми, наблюдаемыми при диффузном аксональным по-

вреждении: формирование аксональных шаров, деструкция белого вещества, реакция астроцитов и клеток мелкой глии [32].

Поэтому при установлении диагноза ДАП необходимо учитывать клинический анамнез и обстоятельства дела [28].

Результаты нашего исследования позволяют считать β -APP белок наиболее оптимальным маркером, позволяющим обнаружить аксональное повреждение в остром периоде после травмы и рекомендовать проведение этого исследования в практической работе. Однако необходимо учитывать, что этот белок может экспрессироваться при некоторых других патологиях, не связанных с травмой. Поэтому для правильной оценки случая, необходимо иметь полную картину обстоятельств смерти, и по возможности, соматический анамнез пострадавшего.

ВЫВОДЫ

1. При рутинной гистологической окраске гематоксилином и эозином препаратов головного мозга в случаях диффузного аксонального повреждения обнаружены неспецифические микроскопические изменения (отек вещества головного мозга, венозное полнокровие, набухание нейронов, гиперхромия и увеличение ядер нейронов, исчезновение ядрышек, иногда мелкоочаговые диапедезные кровоизлияния в веществе головного мозга и мягких мозговых оболочках, при переживаемости травмы 6-12 часов - "аксональные шары").

2. Установлено, что β -APP белок является наиболее информативным для обнаружения поврежденных аксонов в посттравматическом периоде. Экспрессия маркера может выражаться различной степенью интенсивности (слабовыраженная (1 балл), выраженная (2 балла) и интенсивная (3 балла)) и захватывать различное количество позитивно среагировавших структур (для оценки использовали 5 градаций: 0 баллов – отсутствие экспрессии; 1 балл – 1–25%; 2 балла – 26–50%; 3 балла – 51–75 %; 4 балла – 76–100%).

3. Достоверно установлена связь между интенсивностью реакции, количеством элементов с экспрессией β -APP белка и сроком выживания после травмы.

4. Установлена закономерность картины распределения β -APP протеина для различных периодов выживаемости пациентов после травмы. Первый период – от 35 минут до 3 часов после повреждения – слабовыраженная интенсивность (1 балл) экспрессии в телах нейронов, количество структур с экспрессией антигена до 25% (1 балл) элементов. Период 3–24 часа выживаемости характеризуются экспрессией белка как в телах нейронов, так и их отростках, нарастание количества экспрессирующих элементов. Период 2–14 суток характеризуется различной интенсивностью экспрессии белка в телах нейронов и их отростках и различным количеством окрашенных элементов (до 75%). Период более 15 суток характеризуется деградацией накопленного протеина, что выражается уменьшением интенсивности экспрессии антигена тел нейронов и отростков, появлением различной степени гранулярности окраски. Для всех периодов выживаемости после травмы мозга характерна полиморфность экспрессии в препаратах различных отделов головного мозга.

5. В случаях выставления диагноза "Аксональное повреждение" необходимо опираться не только на ИГХ картину, но и учитывать клинический анамнез.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Необходимо тщательно собрать клинический анамнез, проведя на этом этапе дифференциальную диагностику между травмой головного мозга, тяжелой соматической патологией, сопровождающейся нарушением кровотока головного мозга. В пользу травмы мозга может свидетельствовать кома, возникшая сразу или через небольшой промежуток после острого события.

2. Набор материала для исследования производить симметрично из обоих полушарий из строго указанных зон: передний, средний, задний отделы мозолистого тела; внутренняя капсула; наружная капсула; верхние ножки мозжечка; ножки мозга и мост; продолговатый мозг.

3. В случае диффузного аксонального повреждения или подозрения на него ИГХ исследование на β -APP белок должно быть включено в стандартные методы диагностики в судебно-медицинских целях. Постановка ИГХ реакции должна

проводиться по строго установленной методике, начиная от изъятия материала и фиксации и до постановки непосредственно ИГХ реакции.

4. При ИГХ исследовании необходимо оценить наличие реакции с антителами к β -APP белку в нейронах, которая должна быть сходна с позитивной реакцией в контрольной ткани. С прогностической целью рекомендуется учитывать степень и интенсивность реакции, т.к. интенсивная экспрессия антигена и большое количество прореагировавших нейронов может свидетельствовать о тяжести поражения и длительности выживания пациента от момента травмы до смерти. Оценка биомаркера проводится полуколичественным методом. Оценивается показатель интенсивности экспрессии по бальной системе (0 – отсутствие; 1 – слабовыраженная окраска, 2 – выраженная, 3 – интенсивная) и процент позитивно окрашенных нейронов от общего числа нейронов. Для оценки можно предложить следующую градацию позитивно среагировавших клеток [16]: 0 – отсутствие, 1 балл – 1–25%, 2 балла – 26–50%, 3 балла – 51–75%, 4 балла – 76–100%).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волкова О.В. Астроцитарные белки головного мозга: структура, функции, клиническое значение / О.В. Волкова, Ю.К. Елецкий, А.В. Краснов. // Неврологический журнал. – 2012. – Т. 17. – № 1. – С. 37-42.
2. Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии с гистологической техникой. – М. : Медгиз, 1982, 304 с.
3. Гринштейн А.М., Смирнов Л.И. Патологическая анатомия и патогенез травматических заболеваний нервной системы – М., 1947. – Ч. I. – 135 с.; 1949. – Ч. 2. – 164 с.
4. Касумова С.Ю. Патологическая анатомия черепно-мозговой травмы / С.Ю Касумова // Руководство по черепно-мозговой травме. – М.: Антидор, 2001. – Т. 1. – С. 169-225.
5. Ковалев А.В. Судебно-медицинская оценка β -APP белка – маркера аксонального повреждения головного мозга при смерти от черепно-мозговой травмы гистологическими и иммуногистохимическими методами / А.В. Ковалев и др. // Методические рекомендации. – М., 2018. – 16 с.
6. Кононов А. В. Иммуногистохимическая детекция биомолекулярных маркеров метапластической атрофии слизистой оболочки в гастробиоптатах / А. В. Кононов, С.И. Мозговой, А.Г. Шиманская и др. // Архив патологии. – 2014. – 6. – С. 44-50.
7. Мацко Д. Е. Нейрохирургическая патология. Руководство. Санкт-Петербург: ФГБУ «РНХИ им. проф. А. Л. Поленова», МЗ России. – СПб. –2015. – 134 с.
8. Патоморфология и экспертная оценка повреждений головного мозга при черепно-мозговой травме / Г. А. Пашиян, С. Ю. Кусумова, Г. Ф. Добровольский, П. О. Ромодановский. – М. ; Ижевск : Экспертиза, 1994. – 134 с.
9. Петрайкин А.В. Алгоритм идентификации очагов диффузно-аксонального повреждения у больных с черепно-мозговой травмой / А.В. Петрайкин, Т.А. Ахадов., О.В. Сенюкова и др. // International Symposium on Functional Neuroimaging, Moscow. – 2012. – pp. 92-94.

10. Черепно-мозговая травма. Механогенез, морфология и судебно-медицинская оценка. / Ю.И. Пиголкин, И. А. Дубровин, С. В. Леонов, Д.В. Горностаев – М., 2018. – 248 с.
11. Начала общей военно-полевой хирургии / Н.Н. Пирогов // Собр. соч. – М., 1961. – Т. 5. – 640 с.; Т.6. – 468 с.
12. Черепно-мозговая травма: Судебно-медицинские аспекты. / В.Л. Попов – Л.: Медицина, 1988. – 240 с.
13. Потапов А. А. Биомеханика и основные звенья патогенеза черепно-мозговой травмы / А.А. Потапов, Э.И. Гайтур // Руководство по черепно-мозговой травме. – М.: Антидор, 2001. –Том 1. – С. 152-165.
14. Потапов А.А. Диффузное аксо-нальное повреждение / А.А. Потапов, Л.Б. Лихтерман, С.Ю. Касумова и др. // Руководство по черепно-мозговой травме. – М.: Антидор, 2001. – Том 2. – С. 426-449.
15. Ромодановский П. О. Судебно-медицинская диагностика диффузного аксонального повреждения мозга при травме головы: диссертация ... канд. мед. наук. / Ромодановский Павел Олегович – М., 1990. – 136 с.
16. Ромодановский, П.О. Некоторые аспекты диффузного аксонального повреждения мозга при травме головы / П.О. Ромодановский // Судеб.- мед. экспертиза. – 2013. – Том 56. N 3. – С. 18-20.
17. Сафронова Е. С. Диффузное аксональное повреждение — современные представления о патогенетических механизмах и перспектив фармакотерапии / Е. С. Сафронова // ЭНИ. Забайкальский медицинский вестник. – 2013. – №1. – С. 206-213.
18. Сухорукова Е. Г. Структурная организация астроцитов неокортекса крысы и человека, содержащих глиальный фибриллярный кислый белок: диссертация ... канд. мед. наук. / Сухорукова Елена Геннадиевна. – СПб, 2011. – 143 с.
19. Сухорукова Е.Г. Иммуногистохимическое выявление астроцитов головного мозга при черепно-мозговой травме / Е.Г. Сухорукова, Д.Э. Коржевский, О.В. Кирик, В.Ф. Коржевская // Судебно-медицинская экспертиза. – 2010. – 53(1). – С. 14-16.

