



UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ LEGALĂ



***ROLUL INVESTIGAȚIEI MEDICO-LEGALE ÎN DIAGNOSTICUL,
PROGNOSTICUL ȘI ELUCIDAREA MOMENTULUI TRAUMATIC ÎN
TRAUMATOLOGIA CRANIO-CEREBRALĂ***

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Conducător de doctorat:
PROF. UNIV. DR. BELIȘ VLADIMIR**

**Doctorand:
DUNCEA-BORCA (DUNCEA) ROXANA MARIA**

Cuprins

| | |
|---|-----------|
| Introducere..... | 7 |
| I.Partea generală..... | 12 |
| 1.Clasificări ale traumatismelor cranio-cerebrale..... | 12 |
| 1.1. Clasificarea TCC după topografia și aspectul macroscopic al leziunilor cerebrale | 12 |
| 1.2. Clasificarea TCC în funcție de mecanismul de producere | 12 |
| 1.3. Clasificarea în funcție de intensitatea TCC | 12 |
| 1.4. Clasificarea leziunilor cerebrale difuze | 13 |
| 1.5. Clasificarea TCC în funcție de criteriile cronologice..... | 13 |
| 2. Leziuni traumatice ale oaselor craniene..... | 14 |
| 2.1.Particularități anatomice și fizice ale craniului | 14 |
| 2.2.Biomecanica fracturilor craniene..... | 15 |
| 2.3.Clasificarea fracturilor craniene | 16 |
| 2.4.Stabilirea caracteristicilor vitale ale focarelor de fractură..... | 18 |
| 3. Leziuni traumatice meningo-cerebrale..... | 20 |
| 3.1.Efecte traumatice cerebrale imediate..... | 20 |
| 3.1.1.Comoția cerebrală..... | 20 |
| 3.1.2.Contuzia cerebrală | 21 |
| 3.1.3.Leziunile axonale difuze..... | 22 |
| 3.1.4.Dilacerarea cerebrală | 29 |
| 3.1.5.Plăgile cranio-cerebrale și fistulele de lichid cerebro-spinal..... | 31 |
| 3.1.6.Hematomul extradural | 34 |
| 3.1.7.Hematomul subdural..... | 39 |
| 3.1.8.Hematomul intradural..... | 48 |
| 3.1.9.Hemoragia subarahnoidiană | 50 |
| 3.1.10.Hematomul intraparenchimos cerebral..... | 52 |
| 3.1.11.Edemul cerebral..... | 54 |
| 3.2. Efecte posttraumatice tardive ale traumatismelor cranio-cerebrale | 58 |
| 3.2.1.Epilepsia posttraumatică..... | 58 |
| 3.2.2.Encefalopatia posttraumatică..... | 61 |
| 3.2.2.1 Encefalopatia cronică posttraumatică..... | 63 |
| 4. Particularități ale traumatismelor cranio-cerebrale la copii..... | 67 |
| 4.1.Fracturile craniene | 67 |
| 4.2.Hematoamele cerebrale | 68 |

