

**ШАЙ АЛИСА НИКОЛАЕВНА**

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

3.3.5 Судебная медицина (медицинские науки)

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Москва – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации на кафедре судебной медицины и медицинского права.

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук,  
профессор

**ШИГЕЕВ**

**Сергей Владимирович**

**Официальные оппоненты:**

**Ягмуров Оразмурад Джумаевич** - доктор медицинских наук, профессор, начальник ГБУЗ «Бюро судебно-медицинской экспертизы» г. Санкт-Петербург

**Максимов Александр Викторович** - доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры фундаментальных медицинских дисциплин ФГАОУ ВО «Государственный университет просвещения»

**Кульбицкий Борис Николаевич** - кандидат медицинских наук старший научный сотрудник Научно-исследовательского института морфологии человека им. академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии им. академика Б.В. Петровского»

Защита состоится: « 04 » июня 2024 года в 11 часов на заседании диссертационного совета ПДС 0300.011 ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов» (г.Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6) и на сайте <https://www.rudn.ru/science/dissovet>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат медицинских наук

**Романова Ольга Леонидовна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность темы исследования**

Судебно-гистологическая диагностика диффузного повреждения головного мозга является одной из наиболее актуальных и сложных проблем судебно-медицинской экспертизы черепно-мозговой травмы (ЧМТ). Важность этого направления исследований определяется значительной частотой развития одной из тяжёлых форм черепно-мозговой травмы - диффузного аксонального повреждения (ДАП) (при 40-50% всех ЧМТ, главным образом травмах ускорения-замедления) и тяжестью последствий вследствие высокой смертности (более 50%) и нередкой инвалидизации пострадавших [Сафронова Е. С., 2013, Blennow K, Brody DL, Kochanek P M, Levin H, Mc Kee A, Ribbers GM, Yaffe K, Zetterberg H. Traumatology, 2016]

В классическом варианте считается, что диффузное травматическое повреждение головного мозга не сопровождается очагами его ушиба или внутричерепными гематомами [Ware J.B., Hart T., Whyte J., Rabinowitz A., Detre J.A., Kim J. Inter-Subject Variability of Axonal Injury in Diffuse Traumatic Brain Injury // J Neurotrauma, 2017]. Однако, по мнению Е. F. Aldrich и соавт. (1996 г.) и С. Ю. Касумовой (2001 г.), и ушибы мозга, и внутричерепные гематомы также закономерно могут сопровождаться его диффузным повреждением [Adams J.H., Graham D.I., Gennarelli T.A. Baetmann, K.O. Go, A. Unterberd, 1986]

Диффузное 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 таковой. 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. В единичных случаях в поздние сроки посттравматического периода возможен выход из комы, регресс очаговой и общемозговой неврологической симптоматики [Пиголкин Ю.И., Дубровин И. А., Леонов С. В., Горностаев Д.В., 2018]

### **Степень разработанности темы исследования**

Применяемые в настоящее время в практике судебно-гистологических исследований традиционные методы диагностики диффузного повреждения головного мозга, 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 т.ч. по определению давности и травматической этиологии аксональных повреждений, особенно при незначительности макроскопических изменений), что создаёт объективные предпосылки для экспертных ошибок, и, в свою очередь, свидетельствует о безусловной актуальности подобной работы.

Исследования в данном направлении перспективны также в отношении изучения механизмов развития (патогенеза) диффузных повреждений нейронов и их отростков травматического генеза, ранее связываемых исключительно с т. н.

первичной (т.е. возникающей непосредственно в момент травматического воздействия) аксотомией. Вместе с тем данные экспериментальных наблюдений последних лет свидетельствуют о значимой патогенетической роли отсроченных повреждений аксонов (т.н. «вторичной» аксотомии), обусловливаемых нарушениями протеолитической деградации повреждённых белков цитоскелета. В этой связи результаты иммуногистохимического изучения белков-маркеров функционального состояния систем внутриклеточного протеолиза (убиквитиновой протеасомальной и аутофагической лизосомальной) на материале судебно-медицинских вскрытий могут оказаться востребованными в исследованиях по определению потенциальных мишеней таргетной терапии ДАП головного мозга при ЧМТ.

#### **Цель исследования**

С помощью ИГХ метода исследовать  $\beta$  - 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  $\beta$  - APP белка при ИГХ исследовании аксонального повреждения при ЧМТ.