20. Третьяков К.Н. Гистологические изменения нервных клеток спинного и головного мозга при травме / К.Н. Третьяков, А.Л. Землянская // Всес. съезд невропатологов и психиатров, I-й: Труды. – М., 1937.
21. Храпов Ю.В. Роль биомаркеров повреждения вещества головного мозга в диагностике, оценке эффективности лечения и прогнозирование исходов тяжелой черепно-мозговой травмы / Ю.В. Храпов, С.В. Поросийский // Волгоградский научно-медицинский журнал. – Волгоград, 2013. – №3 (39). – С. 10-20.
22. Цуканова А.Ф. Ранние реактивные изменения астроцитов после травмы головного мозга. / А.Ф. Цуканова, М.В. Монида, Н.Г. Наумов, А.В. Дробленков // Астраханский медицинский журнал. – 2013. – 8 (1). – С. 288-291.
23. Шай А.Н. Аспекты диагностики диффузного аксонального повреждения при черепно-мозговой травме / А.Н. Шай // Судебно-медицинская наука и практика. Материалы научно-практической конференции молодых ученых и специалистов. Вып. 11. – М.: АНО ИЦ "ЮрИнфоЗдрав". - 2016. – С. 166-168.
24. Шай А.Н. Аспекты изучения диффузного аксонального повреждения: возможность использования структурных компонентов нервной ткани в качестве биомаркеров при его диагностике / А.Н. Шай и др. // Лечебное дело №4. – М., 2016. – С. 96-100.
25. Шай А.Н. Механизмы возникновения биомаркеров ДАП и пути их визуализации / А.Н. Шай // Актуальные вопросы судебно-медицинской экспертизы. Взгляд молодых ученых. Материалы 5 всероссийской научно-практической конференции (с международным участием) студентов, ординаторов, аспирантов, молодых ученых (21 апреля 2017 г., Пермь). - под ред. К.В. Шевченко, Д.В. Бородулина. – Пермь: Новопринт, 2017. – с. 79-85.
26. Шай А.Н. Значение белков-маркеров нервной ткани для морфологической диагностики нервной ткани для морфологической диагностики черепно-мозговой травмы / А.Н. Шай и др. // Судебно-медицинская экспертиза. № 4. – М., 2017. – С. 40-45. – [doi: 10.17116/sudmed201760440-45].
27. Шай А.Н. Морфология аутолиза нервной ткани и его влияние на результаты выявления β -APP белка при черепно-мозговой травме / А.Н. Шай // Материалы

Международного конгресса и научно-практической школы " Актуальные вопросы судебной медицины и экспертной практики - 2018", 18-20 апреля 2018 года, Москва, под редакцией проф. В.А. Клевно. – М., 2018. – С. 78-79.

28. Шай А.Н. Трудности интерпретации результатов иммуногистохимического исследования β - APP белка при диагностике черепно-мозговой травмы / А.Н. Шай // Материалы Международного конгресса и научно-практической школы " Актуальные вопросы судебной медицины и экспертной практики - 2018", 18-20 апреля 2018 года, Москва, под редакцией проф. В.А. Клевно. – М., 2018. – С. 79-80.
29. Шай А.Н. Иммуногистохимическая детекция биомолекулярных маркеров аксонального повреждения при черепно-мозговой травме / А.Н. Шай, Ю.Е. Квачева, А.В. Ковалев // Судебно-медицинская экспертиза. М., 2018. – № 3. Т-61. – С. 8-10.
30. Шай А.Н. Алгоритмы диагностики диффузного аксонального повреждения / А.Н. Шай, Ю.Е. Квачева, А.В. Ковалев // Достижения российской судебно-медицинской науки 20-21 столетия: к 100-летию со дня образования современных судебно-экспертных школ. Труды 8 Всероссийского съезда судебных медиков с международным участием, 21-23 ноября 2018 года, Москва // под общ. ред. д.м.н. А.В. Ковалева. – М.: ООО «Принт» - 2019. - Том 1. – 220с.
31. Шай А.Н. Применение иммуногистохимического исследования для верификации диффузного аксонального повреждения и установления причинно-следственных связей / Л. А. Шмаров, А.Л. Кочоян, В.Б. Страгис, М.В. Федулова, А. Н. Шай // Судебно-медицинская экспертиза. – 2020. – Т.63. – №1. – С. 53-55.
32. Шай А.Н. Судебно-медицинская оценка диффузного повреждения головного мозга и внекортикальных кровоизлияний при смерти от черепно-мозговой травмы / А.Н. Шай, С.В. Шигеев, Г. Ю. Сахаров, Д.В. Горностаев //Вестник судебной медицины.. – 2023. – Т.12. – №3. – С. 36-41.
33. Abrahamson E. E. Caspase inhibition therapy abolishes brain trauma-induced increases in Abeta peptide: implications for clinical outcome / E. E. Abrahamson, M. D. Ikonovic, J. R. Ciallella, [and other] // Exp. Neurol. – 2006. – № 197. – P. 437-450.
34. Adams J.H. Brain damage in fatal non-missile head injury / J.H. Adams, D.I. Graham, G. Scott // J. Clin. Path. – 1986. – Vol. 33 – P. 1132 – 1145.

35. Adams J.H. Diffuse axonal injury due to nonmissile head injury in humans: an analysis of 45 cases / J.H. Adams, D.I. Graham, L.S. Murray, G. Scott. // *Ann. Neurol.* – 1982. – 12, № 6. – P. 557-563.
36. Adams J.H. Head injury in man and experimental animals: neuropathology / J.H. Adams, D.I. Graham, T.A. Gennarelli // *Actaneurochirurgica.* – 1983. – Vol. 32, Suppl.–P. 15-30.
37. Adams J.H. Microscopic diffuse axonal injury in cases of the head injury / J.H. Adams, D. Doyle, D.I. Graham et al. // *Med.Sci. Law.* – 1985. – Vol. 25, №4. – P. 265 – 269.
38. Adams J.H. Primary brain damage in non-missile head injury / J.H. Adams, D.I. Graham, T.A. Gennarelli // *Mechanism of Secondary Brain Damage.* Eds. A. Baetmann, K.O. Go, A. Unterberd. – NewYork, 1986. – P. 1-13.
39. Adams J.H. The relationship between ventricular fluid pressure and the neuropathology of raised intracranial pressure. / J.H. Adams, D.I. Graham // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* - 2. – 1976. – P. 323–332.
40. Aghababaiyan K, Shah-Mansouri V, Maham B. Axonal Channel Capacity in Neuro-Spike Communication / K. Aghababaiyan, V. Shah-Mansouri, B. Maham // *IEEE Trans Nanobioscience.* – 2018. – 17(1). – P. 78-87. – [doi: 10.1109/TNB.2018.2800899.PMID: 29570078].
41. Ahmadzadeh H. Viscoelasticity of tau proteins leads to strain rate-dependent breaking of microtubules during axonal stretch injury: predictions from a mathematical model. / H. Ahmadzadeh, D.H. Smith, V.B. Shenoy // *Biophys J.* - 2014. – 106(5). – P. 1123-33. – [doi: 10.1016/j.bpj.2014.01.024].
42. Aldrich E.F. Diffuse brain injury / E.F. Aldrich, H.M. Eisenberg // *The Practice of Neurosurgery.* – Baltimore: Williams&Wilkins. – 1996. – Vol. 2, Chapt 98. – P. 1491-1501.
43. Anderson R.E. High serum S100B levels for trauma patients without head injuries / R.E. Anderson, L.O. Hansson, O. Nilsson et al. // *Neurosurgery.* – 2001. – Vol. 48. – P. 1255-1258.

44. Banoei M.M. Metabolomics and Biomarker Discovery in Traumatic Brain Injury / M.M. Banoei, C. Casault, S.M. Metwaly, B.W. Winston // *J Neurotrauma*. – 2018. – Vol. 15;35(16). – P. 1831-1848. – [doi: 10.1089/neu.2017.5326].
45. Barzdina A. GFAP and expression in brain tissue in children and adults after fatal traumatic brain injury / A. Barzdina, M. Pilmane, A. Petersons. // *Paperson Anthropology XX*. – 2011. – P. 51-62.
46. Bazarian J. J. Impact of creatine kinase correction on the predictive value of S-100B after mild traumatic brain injury / J. J. Bazarian, C. Beck., B. Blyth [and other] // *Restor. Neurol. Neurosci.* – 2006. – № 24. - P. 163-172.
47. Bazarian J.J. Serum S-100 B and cleaved-tau are poor predictors of long-term outcome after mild traumatic brain injury / J. J. Bazarian, F.P. Zemlan, S. Mookerjee, T. Stigbrand // *BrainInj.* – 2006. – № 20 (7). – P. 759-65.
48. Bennett R.E, Brody D.L. Acute reduction of microglia does not alter axonal injury in a mouse model of repetitive concussive traumatic brain injury / R.E. Bennett, D.L. Brody // *JNeurotrauma*. – 2014. – 31(19). – P. 1647-63. – [doi: 10.1089/neu.2013.3320].
49. Biberthaler P., Serum S-100B concentration provides additional information for the indication of computed tomography in patients after minor head injury: a prospective multicenter study / P. Biberthaler, U. Linsenmeier, K. J. Pfeifer [and other] // *Shock*. – 2006. – № 25. – P. 446–453.
50. Blennow K. Traumatic brain injuries / K. Blennow, D.L. Brody, P.M. Kochanek [and other] // *Nat Rev Dis Primers*. – 2016. – 2. – P.16084. – [doi: 10.1038/nrdp.2016.84].
51. Blumbergs P.C. Diffuse axonal injury in head injury / P.C. Blumbergs, N.R. Jones, J.B. North // *J. Neurol Neurosurg Psychiatry*. – 1989. – 52(7). – P. 838–841.
52. Blumbergs P.C. Traumatic Brain Injury / P.C. Blumbergs, J. W. Finnie // *Find in Pub-Med, Vet Pathol*. – 2002. – 39. – P. 679–689.
53. Boirel A. *Traite des plaies de la tete*. – Alencon, 1677.
54. Bostrom H. Aspects on pathology and neuropathology in head injury / H. Bostrom, C.G. Helanger // *Acta Neurochirurgica*. – 1986. – Vol. 32, Suppl. – P. 109-114.