| | |
|--|------------|
| 4.3. „Sindromul copilului scuturat” | 69 |
| 5. Mecanisme fizio-patologice implicate în dezvoltarea leziunilor cerebrale..... | 76 |
| 5.1. Reacția inflamatorie cerebrală posttraumatică | 76 |
| 5.1.1. Răspunsul inflamator celular | 76 |
| 5.1.2. Răspunsul inflamator neurogenic | 77 |
| 5.1.3. Activarea celulelor microgliale și macrofagice | 78 |
| 5.1.4. Studiul imunohistochimic al inflamației cerebrale posttraumatice | 80 |
| 5.2. Apoptoza cerebrală posttraumatică | 81 |
| 5.2.1. Rolul caspazelor în declanșarea morții celulare programate | 82 |
| 5.2.2. Caspaza 3 mediator al apoptozei neuronale | 84 |
| 5.3. Astrocitoza reactivă posttraumatică..... | 85 |
| 5.3.1. Investigarea imunohistochimică a astrocitozei reactive | 85 |
| 5.3.2. Modificări evolutive specifice astrocitozei reactive posttraumatice | 86 |
| II. Partea specială | 89 |
| 6. Contribuții privind principalele tipuri de fracturi craniene decelate necrotic și neevidențiate la examenul CT cranian | 89 |
| 6.1. Introducere..... | 89 |
| 6.2. Material și metodă | 90 |
| 6.3. Rezultate | 92 |
| 6.4. Concluzii..... | 101 |
| 7. Considerații privind cazurile de traumatisme cranio-cerebrale autopsiate în cadrul SJML Teleorman..... | 103 |
| 7.1. Introducere..... | 103 |
| 7.2. Material și metodă | 104 |
| 7.3. Rezultate | 104 |
| 7.4. Concluzii..... | 143 |
| 8. Contribuții privind diagnosticul IHC al TCC în funcție de momentul decesului posttraumatic | 146 |
| 8.1. Introducere..... | 146 |
| 8.2. Material și metodă | 146 |
| 8.2.1. Colorarea secțiunilor..... | 152 |
| 8.2.1.1. Tehnica uzuală de colorare a secțiunilor cu Hematoxin-Eozină | 152 |
| 8.2.1.2. Tehnica imunohistochimică de colorare a secțiunilor | 152 |
| 8.2.2. Examinarea microscopică..... | 154 |
| 8.2.2.1. Colorația standard Hematoxin-Eozină | 154 |

| | |
|---|------------|
| 8.2.2.2. Colorația imunohistochimică..... | 156 |
| 8.2.3. Analiza statistică..... | 157 |
| 8.3. Rezultate..... | 158 |
| 8.3.1. Colorația Hematoxin-Eozină..... | 158 |
| 8.3.2. Colorația imunohistochimică..... | 168 |
| 8.3.2.1. Colorația IHC pentru evidențierea celulelor cerebrale CASPAZ3+ | 168 |
| 8.3.2.2. Colorația IHC pentru evidențierea celulelor cerebrale GFAP+..... | 188 |
| 8.3.2.3. Colorația IHC pentru evidențierea celulelor cerebrale CD68+ | 205 |
| 8.3.2.4. Colorația IHC pentru evidențierea celulelor cerebrale CD163+ | 218 |
| 8.3.2.5. Corelații între densitățile cerebrale ale celulelor CASPAZ3+, GFAP+, CD68+ și CD163+..... | 229 |
| 8.3.2.6. Corelații între rezultatele examenului microscopic uzual și densitatea celulelor cerebrale CASPAZ3+, GFAP+, CD68+ și CD163+ | 233 |
| 8.4. Discuții | 244 |
| 8.4.1. Analiza IHC a expresiei celulelor cerebrale CASPAZ3+ în TCC | 244 |
| 8.4.2. Analiza IHC a expresiei celulelor cerebrale GFAP+ în TCC..... | 247 |
| 8.4.3. Analiza IHC a expresiei celulelor cerebrale CD68+ și CD163+ în TCC..... | 250 |
| 8.5. Concluzii..... | 252 |
| 8.5.1. Investigarea IHC cerebrală a celulelor CASPAZ3+..... | 252 |
| 8.5.2. Investigarea IHC cerebrală a celulelor GFAP+ | 254 |
| 8.5.3. Investigarea IHC cerebrală a celulelor CD68+..... | 257 |
| 8.5.4. Investigarea IHC cerebrală a celulelor CD163+..... | 258 |
| 9. Concluzii și contribuții personale..... | 261 |
| 9.1. Concluzii privind prima direcție de cercetare..... | 261 |
| 9.2. Concluzii privind a doua direcție de cercetare | 261 |
| 9.3. Concluzii privind a treia direcție de cercetare..... | 262 |
| 9.4. Contribuții personale | 265 |
| 9.5. Dezavantaje tehnico-economice | 267 |
| 9.6. Posibile direcții de continuare a cercetării doctorale..... | 268 |
| Bibliografie..... | 269 |
| Anexe | 286 |