4. Проанализировать наличие связей между выявленными критериями экспрессии  $\beta$  - APP пептида и такими показателями, как пол, возраст, срок переживания после травмы.

5. Установить закономерности между выявленными критериями экспрессии  $\beta$  - 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 исследования**

1. Впервые в Российской Федерации выполнено комплексное исследование, в результате которого проведена оценка экспрессии  $\beta$  - APP белка при аксональном повреждении, сопровождающем черепно-мозговую травму, установлены дифференциальные признаки экспрессии  $\beta$  - APP белка в случаях смерти, не связанных с черепно-мозговой травмой.

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

3. Установлены этапные закономерности изменений экспрессии  $\beta$  - APP белка при аксональном повреждении в различные сроки после травмы.

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

#### **Теоретическая и практическая значимость исследования**

Применительно к целям и задачам судебно-медицинской экспертизы обоснован и предложен метод ИГХ диагностики накопления  $\beta$  - 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 диссертационного 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 собственного 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 диссертации, выносимые на защиту**

1. Выявление  $\beta$  - 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  $\beta$  - APP белка.

3. Диагностические алгоритмы экспрессии  $\beta$  - 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  $\beta$  - APP белок.

5. Дифференциальная диагностика повреждения вещества головного мозга нетравматического генеза.

#### **Связь работы с научными планами и программами**

Диссертационное исследование одобрено Межвузовским Комитетом по этике при ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» (протокол заседания № 05-22 от 19.05.2022 г.).

Тема диссертации утверждена на заседании Ученого совета лечебного факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России (протокол № 2 от 15 сентября 2022 г.).

#### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Все научные положения диссертации полностью соответствуют паспорту специальности 3.3.5. – Судебная медицина (медицинские науки).

#### **Степень достоверности результатов исследования**

Достоверность результатов диссертационной работы подтверждается достаточным объемом проанализированных данных, результатами их

статистического анализа, а также внедрением результатов работы в практическую работу судебно-гистологических отделений и практику кафедр судебной медицины медицинских вузов. Основные положения работы были доложены, обсуждены и одобрены на 15 научных конференциях и получили отражение в 13 научных публикациях, 7 из которых опубликованы в изданиях, рецензируемых в международных базах Scopus/WoS и в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России/изданиях из Перечня РУДН.

#### **Апробация диссертации**

Диссертационная работа апробирована и рекомендована к защите на совместном заседании кафедры судебной медицины и медицинского права ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России (протокол № 2 от 14 сентября 2023 г.).

**Материалы диссертационного исследования доложены и обсуждены на следующих научных мероприятиях:**

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 2016г.), на Международном конгрессе и научно-практической школе "Актуальные вопросы судебной медицины и экспертной практики – 2018" (г. Москва, "МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского", апрель 2018г.) и на VIII Всероссийском съезде судебных медиков с международным участием" и Достижения российской судебно-медицинской науки XX-XXI столетия: к 100-летию со дня образования современных судебно-экспертных школ" (г. Москва, ноябрь, 2018г), а также на научно-практических конференциях государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы "Бюро судебно-медицинской экспертизы Департамента здравоохранения города Москвы" 2020 - 2023гг.

#### **Реализация результатов исследования**

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 2015-2017гг. 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 на базе ФГБУ "РЦСМЭ" Минздрава России утверждены методические рекомендации – "Судебно-медицинская оценка  $\beta$ -APP белка – маркера аксонального повреждения головного мозга при смерти от черепно-мозговой травмы гистологическими и иммуногистохимическими методами"

#### **Личное участие 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 диссертационного исследования опубликовано 13 научных работ, в том числе 7 в журналах, рекомендованных ВАК при Министерстве образования и науки Российской Федерации для публикации материалов диссертационных исследований. Из них 3 статьи опубликованы в журнале, входящем в базу данных Scopus.

### **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 отечественных источников и 148 зарубежных источников.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

#### **Материал проводимых исследования и его объем**

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 (табл. 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 так же 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.

Табл. 1

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

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. 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

Фрагменты головного мозга вырезали толщиной до 1 см и площадью не менее 1,5×1,5см. 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<sup>0</sup> до +5<sup>0</sup> С.

В качестве фиксатора использовали 10%-ный 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. Touralík P., Bouska I., Jezková J. в своей статье о влиянии аутолитических изменений на возможность гистохимического исследования ЦНС доказали сохранность белка до начала фиксации в течение 7 суток, то есть фиксация может быть начата в пределах 7 суток после взятия материала. Тем не менее, для исключения возможных искусственных эффектов, в нашей работе мы придерживались канонического времени фиксации, составляющего не более 48 часов.