55. Campbell J.N. Mechanisms of dendritic spine remodeling in a rat model of traumatic brain injury. / J.N. Campbell, B. Low, J.E. Kurz [and other] // *J. Neurotrauma*. – 2012. – 29(2). – P. 218-34. – [doi: 10.1089/neu.2011.1762].
56. Cardali S. Detection of alphaII-spectrin and breakdown products in humans after severe traumatic brain injury / S. Cardali, R. Maugeri // *J. Neurosurg. Sci.* – 2006.–№ 50. – P. 25-31.
57. Castoreno A.B. Transcriptional regulation of phagocytosis- induced membrane biogenesis by stero regulatory element binding proteins / A.B. Castoreno, Y. Wang, W. Stockinger [and other] // *ProcNatlAcadSci.* – USA, 2005. – 102(37). – P. 13129-34.
58. Chasseigneaux Stéphanie. Secreted Amyloid Precursor Protein β and Secreted Amyloid Precursor α Induce Axon Outgrowth In Vitro through Egr1 Signaling Pathway / Stéphanie Chasseigneaux, Levent Dinc, Christiane Rose // *PLoS ONE*. – 2011. – № 6 (1). – P. 1-10.
59. Chen M. Proteomic Profiling of Mouse Brains Exposed to Blast-Induced Mild Traumatic Brain Injury Reveals Changes in Axonal Proteins and Phosphorylated Tau. / M. Chen, H. Song, J. Cui [and other] // *J Alzheimers Dis.* – 2018. – 66(2). – P. 751-773. – [doi: 10.3233/JAD-180726].
60. Cheng W.H. CHIMERA repetitive mild traumatic brain injury induces chronic behavioural and neuropathological phenotypes in wild-type and APP/PS1 mice / W.H. Cheng, K.M. Martens, A. Bashir [and other] // *Alzheimers Res Ther.* – 2019. – 12;11(1). – 6 p. – [doi: 10.1186/s13195-018-0461-0].
61. Cheng X. Morphological and functional alterations of astrocytes responding to traumatic brain injury / X. Cheng, J. Wang, X. Sun [and other] // *J Integr Neurosci.* – 2019. – (2). – P. 203-215. – [doi: 10.31083/j.jin.2019.02.110].
62. Chytrova G. Exercise normalize slevels of MAG and Nogo-Agrow thin hibitors after brain trauma / G. Chytrova, Z. Ying, F. Gomez-Pinilla // *Europe an Lournal of Neurosciece.* – 2008. – 27. – P. 1-11.
63. Clark J.M. Distribution of microglial clusters in the brain after head injury / J.M. Clark // *J. Neurol., Neurosurg. and Phych.* – 1974. – Vol. 37. - P. 463-474.

64. Clausen F. T-lymphocyte trafficking: a novel target for neuroprotection in traumatic brain injury / F. Clausen, T. Lorant, A. Lewén, L. Hillered // *J. Neurotrauma*. – 2007. – 24(8). – P.1295-307.
65. Cornejo V.H. Global and local mechanisms sustain axonal proteostasis of transmembrane proteins / V.H. Cornejo, A. Luarte, A. Couve // *Traffic*. – 2017. – 18(5). – P. 255-266. –[doi: 10.1111/tra.12472. Epub 2017 Mar 27].
66. Corso P. Incidence and lifetime costs of injuries in the United States / P Corso, E Finkelstein, T Miller [and other] // *Inj Prev*. 2006 Aug; 12(4): 212–218. [doi: 10.1136/ip.2005.010983]
67. Crompton M.R. Brain-stemlesions dui to closed head injury / M.R. Crompton // *Lancet*. – 1971. – Vol. 3. – P. 669-673.
68. Currie S. Imaging assessment of traumatic brain injury / S. Currie, N. Saleem, J.A. Straiton [and other] // *Postgrad Med J*. – 2016 Jan. – 92(1083). – P. 41-50. – [doi: 10.1136/postgradmedj-2014-133211].
69. Dolinak D. Global hypoxia per se is an unusual cause of axonal injury / D. Dolinak, C. Smith, D.I. Graham // *Acta Neuropathol*.100. – 2000. – P. 553–560.
70. Duret T. Etudes experimentales sur les traumatismes cerebraux / T. Duret – Paris, 1878.
71. Dvorak F. Characterisation of the diagnostic window of serum glialfibrillary acidic protein for the differentiation of intracerebral haemorrhage and ischaemic stroke / F. Dvorak, I. Haberer, M. Sitzer, C. Foerch // *Cerebrovasc. Dis*. – 2009. – Vol. 27, N 1. – P. 37-41.
72. Erb D.E. Axonal damage in severe traumatic brain injury: an experimental study in cat / D.E. Erb, J.T. Povlishock // *Acta Neuropathol*. – 1988. – Vol. 76, № 4. – P. 347-358.
73. Foerch C. Elevated serum S100B levels indicate a higher risk of hemorrhagic transformation after thrombolytic therapy in acute stroke / C. Foerch, M. T. Wunderlich, F. [and other] // *Stroke*. – 2007. – Vol. 38, N 9. – P. 2491-2495.
74. Foerch C. Serum glial fibrillary acidic protein as a biomarker for intracerebral haemorrhage in patients with acute stroke / C. Foerch, I. Curdt, B. Yan [and other] // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. – 2006. – Vol. 77, N 2. –P. 181-187.

75. Gama J.P. Traite des plaies de tete et de l'encephalite, principalement de celle qui leur est consecutive: Ouvrage dans lequel sont discutees plusieurs questions relatives aux fonetions du systeme nerveux en generale / Gama J.P. – Paris, 1835.
76. Geddes J.F. The diagnosis of diffuse axonal injury: implications for forensic practice / J.F. Geddes, G.H. Knowles, T.W. Beer, D.W. Ellison // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* –1997. – P. 339–347.
77. Geddes J.F. Traumatic axonal injury: practical issues for diagnosis in medico-legal cases / J.F. Geddes, H.L. Whitwell, D.I. Graham // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* – 2000. – P. 105–116.
78. Gennarelli T.A. A new conceptual approach to an old problem / T.A. Gennarelli, J.H. Adams, D.I. Graham Diffuse axonal injury: // *Mechanisms of Secondary Brain Damage.* Eds. A. Baethmann, K.O. Go, A. Unterberd. NATO ASI Series. – New York; London: Plenum Press, 1986. – P. 17-28.
79. Gennarelli T.A. Diffuse axonal injury and traumatic coma in the primate / T.A. Gennarelli, L.E. Thibault, J.H. Adams [at al]// *Ann. Neurol.* – 1982. – Vol. 12. – P. 564-574.
80. Gennarelli Thomas A. Biomechanical Tolerances for Diffuse Brain Injury and a Hypothesis for Genotypic Variability in Response to Trauma / Thomas A. Gennarelli, Frank A. Pintar, Narayan Yoganandan // *Annu Proc Assoc Adv Automot Med.* 2003; 47: 624–628.
81. Gentleman S.M. Axonal injury: a universal consequence of fatal closed head injury / S.M. Gentleman, G.W. Roberts, T.A. Gennarelli [and other] // *Acta Neuropathol.* – 1995. – 89(6). – P. 537-43.
82. Graham D.I. Pathology of brain damage in head injury / D.I. Graham, J.H. Adams, T.A. Gennarelli // *The Practice of Neurosurgery.* – Baltimore: Williams&Wilkins, 1996. – Vol. 2. – P. 1385-1399.
83. Graham N.S. Understanding neurodegeneration after traumatic brain injury: from mechanisms to clinical trials in dementia / N.S. Graham, D.J. Sharp // *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* – 2019. – №90(11). – P. 1221-1233. – [doi: 10.1136/jnnp-2017-317557].

84. Graham D.I., Gennarelli T.A., McIntosh T.K., Trauma, in: D.I. Graham, P.L. Lantos (Eds.) // *Greenfields Neuropathology*, seventh ed. – Arnold, London, 2002. – pp. 823–898.
85. Gyoneva S. Ccr2 deletion dissociates cavity size and tau pathology after mild traumatic brain injury / S. Gyoneva, D. Kim, A. Katsumoto [and other] // *Neuroinflammation*. – 2015. – № 3;12. – P. 228. – [doi: 10.1186/s12974-015-0443-0].
86. Hao Y. Intrinsic mechanisms for axon regeneration: insights from injured axons in *Drosophila* / Y. Hao, C. Collins // *Curr Opin Genet Dev*. – 2017. – № 44. – P. 84-91. – [doi: 10.1016/j.gde.2017.01.009].
87. Hayakawa K. Phosphorylated neurofilament subunit NF-H as a biomarker for evaluating the severity of spinal cord injury patients, a pilot study / K. Hayakawa, R. Okazaki, K. Ishii [and other] // *Spinal Cord*. – 2012. – № 50(7). – P. 493-6. – [doi:10.1038/sc.2011.184].
88. Helmy A. Cytokines and innate inflammation in the pathogenesis of human traumatic brain injury / A. Helmy, M.G. De Simoni M.G., M.R. Guilfoyle [and other] // *Prog Neurobiol*. – 2011. – № 95(3). – P. 352-72. – [doi: 10.1016/j.pneurobio.2011.09.003].
89. Holbourn A.H.S. Mechanism of head injury / A.H.S. Holbourn // *Lancet*. – 1943. – Vol. 2. – P. 438-441.
90. Hortobágyi T. Traumatic axonal damage in the brain can be detected using beta-APP immunohistochemistry within 35 min after head injury to human adults / T. Hortobágyi, S. Wise, N. Hunt [et al] // *Neuropathol. Appl. Neurobiol*. – 2007. – № 33(2). – P. 226-237. – [doi: 10.1111/j.1365-2990.2006.00794.x].
91. Huynh K.K. LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes / K.K. Huynh, E.L. Eskelinen, C.C. Scott [and other] // *EMBO J*. – 2007. – № 24; 26(2). – P. 313-24.
92. Imajo T. Diffuse axonal injury by assault / T. Imajo, R.C. Challener, U. Roessman // *Am. J. Forensic Med. Pathol*. – 1987. – Vol. 8, № 3. – P. 217-219.
93. Jackson T.C. Experimentelle Untersuchungen über die traumatische Schädigung des Längstransportsystems (mit besonderer Berücksichtigung der Commotio cerebri und Commotio nervosa) / T.C. Jackson T.C., S.E. Kotermanski, E.K. Jackson [et al] //

Histologisheundhistopathologische Arbeitenuber die Grosshirnrinde / Eds. F. Nissl, A. Alzheimer. – Jena: Fischer, 1913. – Vol. 5. – P. 182-358.