Introducere

Definiție

Deși criteriile de definire ale traumatismelor cranio-cerebrale suferă diferite nuanțări în funcție de diversele specialități medicale, cea mai utilă definiție a traumatismului cranio-cerebral arată că acesta este rezultatul aplicării unei forțe mecanice externe ce cauzează diverse disfuncții cerebrale.[1]

Epidemiologie

Traumatismele cranio-cerebrale sunt cea mai frecventă cauză de moarte și invaliditate posttraumatică la persoanele cu vârstă sub 45 de ani.[2]

În România incidența anuală arată că la fiecare 100.000 de locuitori se produc 300 de cazuri de traumatisme cranio-cerebrale care necesită asistență medicală specializată. Cea mai mare parte a victimelor traumatismelor cranio-cerebrale severe dar și un procent crescut al victimelor traumatismelor cranio-cerebrale moderate dezvoltă diferite grade de dizabilitate. Mai mult de un sfert din cazurile de invaliditate posttraumatică apar ca urmare a unui traumatism cranian.

Motivația alegerii temei acestui studiu doctoral

Traumatismele cranio-cerebrale sunt cele mai frecvente tipuri de traumatisme întâlnite în practica curentă medico-legală. Cercetările privind mecanismele lezionale, momentul producerii traumatismului cranian precum și stabilirea cauzelor de deces rămân de actualitate. Stabilirea momentului traumatic implică atât distincția între leziunile produse antemortem și cele produse postmortem dar și considerații privind intervalul de supraviețuire posttraumatic.[3]

În privința elucidării momentului de producere al traumatismului cranio-cerebral din punct de vedere medico-legal nu s-a ajuns la un rezultat satisfăcător până în prezent. Găsirea unor criterii obiective de apreciere a momentului traumatic este esențială. Prin urmare studiul personal își propune să investigheze imunohistochimic modificările apoptotice celulare cerebrale, procesele de astrocitoză reactivă cerebrală și reacția inflamatorie tisulară în funcție de momentul decesului posttraumatism cranio-cerebral.

Ipoteza clasică privind dezvoltarea leziunilor traumatice cerebrale arată că acestea sunt rezultatul leziunilor traumatice primare datorate necrozei celulare combinată cu răspunsul inflamator cerebral care determină leziuni secundare cerebrale. În ultimele decenii s-au realizat multiple studii privind rolul reacției inflamatorii în perpetuarea leziunilor traumatice cerebrale, observându-se că celulele microgliale și macrofagice recrutate la nivel cerebral exacerbează leziunile neuronale primare.

Multe cercetări experimentale legate de traumatismele cranio-cerebrale s-au concentrat pe apariția și evoluția leziunilor necrotice tisulare, datorate în mare parte efectului mecanic direct posttraumatic la nivel cerebral. S-a făcut o disjunție clară între necroză și apoptoză. Necroza este o moarte celulară ce apare accidental datorită unor factori externi, fiind neprogramată, apoptoza reprezentând o moarte programată și dirijată a celulelor, cu rol în

menținerea homeostaziei tisulare. S-a considerat că pierderile neuronale posttraumatice sunt strict datorate necrozei și inflamației iar apoptoza celulară fiind un proces fiziologic nu deține un rol în acest proces.

Datorită datelor experimentale recente apoptoza celulelor cerebrale a început să fie reevaluată. Fiziopatologia leziunilor traumatice cerebrale este departe de a fi înțeleasă în totalitate, începând să se contureze ideea că apoptoza ar avea un rol chiar mai important decât s-a crezut inițial. Mai exact celulele cerebrale lezate eliberează substanțe cu rol neuromodulator ce pot duce la distrucții neuronale tardive apărute mult timp după ce fenomenele necrotice și inflamatorii cerebrale au încetat să acționeze. Aceste pierderi ale celulelor neuronale sunt răspunzătoare de dezvoltarea diverselor deficite neurologice și sechele posttraumatice. Prin urmare studiul personal urmărește să evedențizeze dacă procesele apoptotice cerebrale au rol în evoluția fiziopatologică a traumatismelor cranio-cerebrale contribuind la dezvoltarea leziunilor traumatice secundare cerebrale.