## **Методы исследования**

**Секционное исследование.** 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).

**Гистологическое исследование.** 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<sup>0</sup>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<sup>0</sup>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.

**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 стандартному протоколу: При ИГХ окрашивании использовали антитела к  $\beta$ -APP белку в разведении 1:500 (фирма "Abcam"). Для постановки ИГХ - реакций использовали иммуностейнер модель «Autostainer Link 48» фирмы «ДАКО». Осуществлялась полуколичественная оценка площади окраски поля зрения, для каждой градации использованы цифры от 0 до 4. Для достоверности полученных результатов в каждом препарате оценивали 10 различных полей зрения при увеличении 200 и фиксировали средний результат. Оценка интенсивности реакции осуществлялась с применением полуколичественного метода путем градации от 0 до 3 баллов. Данная методика оценки полученных ИГХ результатов была предложена Кононовым А. В. и соавт. (2014), при оценке ИГХ реакции при исследовании гастробиоптатов.

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

## **ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

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

### **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. 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. 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.

## **2. Судебно-медицинская характеристика гистологических изменений мозга при ДАП, окраска гематоксилином и эозином**

В первые 3 суток в зонах повреждения белого вещества обнаруживаются множественные аксональные шары – морфологический субстрат ДАП. 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.

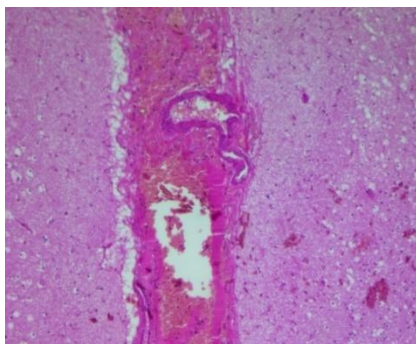
Вблизи аксональных шаров аксоны имели признаки начальной дегенерации, были неровными, набухшими, неравномерно воспринимали окраску. К концу первой недели дегенеративные изменения распространялись по всей длине поврежденного аксона. Нервные волокна имели извитой вид, варикозные утолщения, фрагментировались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

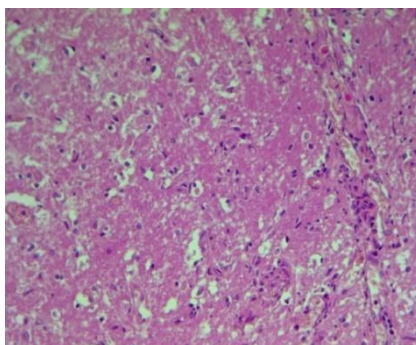
При окраске гематоксилином и эозином не наблюдается специфических изменений, характерных для аксонального повреждения. При исследовании материала данной окраски выявлены следующие изменения: отек вещества головного мозга, полнокровие сосудов, набухание нейронов, гиперхромия и увеличение ядер нейронов,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

При выживаемости после травмы до 3 часов отмечались кровоизлияния в мягкие мозговые оболочки, полнокровие артерий, вен, капилляров, отек вещества головного мозга, отек и разволокнение аксонов, их фрагментация (Рис. 1). При выживаемости после травмы до 24 часов в срезах головного мозга были видны мелкоочаговые кровоизлияния из неизмененных эритроцитов, периваскулярный и периваскулярный отек, множественные диапедезные кровоизлияния, полнокровие артериол. При давности повреждения около 36 суток наблюдалась глиально-

мезенхимальная пролиферация, перичеселлюлярный отек вещества головного мозга (Рис.2).



**Рис. 1.** Подкорковая область, выживаемость после травмы до 3 часов. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 200.



**Рис. 2.** Внутренняя капсула, выживаемость после травмы 36 суток. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 200.