94. Jackson Travis C.. Brain Phys increases neurofilament levels in CNS cultures, and facilitates investigation of axonal damage after a mechanical stretch-injury in vitro. / Travis C. Jackson. Shawn E Kotermanski², Edwin K Jackson², Patrick M Kochanek³ // *Exp Neurol.* – 2018. – 300. – P. 232-246. – [doi: 10.1016/j.expneurol.2017.11.013]
95. Jauch E. C. Association of serial biochemical markers with acute ischemic stroke: the National Institute of Neurological Disorders and Stroke recombinant tissue plasminogen activator Stroke Study / E. C. Jauch, C. Lindsell, J. Broderick [and other] // *Stroke.* – 2006. – Vol. 37, N 10. – P. 2508-2513.
96. Jensen L.L. B-amyloid Precursor Protein Staining Of The Brain in Sudden Infant and Early Childhood Death / L.L. Jensen, J. Banner, B.U. Parm // *Neuropathology and Applied Neurobiology.* – 2014. – № 40 (4). – P. 385-397. – [doi: 10.1111/nan.12109].
97. Johnson Michael W. Axonal Injury in Young Pediatric Head Trauma: A Comparison Study of β -amyloid Precursor Protein (β -APP) Immunohistochemical Staining in Traumatic and Nontraumatic Deaths / Michael W Johnson, Lisa Stoll, Ana Rubio [at al]// *J. ForensicSci.* – 2011.– 56 (5). – P. 1198-1205.
98. Kaur B. The possible role of hypoxia in the formation of axonal bulbs / B. Kaur, G.N. Ruttu, W.R. Timperley // *J. Clin. – Pathol,* 1999. – № 52. – P.203–209.
99. Kavalci C. The value of serum tau protein for the diagnosis of intracranial injury in minor head trauma / C. Kavalci, M. Pekdemir, P. Durukan [and other] // *Am. J. Emerg. Med.* – 2007.– № 25. – P. 391–395.
100. Khalil M. Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders / M. Khalil, C.E. Teunissen, M. Otto [and other] // *Nat Rev Neurol.* – 2018. – № 14(10). – P. 577-589. –[doi: 10.1038/s41582-018-0058-z].
101. Khellaf A. Recent advances in traumatic brain injury / A. Khellaf, D.Z. Khan, A. Helmy // *J. Neurol.* – 2019. –№ 266(11). – P. 2878-2889. – [doi: 10.1007/s00415-019-09541-4].

102. Kim H.J. The current state of biomarkers of mild traumatic brain injury / H.J. Kim, J.W. Tsao, A.G. Stanfill // *JCI Insight*. – 2018. – № 11;3(1). – e97105. – [doi: 10.1172/jci.insight.97105].
103. Kobeissy F.H. Novel differential neuroproteomics analysis of traumatic brain injury in rats / F.H. Kobeissy, A.K. Ottens, Z. Zhang [and other] // *Mol. Cell. Proteomics*. – 2006. – № 5. – P. 1887–1898.
104. Kochanek P.M. Biomarkers of primary and evolving damage in traumatic and ischemic brain injury: diagnosis, prognosis, probing mechanisms, and therapeutic decision making / P.M. Kochanek, R.P. Berger, H. Bayr, [and other] // *Curr. Opin. Crit. Care*. – 2008. – № 14 (2). – P. 135–141.
105. Koch W. Beitrage zur experimentellen Chirurgie, 3: Veberdie commotio cerebri / W. Koch, W. Filehne // *Arch. Klin. Chir.* – 1874. – Bd 17, № 2.–S. 180-190.
106. Korobova F. Arp 2/3 complex is important for filopodia formation, growth cone motility, and neuritogenesis in neuronal cells / F. Korobova, T. Svitkina // *Mol Biol Cell*. – 2008. – № 19(4). – P. 1561-74. – [doi: 10.1091/mbc.E07-09-0964].
107. Kreipke C.W. Calponin and caldesmon cellular domains in reacting microvessels following traumatic brain injury / C.W. Kreipke, N.C. Morgan, T. Petrov, J.A. Rafols // *Microvasc Res*. – 2006. – № 71(3). – P. 197-204.
108. Kumaria A. In vitro model of neurotrauma / A. Kumaria, C.M. Tolia // *Br. J. Neurosurg.* – 2008. – № 22(2). – P. 200-6. – [doi: 10.1080/02688690701772413].
109. Ladak A.A. Review of the Molecular Mechanisms of Traumatic Brain Injury / A.A. Ladak, S.A. Enam, M.T. Ibrahim // *World Neurosurg.* – 2019. – № 131. – P. 126-132. – [doi: 10.1016/j.wneu.2019.07.039].
110. Lafrenaye A.D. Microglia processes associate with diffusely injured axons following mild traumatic brain injury in the micro pig / A.D. Lafrenaye, M. Todani, S.A. Walker, J.T. Povlishock // *J. Neuroinflammation*. – 2015. – № 6;12. – 186 p. – [doi: 10.1186/s12974-015-0405-6].
111. Langfitt T.W. Can the outcome from head injury be improved? / T.W. Langfitt, T.A. Gennarelli // *J. Neurosurg.* – 1982. – Vol. 56.–P. 19-25.

112. Lee S.H. Regulation of actin cytoskeleton on dynamic cells / S.H. Lee, R. Dominguez // *MolCells*. – 2010. – № 29(4). – P. 311-25.
113. Leikin J.B. Traumatic brain injury / J.B. Leikin // *Dis.Mon.* – 2019. – № 65(10). – 100857. – [doi: 10.1016/j.disamonth.2019.02.010].
114. Littre A. Diverses observations anatomiques / A. Littre // *Hist de L'Acad. Poy des Scienses*. – Paris, 1705. – 54 p.
115. Liu M.C. Ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 as a biomarker for ischemic and traumatic brain injury in rats / M.C. Liu, L. Akinyi, D. Scharf [and other] // *Eur. J. Neurosci*. – 2010. – № 31 (4). – P. 722–732.
116. Loov C. Engulfing astrocytes protect neurons from contact-induced apoptosis following injury / C. Loov, L. Hillered, T. Ebendal, A. Erlandsson // *PLoSOne*. – 2012. – № 7(3). – e33090. – [doi: 10.1371/journal.pone.0033090].
117. Loov C. Identification of injury specific proteins in a cell culture model of traumatic brain injury / C. Loov, G. Shevchenko, A.G. Nadadthur // *PlosOne* – 2013. – №8(2). –e55983.
118. Losurdo M. Diffuse Axonal Injury in the Rat Brain: Axonal Injury and Oligodendrocyte Activity Following Rotational Injury / M. Losurdo, J. Davidsson, M.K. Sköld // *Brain Sci*. 2020. – № 10(4). – P. 229. – [doi: 10.3390/brainsci10040229].
119. Maas A.I. Moderate and severe traumatic brain injury in adults / A.I. Maas, N. Stocchetti, R. Bullock // *Lancet Neurol*. – 2008. – № 7(8). – P. 728-41. –[doi: 10.1016/S1474-4422(08)70164-9].
120. Marion S. Ezrin promotes actin assembly at the phagosome membrane and regulates phago-lysosomal fusion / S. Marion, E. Hoffmann, D. Holzer [and other] // *Traffic*. – 2011. – № 12(4). – P. 421-37. – [doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01158.x].
121. Marleen M. van E. Diffuse axonal injury after traumatic brain injury is a prognostic factor for functional outcome: a systematic review and meta-analysis / M. van E. Marleen, G. Sch. Guus, van der N. Joukje [at al]// *Brain Inj*. – 2018. – № 32(4). – P. 395-402. – [doi: 10.1080/02699052.2018.1429018].
122. Masel B. E. Traumatic brain injury: a disease process, not an event / B. E. Masel, D. S. DeWitt // *J. Neurotrauma*. – 2010. – № 27 (8).–P. 1529-1540.