O lungă perioadă de timp s-a considerat că celulele astrocitare îndeplinesc mai mult un rol structural la nivelul țesutului nervos. Odată cu progresele tehnicilor de imunohistochimie și microscopie electronică s-a observat că acestea dețin și multiple roluri funcționale cerebrale, esențiale în homeostazia cerebrală.

Activarea celulelor astrocitare se produce ca urmare a diferitelor leziuni structurale ale SNC. Deoarece actual nu există un consens științific general în privința definirii astrocitozei reactive și a criteriilor de evaluare a gravității leziunilor astrocitare, studiul personal dorește să evedențieze modificările specifice caracteristice astrocitozei reactive apărute în urma leziunilor traumatice cranio-cerebrale. Proteina glială fibrilară acidă (GFAP) nu este detectată prin tehnici de imunohistochimie la nivelul astrocitelor nereactive iar investigarea acestei proteine specifice celulelor astrocitare poate aduce informații privind fenomenele de astrocitoză reactivă cerebrală apărute posttraumatic.

Originalitatea studiului realizat

Originalitate acestui studiu constă în realizarea unei imagini globale asupra leziunilor cerebrale survenite posttraumatic prin analiza simultană a modificărilor inflamatorii cerebrale, proceselor apoptotice și astrocitozei reactive urmărind să stabilească posibila lor relevanță în diagnosticul, prognosticul și elucidarea momentului traumatic cranio-cerebral.

Experimentul dorește să stabilească dacă ipoteza clasică privind dezvoltarea leziunilor traumatice secundare, datorate preponderent necrozei și reacției inflamatorii, este exactă sau aceasta trebuie reevaluată. Doresc să evedențiez care dintre procesele cerebrale cele apoptotice sau cele inflamatorii cerebrale pot fi folosite în estimarea momentului traumatic, dar și rolul celulelor astrocitare reactive în evoluția leziunilor traumatice cerebrale.

Prin împărțirea cazurilor de traumatisme cranio-cerebrale în 4 perioade de supraviețuire: suppraacută, acută, subacută și cronică doresc să observ dacă evoluția temporală a expresiei celulelor apoptotice, astrocitare reactive precum și a macrofagelor și microgliilor activate prezintă diferențe semnificative în funcție de perioada decesului posttraumatic în raport cu aria cerebrală examinată.

I.PARTEA GENERALĂ

Mecanisme fizio-patologice implicate în dezvoltarea leziunilor cerebrale

Reacția inflamatorie cerebrală posttraumatică

În funcție de intensitatea traumatismului cranio-cerebral și de natura penetrantă sau nepenetrantă a acestuia, se produc imediat distrugerii ale celulelor cerebrale la locul impactului, considerate în mod clasic leziuni cerebrale primare. Rolul inflamației în perpetuarea leziunilor cerebrale a fost intens studiat în ultimele decenii constatându-se că răspunsul inflamator secundar exacerbează leziunile neuronale primare.

Răspunsul inflamator celular

Un răspuns inflamator intens apare în perioada acută posttraumatică fiind caracterizat de activarea celulelor regionale, migrarea și recrutarea leucocitelor periferice și eliberarea de mediatori ai inflamației.[4] Leziunile celulare primare cerebrale determină eliberarea de fragmente endogene ARN și ADN, proteine ale șocului termic și molecule ale grupului cu mobilitate ridicată 1 HMGB1 (high mobility group box 1). Aceste molecule cerebrale cu efect distructiv, denumite generic „damage-associated molecular patterns” (DAMPs) se leagă de receptori toll-like (TLRs) activând factorul nuclear κ B (NF κ B) ceea ce duce la eliberarea unor factori proinflamatori: citokine, chemokine și la exprimarea de receptori imuni specifici.[5],[6] Receptorii toll like (TLRs) se găsesc la nivelul astrocitelor, microgliilor și celulelor endoteliale cerebrovasculare.[7],[8] În afară de DAMPs, răspunsul inflamator este inițiat de producția de extravazare sanguină, fragmente ale complementului, specii reactive de oxigen și azot.[5],[9],[10]