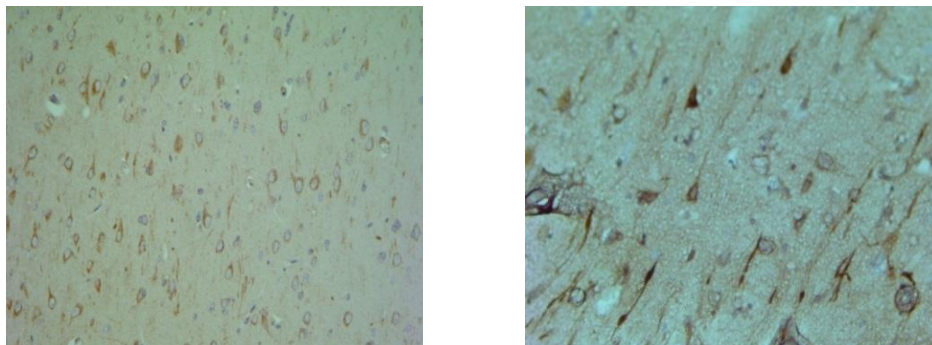
### **3. Иммуногистохимическое исследование ткани мозга при ЧМТ**

С целью проследить динамику накопления и деградации  $\beta$  - APP белка в теле и отростках нейронов, 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 и 4) период деградации  $\beta$  - APP пептида, который начинается с 14 дня периода выживания от острого состояния.

#### **Иммуногистохимическое исследование ткани мозга при ЧМТ, срок выживаемости до 3 часов**

Период 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), 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.



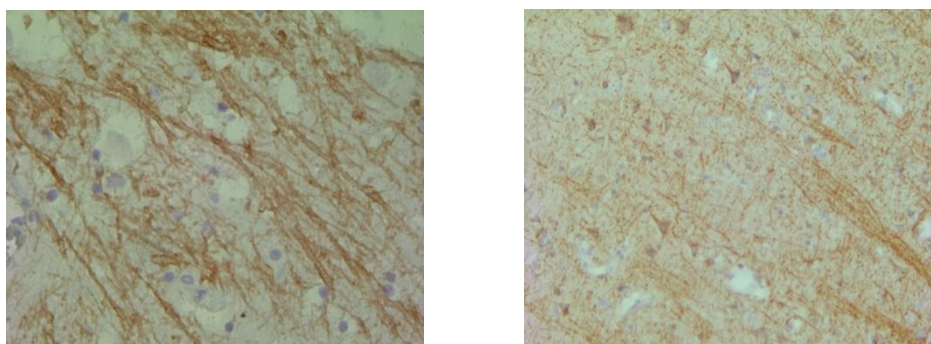
**Рис 3 – 4.** Ствол головного мозга, накопление  $\beta$  – АРР белка в телах нейронов, начальные признаки реакции отростков.

Более того, в одном случае, в различных отделах мозга может наблюдаться различная степень интенсивности окраски, но со сходным количеством окрашенных структур.

Большинство случаев группы выживаемости после травмы до 3-х часов представлена слабой экспрессией белка  $\beta$ -АРР преимущественно в телах нейронов и в незначительной степени в отростках, то есть белок начинает распространяться с тела нейрона на отростки, с количеством прореагировавших структур до 25%. Достоверно установлена связь интенсивности и количеством структур с экспрессией антигена. Случаи этой группы, как правило, проявляли слабовыраженную интенсивность экспрессии антигена (1 балл) и незначительное количество прореагировавших структур (до 25%).

**Иммуногистохимическое исследование ткани мозга при ЧМТ, срок выживаемости до 1 суток.**

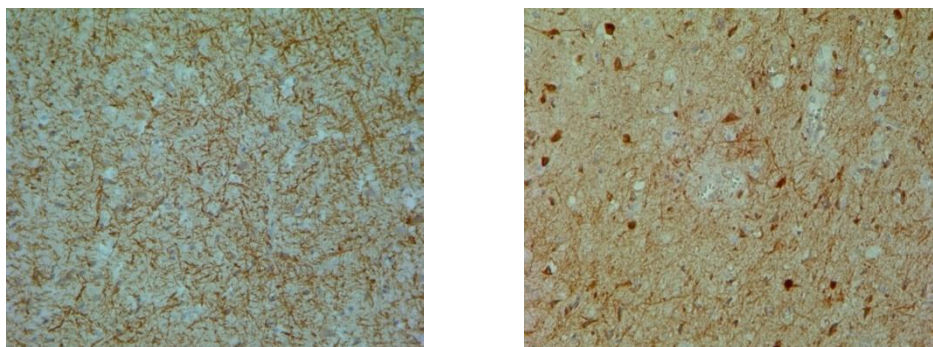
Данный период выживаемости после травмы характеризуется нарастанием уровня  $\beta$ -АРР белка до максимальных значений; случаи характеризуются уже тотальной экспрессией антигена в аксонах, более распространенной реакцией структур (26-50%).