123. Maxwell W.L. Freeze-fracture studies of reactive myelinated nerve fibres after diffuse axonal injury / W.L. Maxwell, A.M. Kansagra, D.I. Graham [et al] // *Acta Neuropathol.* – 1988. – Vol. 76, № 4. – P. 395-406.
124. Moon Y. Induction of ezrin-radixin-moesin molecules after cryogenic traumatic brain injury of the mouse cortex / Y. Moon, J.Y. Kim, S.Y. Choi [et al] // *Neuroreport.* – 2011. – № 22(6). – P. 304-8. – [doi: 10.1097/WNR.0b013e3283460265].
125. Morrison B. In vitro models of traumatic brain injury / B. Morrison, B.S. Elkin, J.P. Dollé, M.L. Yarmush // *Annu. Rev. Biomed Eng.* – 2011. № 13. – P. 91-126. – [doi: 10.1146/annurev-bioeng-071910-124706].
126. Mu J. Myelin Damage in Diffuse Axonal Injury / Mu J., Li M., Wang T. [et al] // *J.Front. Neurosci.* – 2019. – № 13. – P. 217. – [doi: 10.3389/fnins.2019.00217].
127. Muller K. S100B serum level predicts computed tomography findings after minor head injury / K. Muller, W. Townend, N. Biasca [et al] // *J. Trauma.* – 2007. – № 62. – P. 1452–1456.
128. Naeimi Z. S. Predictive value of S-100B protein and neuron specific-enolase as markers of traumatic brain damage in clinical use / Z. S. Naeimi, A. Weinhofer, K. Sarahrudi [et al] // *Brain. Inj.* – 2006. – № 20. – P. 463–468.
129. Najem D. Traumatic brain injury: classification, models, and markers / D. Najem, K. Rennie, M. Ribocco-Lutkiewicz [et al] // *Biochem. Cell. Biol.* – 2018. – 96(4). – P. 391-406. – [doi: 10.1139/bcb-2016-0160. Epub 2018 Jan 25].
130. Namjoshi D.R. Merging pathology with biomechanics using CHIMERA (Closed-Head Impact Model of Engineered Rotational Acceleration): a novel, surgery-free model of traumatic brain injury / D.R. Namjoshi, W.H. Cheng, K.A. McInnes [et al] // *Mol. Neurodegener.* – 2014. – № 9. – 55p. – [doi: 10.1186/1750-1326-9-55].
131. Netto C. B. Serum S100B protein is increased in fasting rats / C. B. Netto, S. Conte, M. C. Leite [et al] // *Arch. Med. Res.* – 2006. – № 37. – P. 683 –686.
132. Nevin N.C. Neuropathological changes in the white matter following head injury / N.C. Nevin // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* – 1967. – Vol. 26. – P. 77-86.

133. Nylen K. Increased serum-GFAP in patients with severe traumatic brain injury is related to outcome / K. Nylen, M. Ost, L. Z. Csajbok [et al] // *J. Neurol. Sci.* – 2006. – № 240. – P. 85-91.
134. Oberholzer M. Neurorehabilitation of Traumatic Brain Injury (TBI): A Clinical Review. / M., Oberholzer, R.M. Müri // *Med Sci (Basel)*. – 2019. № 18;7(3). – 47p. – [doi: 10.3390/medsci7030047.PMID: 30889900].
135. Oppenheimer D.R. Microscopic lesions in the brain following head injury / D.R. Oppenheimer // *J.Neurol., Neurosurg. andPhych.* – 1968. – Vol. 31. – P. 299-306.
136. Ost M. Initial CSF total tau correlates with 1-year outcome in patients with traumatic brain injury / M. Ost, K. Nylen, L. Csajbok [et al] // *Neurology*. – 2006. – № 67. – P. 1600–1604.
137. Papa L. Ubiquitin C-terminal hydrolase is a novel biomarker in humans for severe traumatic brain injury / Papa L., Akinyi L., Liu M.C. [et al] // *Crit. Care. Med.* – 2010.– № 38 (1).– P. 138-144.
138. Papa L. Use of biomarkers for diagnosis and management of traumatic brain injury patients // L. Papa, G. Robinson, M. Oli [et al] // *Expert Opin. Med. Diagn.* – 2008. – № 2 (8). – P. 937-945. [doi: 10.1517 / 17530059.2.8.937].
139. Pelinka L.E. Neuron -specific-enolase is increased in plasma after hemorrhagic shock and after bilateral femur fracture without traumatic brain injury in the rat / L.E. Pelinka, M. Jafarmadar, H. Redl [et al] // *Shock*. – 2004. – № 22.–P. 88–91.
140. Pelinka L.E. Nonspecific increase of systemic neuron-specific enolase after trauma: clinical and experimental findings / L. E. Pelinka, H. Hertz, W. Mauritz [et al] // *Shock*. – 2005. – № 24. – P. 119–123.
141. Petit J.L. *Traite des maladies chirurgicales* / J.L. Petit– Paris, 1774.
142. Pineda J. A. Clinical significance of alpha II-spectrin breakdown products in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury / J.A. Pineda, S.B. Lewis, A.B. Valadka [et al] // *J. Neurotrauma*. – 2007. – № 24. – P. 354-366.
143. Povlishock J.T. The pathobiology of traumatically induced axonal injury in animals and humans: a review of current thoughts / J.T. Povlishock, C.W. Christman // *J. Neurotrauma*.–1995. – № 12. – P. 555–564. - [doi: 10.1089/neu.1995.12.555].

144. Povlishock J.T. Traumatically induced axonal damage without concomitant in focally related neuronal somata and dendrites / J.T. Povlishock // *Acta Neuropathol.* – 1986. – Vol. 70, №1. – P. 53-59.
145. Pudenz R.H. The lucite calvarium – a method for direct observation of the brain: II Cranial trauma and brain movement / R.H. Pudenz , C.H. Sheldon // *J. Neurosurg.* – 1946. – Vol. 3.–P. 487-505.
146. Rahaman P. Histology of Brain Trauma and Hypoxia-Ischemia / P. Rahaman, M.R. Del Bigio // *Acad. Forensic Pathol.* – 2018. – №8(3). – P. – 539-554. – [doi: 10.1177/1925362118797728].
147. Rauen K. Health Qual Life Outcomes / K. Rauen, L. Reichelt, P. Probst [et al] // – 2020. № – 18(1). – 166p. – [doi: 10.1186/s12955-020-01391-3].
148. Ravin R. Potency and fate specification in CNS stem cell populations in vitro / R. Ravin, D.J. Hoepfner, D.M. Munno, R. Ravin // *Cell. Stem. Cell.* – 2008. – № 3(6). – P. 670-80. – [doi: 10.1016/j.stem.2008.09.012].
149. Risling M. Modelling human pathology of traumatic brain injury in animal models / M. Risling , D. Smith, T.D. Stein [et al] // *J. Intern. Med.* – 2019. № 285(6). – P. 594-607. – [doi: 10.1111/joim.12909].
150. Rocha A. B. Role of serum S100B as a predictive marker of fatal outcome following isolated severe head injury or multitrauma in males / A. B. Rocha, R. F. Schneider, G. R. de Freitas [et al] // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2006. – № 44. – P. 1234-1242. - [doi: 10.1515/CCLM.2006.218].
151. Rooij R. Microtubule Polymerization and Cross-Link Dynamics Explain Axonal Stiffness and Damage / R. Rooij, E. Kuhl // *Biophys J.* – 2018. № 114(1). – P. 201-212. – [doi: 10.1016/j.bpj.2017.11.010.PMID: 29320687].
152. Sahel K.D. Mitochondrial dysfunctioning and neuroinflammation: Recent highlights on the possible mechanisms involved in Traumatic Brain Injury / K.D. Sahel, M. Kaira, K. Raj [and other] // *Neurosci Lett.* – 2019. – № 25;710. – P. 1343-47. – [doi: 10.1016/j.neulet.2019.134347].
153. Sajic M. Mitochondrial damage and "plugging" of transport selectively in myelinated, small-diameter axons are major early events in peripheral

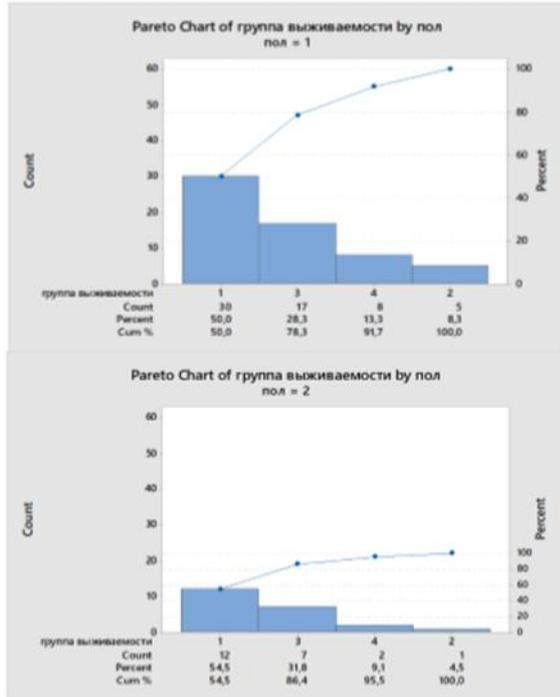
- neuroinflammation / M. Sajic, K.K. Ida, R. Canning [et al] // *J. Neuro inflammation*. – 2018. – № 15(1). – 61 p. – [doi: 10.1186/s12974-018-1094-8].
154. Scott G. Amyloid pathology and axonal injury after brain trauma / G. Scott, Anil F. Ramlackhansingh, Paul Edison [et al] // *Neurology*. – 2016. – № 86(9). – P. 821-8. – [doi: 10.1212/WNL.0000000000002413].
155. Sempere L. Experimental models in traumatic brain injury: from animal models to in vitro assays / L. Sempere, A. Rodríguez-Rodríguez, L. Boyero, J. Egea-Guerrero. // *Med Intensiva*. – 2019. № 43(6). – P. 362-372. – [doi: 10.1016/j.medin.2018.04.012. Epub. 2018 Jul 25].
156. Senuakova O. Diffuse Axonal injury Lesion Segmentation Using Controlum Algorithm / O. Senuakova, V. Galanine, A. Krylov // *Proceeding sof. Graphi Con*. – 2011. – P. 84-87.
157. Sherriff F.E. Early detection of axonal injury after human head trauma using immunocytochemistry for beta-amyloid precursor protein / F.E. Sherriff, L.R. Bridges, S. Sivaloganathan // *Acta Neuropathol*. – 1994. – № 87. – P. 55-62.
158. Shively S.B. Localized cortical chronic traumatic encephalopathy pathology after single, severe axonal injury in human brain / S.B. Shively, S.L. Edgerton, D. Iacono [et al] // *Acta Neuropathol*. – 2017. – № 133(3). – P. 353-366. – [doi: 10.1007/s00401-016-1649-7].
159. Shu-Wei Sun. Axonal Terminals Exposed to Amyloid- β May Not Lead to Pre-Synaptic Axonal Damage / Sun Shu-Wei, C. Nishioka, W. Labib , Liang Hsiao-Fang. // *J. Alzheimers Dis*. – 2015. № 45(4). – P. 1139-48. – [DOI: 10.3233/JAD-142154].
160. Sokolowski J.D. Caspase-mediated cleavage of actin and tubulin is a common feature and sensitive marker of axonal degeneration in neural development and injury / J.D. Sokolowski, K.K. Gamage, D.S. Heffron [et al] // *Acta.Neuropathol.Commun*. – 2014. – № 2. – 16p. – [doi:10.1186/2051-5960-2-16].
161. Strich S.J. Diffusede generation of the cerebral whit ematterin severed mentia following head injury / S.J. Strich // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat*. – 1956. – № 69. – P. 163-185.

162. Strich S.J. Shearing of nerve fibres as a cause of brain damage due to head injury: A pathological study of twenty cases / S.J. Strich // *Lancet*. – Vol. 26. – P. 443-448.
163. Strich S.J. The pathology of brain damage due to blunt head injury / S.J. Strich // *The Late Effects of Head Injury* / Eds. A.E. Walker, W.F. Coveness, M. Critchley. – Springfield: Thomas, 1969. – P. 501-524.
164. Tagliaferri F. A systematic review of brain injury epidemiology in Europe / F. Tagliaferri, C. Compagnone, M. Korsic [et al] // *Acta Neurochir.* – 2006. – № 148. – P. 255–268. - [doi: 10.1007/s00701-005-0651-y].
165. Tirado R. MLÁ. Dating of Traumatic Brain Injury in Forensic Cases Using Immunohistochemical Markers (I): Neurofilaments and β -Amyloid Precursor Protein / R. MLÁ. Tirado, Bl. J.M. Pampin, Gómez R. Gallego // *Am. J. Forensic Med. Pathol.* – 2018. – № 39(3). – P. 201-207. – [doi: 10.1097/PAF.0000000000000412].
166. Toupalík P. Effect of autolysis on histochemical examinations of the central nervous system / P. Toupalík, I. Bouska, J. Jezková // *Soud/ Lek.* – 2001. – № 46(2). – P. 18-20.
167. Townsend W., Ingebrigtsen T. // *Injury*. – 2006. – № 37. – P. 1098-1108.
168. Uden J. Clinical significance of serum S100B levels in neurointensive care / J. Uden, R. Astrand, K. Waterloo [et al] // *Neurocrit. Care.* – 2007. – № 6. –P. 94-99. - [doi: 10.1007/s12028-007-0005-0].
169. Van Itallie T.B. Traumatic brain injury (TBI) in collision sports: Possible mechanisms of transformation into chronic traumatic encephalopathy (CTE) / T.B. Van Itallie // *Metabolism*. – 2019. – 100S. – 153943. – [doi: 10.1016/j.metabol.2019.07.007].
170. Wang K.K. An update on diagnostic and prognostic biomarkers for traumatic brain injury / K.K. Wang, Z. Yang, T. Zhu [et al] // *Expert. Rev. Mol. Diagn.* – 2018. – №18(2). – P. 165-180. – [doi: 10.1080/14737159.2018.1428089].
171. Ware J.B. Variability of Axonal Injury in Diffuse Traumatic Brain Injury / J.B. Ware, T. Hart, J. Whyte [et al] // *J. Neurotrauma*. – 2017. – №34(14). – P. 2243-2253. – [doi: 10.1089/neu.2016.4817].
172. Wishart T.M. Combining comparative proteomics and molecular genetics uncovera regulators of synaotic and axonal stability and degeneration in vivo / T.M.

- Wishart, T.M. Rooney, D.J. Lamont // *PLOS Genetics*. – 2012. – №8(8). – e1002936. - [doi: 10.1371/journal.pgen.1002936. Epub 2012 Aug 30].
173. Witkowski L. Ueber Gehirnzitterung // *Virchows.Arch. path. Anat.* – 1877. – Bd. 69. – P. 498.
174. Wright K.T. Extracellular Nm23H1 stimulates neurite outgrowth from dorsal root ganglia neurons in vitro independently of nerve growth factor supplementation or its nucleoside diphosphate kinase activity / K.T. Wright, R. Seabright, A. Logan [et al] // *Biochem.Biophys.Res.Commun.* – 2010. – №398(1). – P. 79-85. – [doi: 10.1016/j.bbrc.2010.06.039].
175. Wright R.D. Concussion and contusion / R.D. Wright // *Surgery*. – 1946. – Vol. 19, №5. – P. 661-667.
176. Wunderlich M. T. Release of glial fibrillary acidic protein is related to the neurovascular status in acute ischemic stroke / M. T. Wunderlich, C. W. Wallesch, M. Goertler // *Eur. J. Neurol.* – 2006. – Vol. 13, N 10. – P. 1118-1123. - [doi: 10.1111/j.1468-1331.2006.01435.x].
177. Xi G. Mechanisms of brain injury after intracerebral haemorrhage / G. Xi, R. F. Keep, J.T. Hoff // *Lancet Neurol.* - 2006. - Vol. 5, N 1. – P. 53-63. - [doi: 10.1016/S1474-4422(05)70283-0].
178. Xie Y. White Matter Lesion Segmentation Using Machine Learning and Weakly Labeled MR Images / Y. Xie, X. Tao // *Proceeding of SPIE*. - 2011. - vol. 7962, pp. 79622G.
179. Zhang Z.Y. Usefulness of serum interleukin-33 as a prognostic marker of severe traumatic brain injury / Z.Y. Zhang, J. Li, Q. Ye [et al] // *Clin. Chim. Acta.* – 2019. – №497. – P. 6-12. – [doi: 10.1016/j.cca.2019.07.008].
180. Zurek J. Hyperphosphorylated neurofilament NF-H as a predictor of mortality after brain injury in children / J. Zurek, L. Bartlová, M. Fedora // *Brain Inj.* – 2011. – №25(2). – P. 221-6. – [doi: 10.3109/02699052.2010.541895].

Приложение А (обязательное)

1 группа. Зависимость выживаемости от пола (1/2)



H0 = пол не влияет на выживаемость

H1 = пол влияет на выживаемость

Chi-Square Test for Association: группа выживаемости; пол

Rows: группа выживаемости Columns: пол

	1	2	All
1	30	12	42
	30,732	11,268	
2	5	1	6
	4,890	1,610	
3	17	7	24
	17,561	6,439	
4	8	2	10
	7,817	2,683	
All	60	22	82

Cell Contents
Count
Expected count

Chi-Square Test

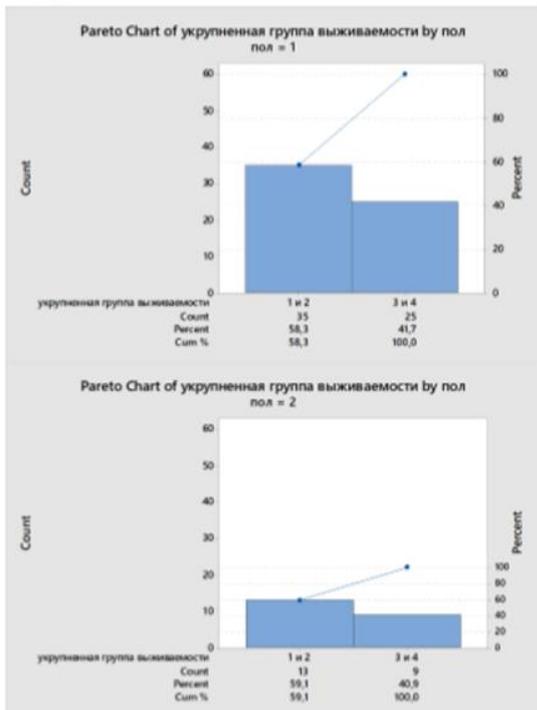
	Chi-Square	DF	P-Value
Pearson	0,685	3	0,877
Likelihood Ratio	0,731	3	0,866

2 cells with expected counts less than 5.

Вывод: P-Value>0.05, поэтому пол не влияет на выживаемость, в то же время по 2 группам выживаемости имеются значения меньше 5, что делает данный анализ менее достоверным. Укрупним группы выживаемости

Рисунок А.1 – Зависимость группы выживаемости от пола (1-я, 2-я группы)

1 группа. Зависимость выживаемости от пола (2/2)