**Рис 5 – 6.** Белое вещество, тотальное накопление  $\beta$  – АРР белка в телах нейронов, отростках, выживаемость 15 часов.

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

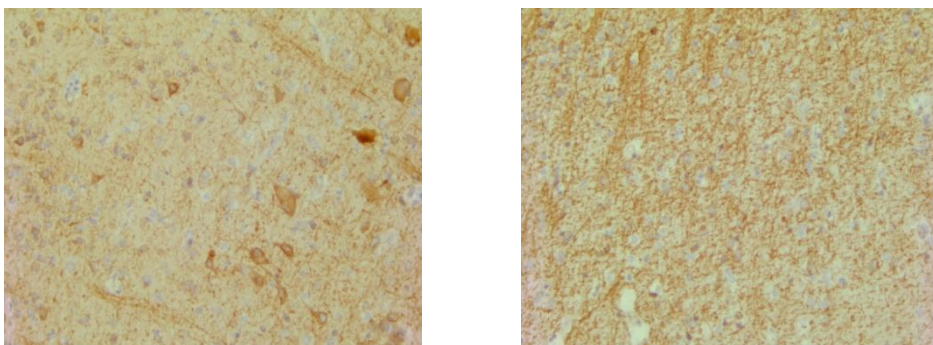
Сохраняется экспрессия белка  $\beta$  – APP с достигнутым максимумом в течение первых суток, поэтому в ряде случаев картина реакции нейронов на маркер напоминает таковую во 2-й период. Однако в ряде случаев можно получить признаки начальной деградации белка – тенденция к гранулярной окраске.



**Рис. 7 - 8.** Белое вещество, тотальное выраженное накопление  $\beta$  – APP белка в телах нейронов, отростках, выживаемость 6 суток после травмы.

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

Реакция на  $\beta$  – 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.

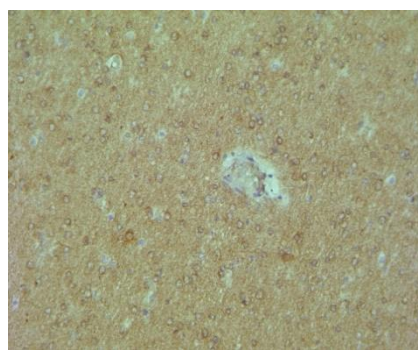
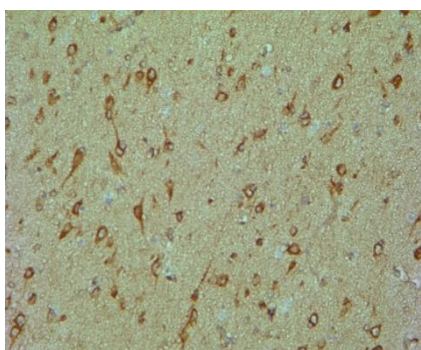


**Рис 9-10.** Белое вещество,  $\beta$  – APP белок в телах нейронов с тенденцией к гранулированию, отростках, выживаемость 36 суток после травмы.

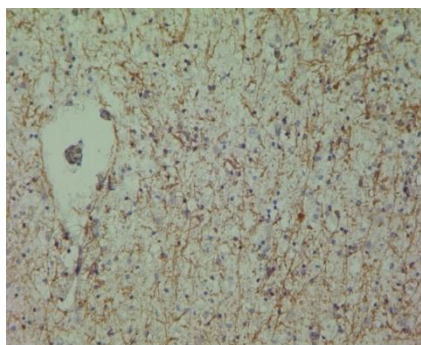
**4. Иммуногистохимическое исследование ткани мозга в случаях смерти, не связанных с травмой головного мозга**

Была изучена реакция на  $\beta$ -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. 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

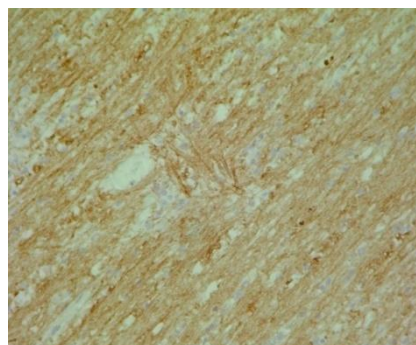
расположения пигмента в случаях травмы. Еще одной чертой, которую следует рассмотреть, можно считать экспрессию антигена преимущественно в отростках нейронов. В одном из случаев в различных участках мозга определяются относительно одинаковая картина, с сохранением диффузной реакции и экспрессии антигена во всех волокнах во всех препаратах. Несмотря на похожесть ИГХ реакции на  $\beta$ -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.