H0 = пол не влияет на выживаемость

H1 = пол влияет на выживаемость

Chi-Square Test for Association: укрупненные группы выживаемости и пол

Rows: укрупненная группа выживаемости Columns: пол

	1	2	All
1 и 2	35	13	48
	35,12	12,88	
3 и 4	25	9	34
	24,88	9,12	
All	60	22	82

Cell Contents
Count
Expected count

Chi-Square Test

	Chi-Square	DF	P-Value
Pearson	0,004	1	0,951
Likelihood Ratio	0,004	1	0,951

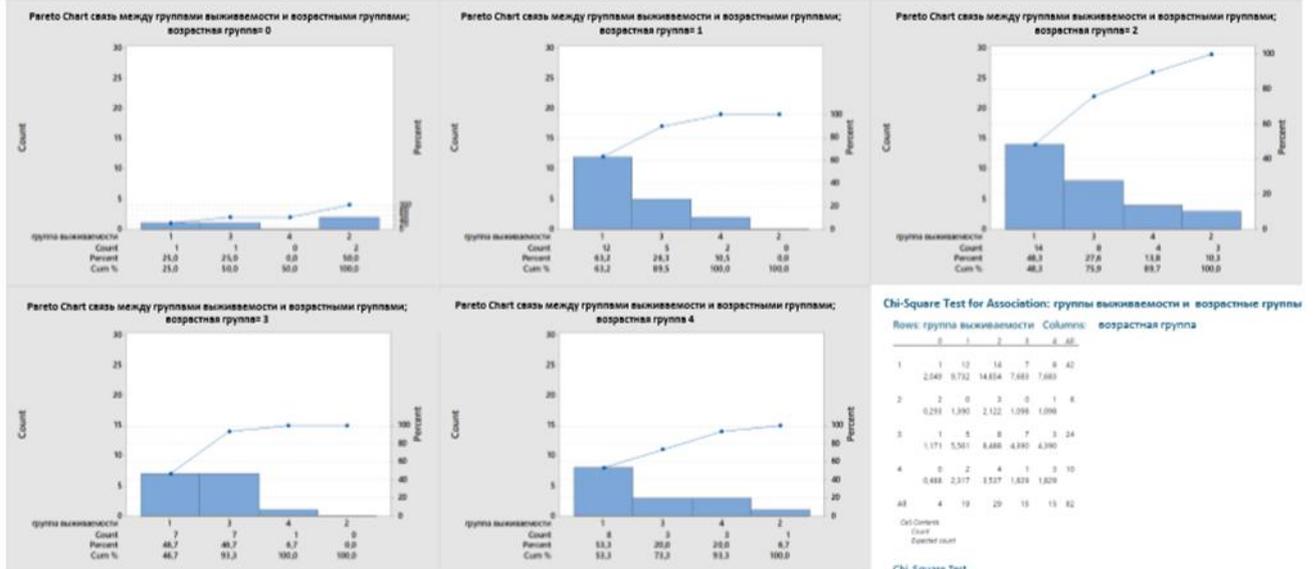
Вывод: P-Value>0.05, поэтому пол не влияет на выживаемость. Это подтверждается и в укрупненных группах выживаемости

Рисунок А.2 – Зависимость группы выживаемости от пола (1-я, 2-я группы, укрупненные)

1 группа. Зависимость выживаемости от возраста (1/2)

H0 = возраст не влияет на выживаемость

H1 = возраст влияет на выживаемость



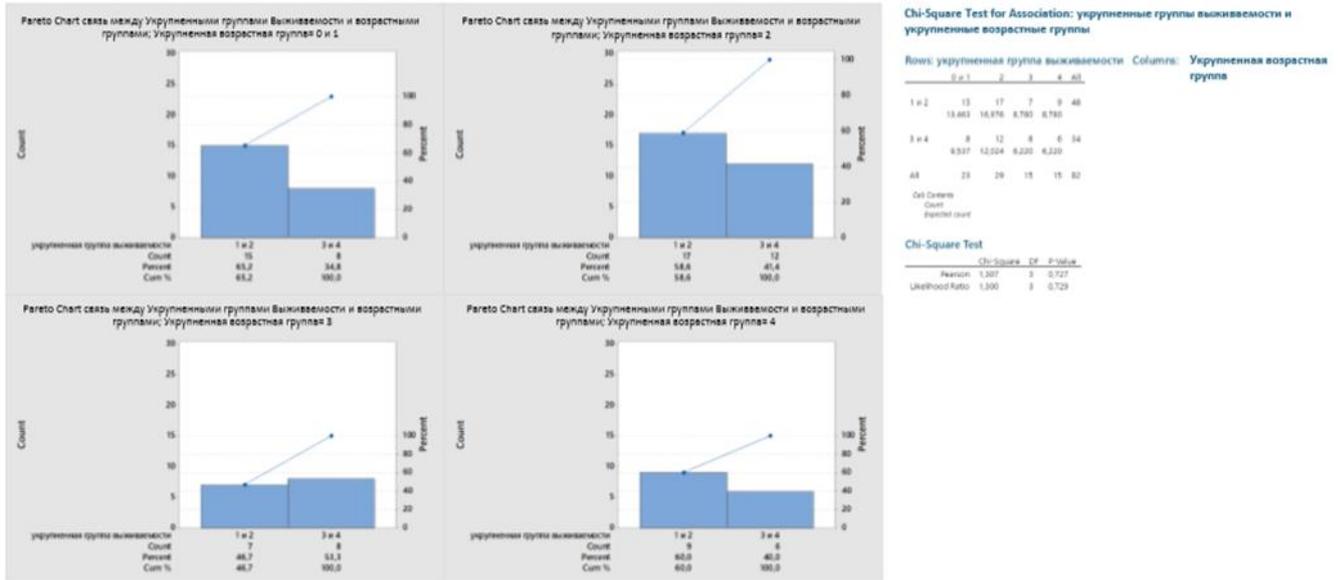
Вывод: Учитывая ничтожное количество в 0 возрастной группе, присоединим ее к первой и воспользуемся укрупненными группами выживаемости

Рисунок А.3 – Анализ групп возраста и выживаемости

1 группа. Зависимость выживаемости от возраста (2/2)

H0 = возраст не влияет на выживаемость

H1 = возраст влияет на выживаемость



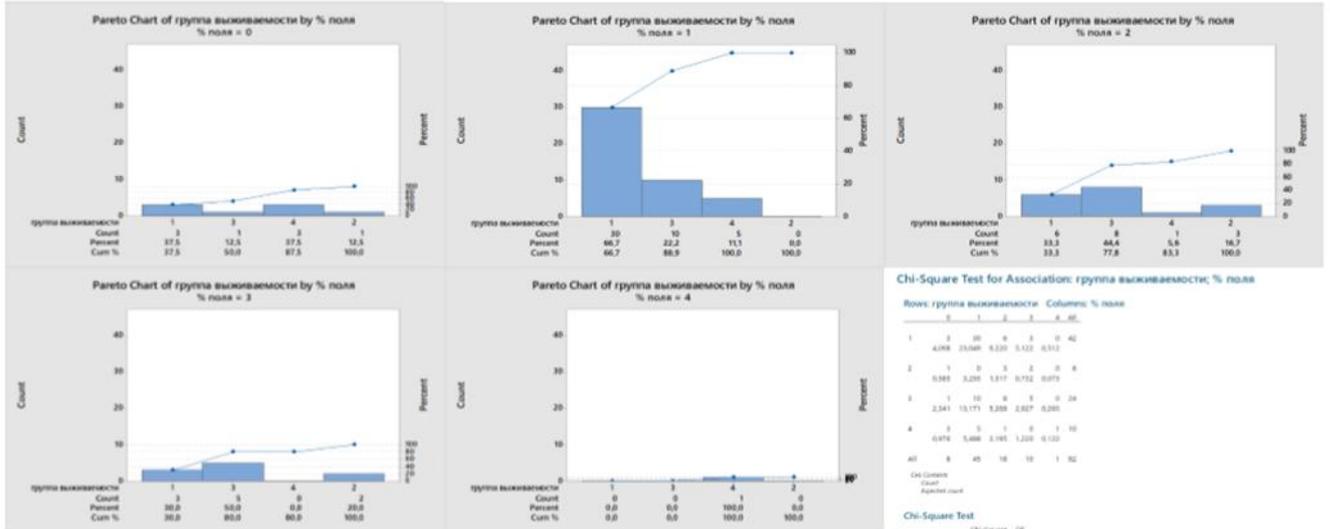
Вывод: P-Value>0.05, поэтому возраст не влияет на выживаемость. Графический анализ также подтверждает этот вывод

Рисунок А.4 – Анализ групп возраста и выживаемости (укрупненные)

1 группа. Зависимость выживаемости от % поля (1/2)

H0 = % поля не влияет на выживаемость

H1 = % поля влияет на выживаемость



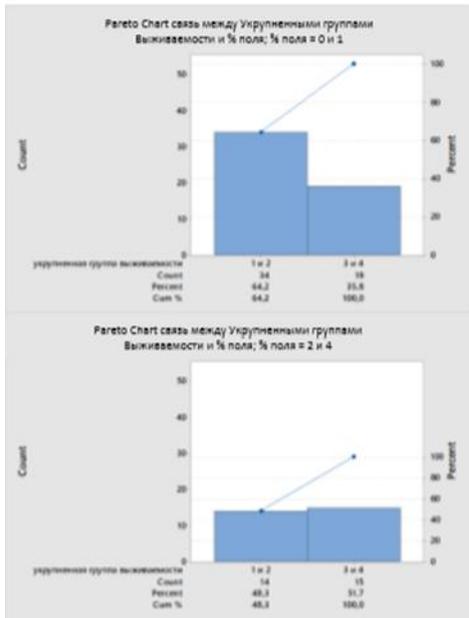
Также необходимо укрупнение групп в силу ничтожного количества людей с 0, 3 и 4 группой % поля. 0 присоединим к 1, 3 и 4 – к 2.