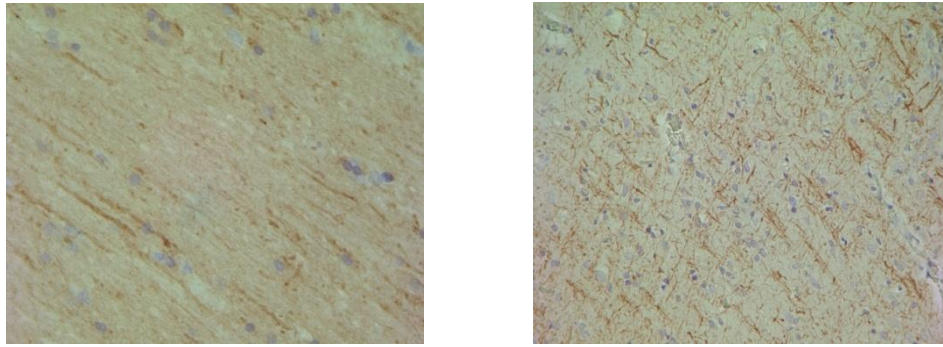
**Рис. 11-12.** Накопление  $\beta$  – APP белка при отравлении наркотиками. Увеличение 200.



**Рис. 13.** Экспрессия  $\beta$  – APP белка при гипертонической болезни. Увеличение 200.



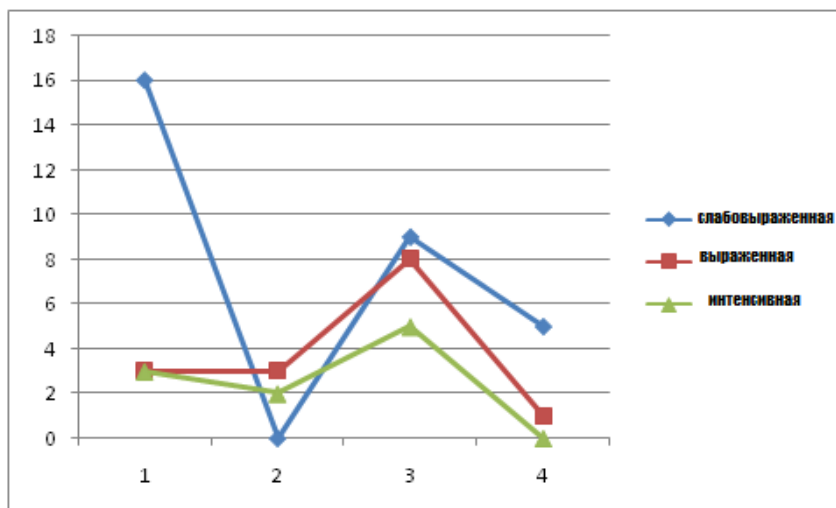
**Рис 14.** Экспрессия  $\beta$  – APP белка при механической асфиксии. Увеличение 200.



**Рис. 15-16.** Накопление  $\beta$  – APP белка при церебро - васкулярной болезни. Увеличение 200.

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

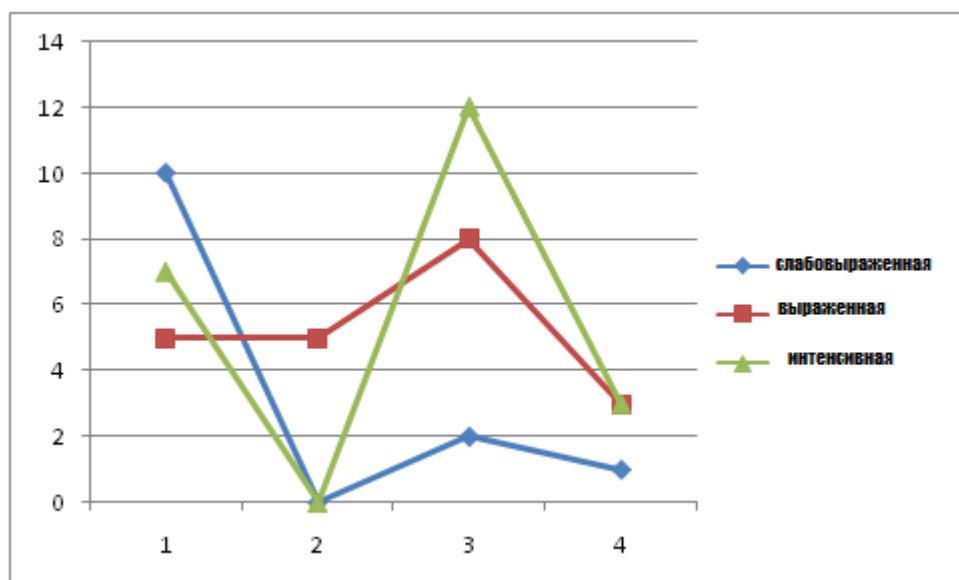
Был проведен анализ выживаемости и количества структур, проявивших экспрессию антигена



**Рис. 17.** Распределение случаев по выживаемости и интенсивности окраски

Согласно графику на рис. 17, 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 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.

По графику общего распределения случаев с различной степенью интенсивности (рис 18), 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  $\beta$ -APP белка.



**Рис. 18.** 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.

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.

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, учитывая ничтожное количество в 0 возрастной группе, присоединим ее к первой и воспользуемся укрупненными группами выживаемости.

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 необходимо укрупнение групп в силу ничтожного количества людей с 0, 3 и 4 группой площади структур в поле зрения, проявивших экспрессию антигена. 0 группу присоединим к 1, 3 и 4 – к 2.

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 необходимо объединить 0 и 1 группу интенсивности.

Вывод:  $P\text{-Value} > 0.05$ , выживаемость не влияет на интенсивность экспрессии, что также подтверждается графическим анализом.

Провели анализ между количеством структур с экспрессией антигена и интенсивностью окраски.

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.



## 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 микроскопические 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. Разнообразие 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. 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 $\beta$  (кальций-связывающий белок, маркер повреждения глиальных клеток), GFAP (глиальный фибриллярный кислый протеин),NSE (нейрон-специфическая енолаза), C-tau белок. Однако использование этих белков имеет свои недостатки, и они не могут быть однозначными показателями аксонального повреждения.

Например, белок S-100  $\beta$  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 $\beta$ , 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. Определяется в астроцитах в норме.

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.

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  $\beta$ -амилоидный предшественник ( $\beta$ -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  $\beta$ -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, 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",  $\beta$  - 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  $\beta$ -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  $\beta$ -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,  $\beta$ -APP белок участвует в быстром аксональном транспорте, при его замедлении происходит накопление  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$  - APP белок, обусловленная сосудистыми осложнениями при повышении внутричерепного давления, хотя морфологические изменения при этом могут быть неразличимы. Поэтому интерпретация любого положительного  $\beta$  - 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 глии 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 повреждении:

формирование аксональных шаров, деструкция белого вещества, реакция астроцитов и клеток мелкой глии.

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

Результаты нашего исследования позволяют считать  $\beta$  - 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 белом веществе головного мозга, в мягких мозговых оболочках, при переживаемости травмы 6-12 часов - "аксональные шары").

**2.** Установлено, что  $\beta$  - 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  $\beta$  - APP белка и сроком выживания после травмы.

**4.** Установлена закономерность картины распределения  $\beta$  - 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 установления 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  $\beta$  - 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  $\beta$ -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: (0 - отсутствие, 1 балл –1-25%, 2 балла - 26-50%, 3 балла - 51-75%, 4 балла - 76% -100%) позитивно среагировавших клеток.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. 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.
2. 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.**
3. 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.
4. 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.**
5. Шай А.Н. Морфология аутолиза нервной ткани и его влияние на результаты выявления  $\beta$ -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.
6. Шай А. Н. Трудности интерпретации результатов иммуногистохимического исследования  $\beta$  - 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.
7. 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.**
8. 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.
9. 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. №1. Т-63. - М., 2020 .- С. 53-55.**
10. Шай А.Н. Динамика экспрессии  $\beta$ -APP белка при иммуногистохимическом исследовании в случаях черепно-мозговой травмы в зависимости от срока выживания/ **А. Н. Шай**// Материалы Международного конгресса " Актуальные вопросы судебной медицины и экспертной практики - 2019", 17-19 апреля 2019 года, Москва, под редакцией проф. В.А. Клевно, М., 2019.- С 79-80.