Рисунок А.5 – Анализ связи выживаемости и площади окраски поля зрения

1 группа. Зависимость выживаемости от % поля (2/2)

H0 = % поля не влияет на выживаемость

H1 = % поля влияет на выживаемость



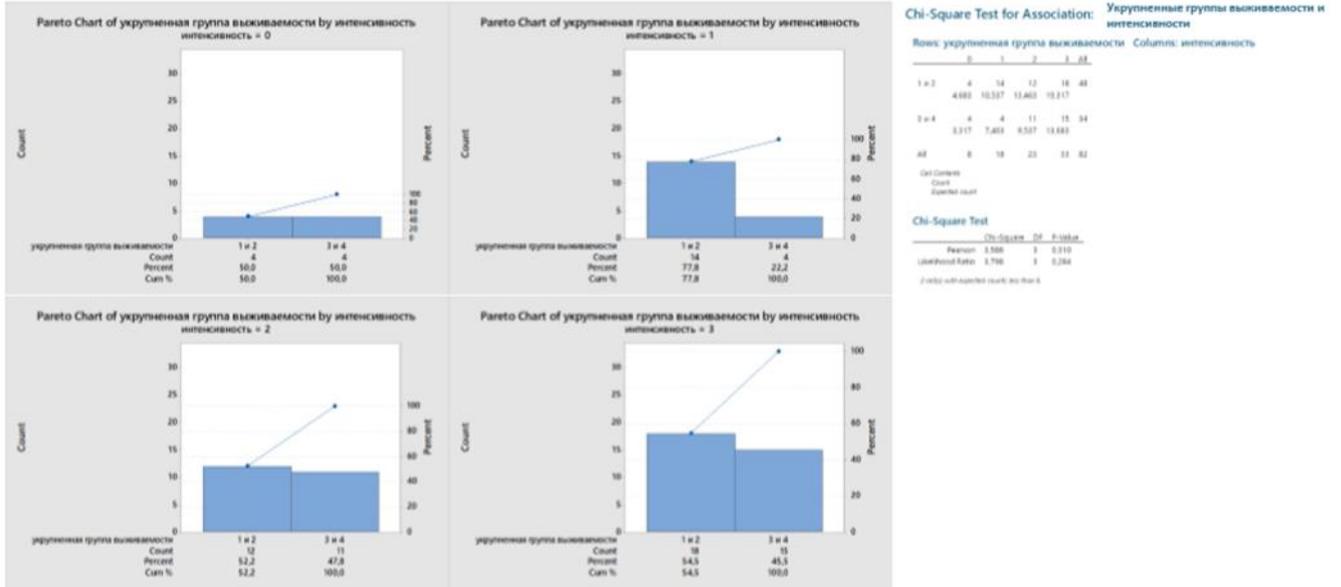
Вывод: визуально графики показывают, что чем выше группа процента поля, тем выше группа выживаемости, однако статистически это не подтверждается, т.к. P-Value>0.05

Рисунок А.6 – Анализ связи выживаемости и площади окраски поля зрения (укрупненные)

1 группа. Зависимость выживаемости от интенсивности (1/2)

H0 = интенсивность не влияет на выживаемость

H1 = интенсивность не влияет на выживаемость



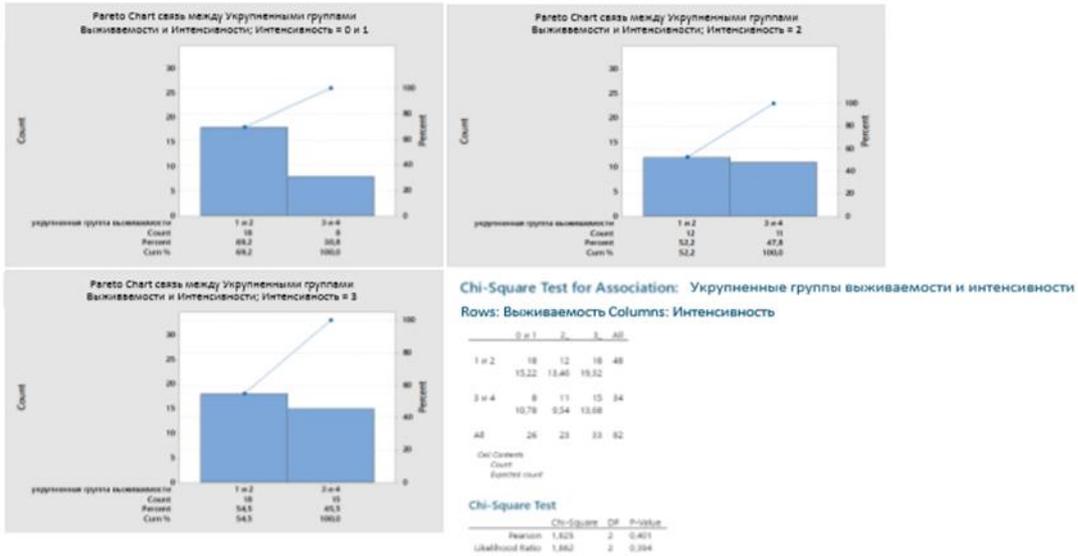
Вывод: P-Value>0.05, в то же время для статистической достоверности необходимо объединить 0 и 1 группу интенсивности.

Рисунок А.7 – Анализ интенсивности окраски и выживаемости

1 группа. Зависимость выживаемости от интенсивности (2/2)

H0 = интенсивность не влияет на выживаемость

H1 = интенсивность не влияет на выживаемость



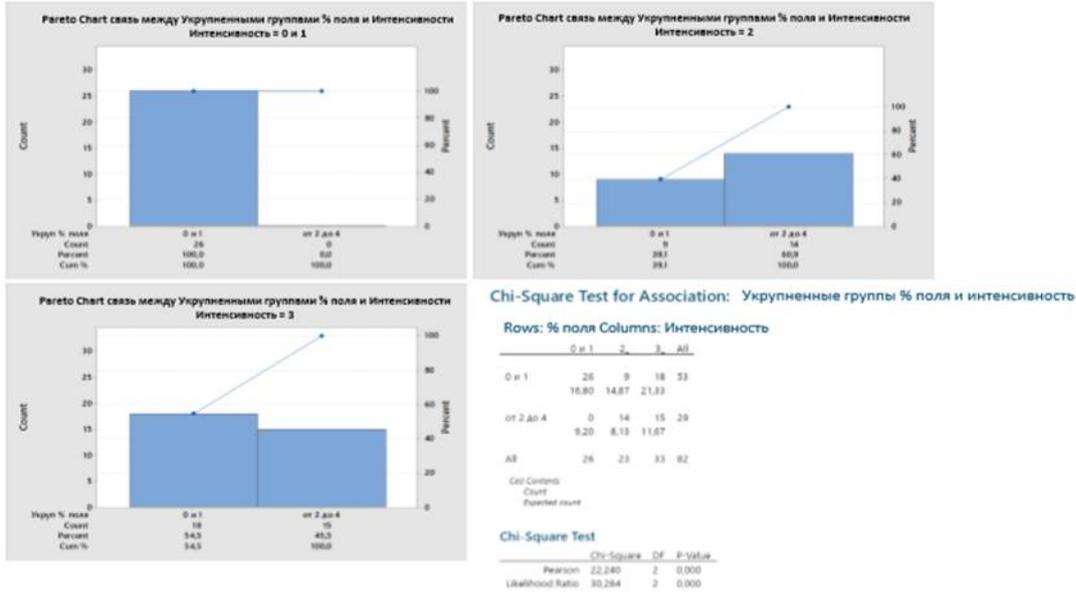
Вывод: P-Value>0.05, интенсивность не влияет на выживаемость, что также подтверждается графическим анализом

Рисунок А.8 – Анализ интенсивности окраски и выживаемости (укрупненные)

1 группа. Связь % поля и интенсивности

H0 = % поля и интенсивность не связаны

H1 = % поля и интенсивность взаимосвязаны



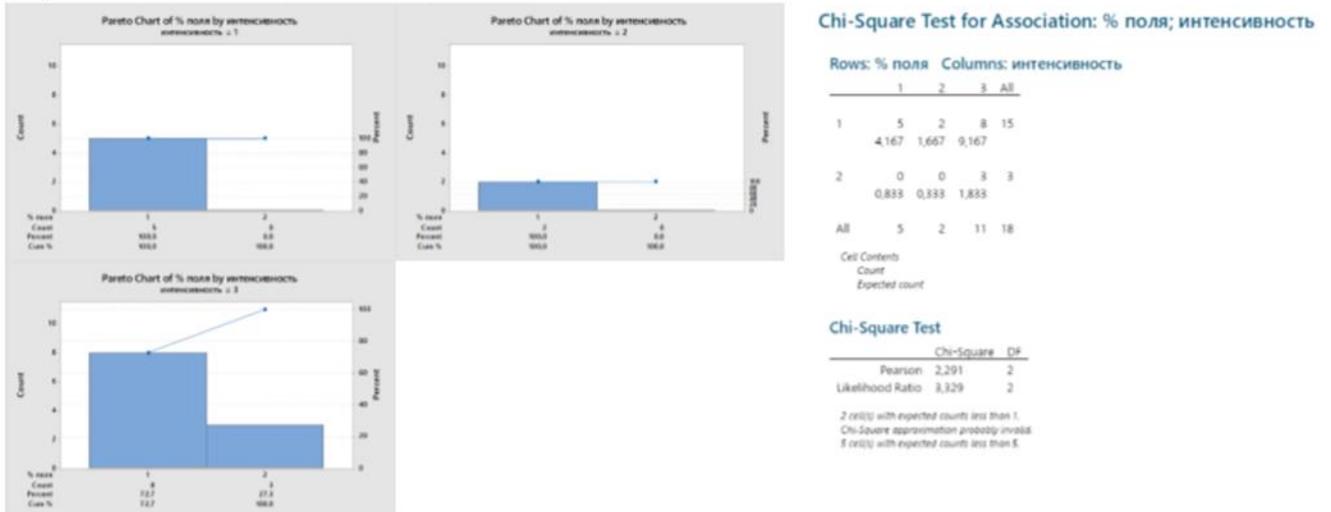
Вывод: P-Value<0.05, % поля и интенсивность связаны между собой. Графический анализ показывает, что чем выше группа интенсивности, тем выше группа % поля.

Рисунок А.9 – Анализ интенсивности окраски и площади поля зрения

2 группа. Экспресс-анализ отличия от 1 группы

Выборка представлена 18 записями, 17 из которых имеют 1-ю группу выживаемости, поэтому дополнительный анализ влияния факторов на группу выживаемости нецелесообразен.

Оценим взаимное влияние % поля и интенсивности.



Вывод: У второй группы, как и у первой статистически не подтверждено влияние на группы выживаемости ни одного из факторов. Разница в причинах: если у первой группы отсутствие влияния удалось подтвердить статистически, то по второй группе это невозможно сделать в силу ничтожной выборки и доминирования в ней выживаемости 1-й группы. По аналогичным причинам не подтверждена взаимосвязь % поля и интенсивности.

Рисунок А.10 – Анализ влияния площади окраски поля зрения и интенсивности