11. 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, Д. В. Горностаев, Г.Ю. Сахаров// **Вестник судебной медицины. №3. Т-12.-М, 2023.- С. 36-41**
12. Шай А.Н. Морфологическая и иммуногистохимическая оценка белого вещества головного мозга при ожоговой травме / Д. П. Березовский, А.Н. Шай, Н. С. Оганесян, С. В. Шигеев, Д. В. Горностаев, Ю. И. Пиголкин, А. Э. Боронтова// **Вестник судебной медицины. №4. Т-9.-М, 2020.- С. 19-23.**
13. Шай А. Н. Изменения в нервной системе и во внутренних органах при термической травме / Д. П. Березовский, Н. С., А. Н. Шай, Н. С. Оганесян, С. В. Шигеев, Д. В. Горностаев, Ю. И. Пиголкин // **Вестник судебной медицины. №1. Т-10.-М, 2021.- С. 44-49.**

## **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

ЧМТ – черепно-мозговая травма

ДАП – диффузное-аксональное повреждение

ИГХ – иммуногистохимия

$\beta$  – APP белок – белок предшественник  $\beta$  – амилоида

C-tau–фрагмент расщепленного с помощью протеолитических ферментов протеина

MAP-tau (microtubule-associated protein tau)

GFAP - глиальный фибриллярный кислый протеин

MAP-tau (microtubule-associated protein tau) – структурный белок цитоскелета нейронов, локализуется в аксонах, где принимает участие в формировании микротрубочек

NSE – нейрон-специфическая енолаза

S-100  $\beta$ –кальций – связывающий белок, маркер повреждения глиальных клеток

## **АННОТАЦИЯ**

**кандидатской диссертации Шай А. Н. на тему «Судебно-медицинская оценка белков – маркеров диффузного аксонального повреждения головного мозга при смерти от черепно-мозговой травмы»**

Диссертационное исследование заключается в изучении белка-маркера повреждения вещества головного мозга, появляющегося в ранние сроки после черепно-мозговой травмы с помощью иммуногистохимического метода исследования и выявлению достоверных информативных иммуногистохимических критериев аксонального повреждения в различные периоды выживания после получения ЧМТ. Определены критерии оценки экспрессии  $\beta$  - APP белка при ИГХ исследовании аксонального повреждения при ЧМТ. Проанализирована связь между выявленными критериями экспрессии  $\beta$  - APP пептида и такими показателями, как пол, возраст, срок переживания после травмы. Установлена закономерность между выявленными критериями экспрессии  $\beta$  - APP белка при ИГХ реакции и сроком выживаемости после травмы.

Разработаны практические рекомендации по применению гистологических и иммуногистохимических критериев при диагностике аксонального повреждения головного мозга, которые помогут определить наличие черепно-мозговой травмы при отсутствии или минимально выраженных макроскопических изменениях в веществе головного мозга или при их отсутствии. Обоснован и предложен метод иммуногистохимической диагностики накопления  $\beta$ -APP белка в нейронах и отростках, возникающего как следствие аксонального повреждения при черепно-мозговой травмы, так и в результате нарушения кровообращения, не связанного с травмой головного мозга.

#### **ABSTRACT**

##### **Ph D thesis by A. N. Shai on the topic "Forensic assessment of proteins – markers of diffuse axonal brain damage in death from traumatic brain injury"**

The dissertation research consists of studying a protein marker of damage to the brain substance that appears in the early stages after traumatic brain injury using an immunohistochemical research method and identifying reliable informative immunohistochemical criteria for axonal damage in various periods of survival after receiving a TBI. Criteria for assessing the expression of  $\beta$  - APP protein in the IHC study of axonal damage in TBI have been determined. The relationship between the identified criteria for the expression of  $\beta$  - APP peptide and such indicators as gender, age, and period of experience after injury was analyzed. A pattern has been established between the identified criteria for the expression of  $\beta$  - APP protein in the IHC reaction and the period of survival after injury.

Practical recommendations have been developed for the use of histological and immunohistochemical criteria in the diagnosis of axonal brain damage, which will help determine the presence of traumatic brain injury in the absence or minimally expressed macroscopic changes in the substance of the brain or in their absence. A method for immunohistochemical diagnosis of  $\beta$ -APP protein accumulation in neurons and processes, which occurs as a consequence of axonal damage during traumatic brain injury and as a result of circulatory disorders not associated with brain injury, has been substantiated and proposed.