Răspunsul inflamator este generat de o creștere rapidă a citokinelor și chemokinelor eliberate posttraumatic de la nivelul celulelor microgliale, astrocitelor, celulelor endoteliale cerebrale și neuronale.[9],[11],[12] Celulele sistemului imunitar sunt recrutate la nivelul ariei lezionale datorită chemokinelor eliberate în urma distrugerilor primare ale țesutului neuronal.[13],[14]

Neutrofilele sunt primele celule periferice care se acumulează în creier după traumatismul cranio-cerebral, pentru a curăța focarul lezional prin fagocitoză.[15] Neutrofilele exacerbează distrucția celulară prin intermediul speciilor reactive de oxigen. Studiile experimentale arată că infiltrația cu neutrofile a creierului este maximă la o zi posttraumatic și este urmată de acumularea leucocitelor cu un nivel maxim la 3 zile posttraumatic.[16]

Monocitele apar la nivel lezional datorită eliberării locale de chemokine și odată ce ajung în creier se diferențiază în macrofage. Monocitele inflamatorii ating un maxim la 3 zile posttraumatic. Celulele dendritice, limfocitele T și limfocitele natural killer (NK) sunt mobilizate la nivel lezional dar într-un număr mai scăzut față de monocite. În acest interval celulele gliale astrocitare se activează perilezional arătând o expresie crescută a GFAP și

produc citokine și chemokine ce vor crește recrutarea și activarea celulelor microgliale rezidente și a celulelor imune periferice. Celulele microgliale activate suferă transformări importante ale morfologiei prelungirile subțiri capătă aspect mult dilatată amoeboidal, prezentând o morfologie care nu poate fi distinsă de cea a macrofagelor recrutate de la nivelul barierei hemato-encefalice. Ele secretă citokine pro-inflamatorii și radicali liberi cu efect citotoxic pentru celulele neuronale contribuind la neurodegenerare posttraumatică.

Răspunsul imun celular posttraumatic este diferit în funcție de tipul focal sau difuz al leziunilor primare cerebrale. Leziunile focale cerebrale sunt caracterizate de creșterea precoce la nivel lezional a neutrofilelor, și mai apoi de migrarea celulelor microgliale, astrocitare, macrofagice și limfocitare. Analiza citometrică a ariei lezionale arată o creștere de până la 20 de ori a numărului de microglia comparativ cu numărul macrofagele periferice, ceea ce sugerează că în leziunile focale reacția inflamatorie este predominant centrală, celulele recrutate de la nivel periferic având o importanță mai redusă.[17]

În leziunile cerebrale difuze neutrofilele sunt în număr redus sau chiar absente, iar în perioada precoce posttraumatică preponderent la nivelul substanței albe cerebrale se observă un număr crescut de celule microgliale și astrocitare. Răspunsul inflamator cerebral posttraumatic realizează curățarea focarului lezional și promovează fenomenele de remodelarea tisulară cerebrală.[18],[19]

Studiul imunohistochimic al inflamației cerebrale posttraumatice

Studiul imunohistochimic al fenomenelor inflamatorii cerebrale posttraumatice are la bază decelarea celulelor macrofagice și microgliale activate care pot fi evidențiate prin metode imunohistochimice cu ajutorul markerilor CD68 și CD163.[20],[21]

În mod uzual markerul CD68 este folosit pentru studiul fenomenelor inflamatorii tisulare, având aplicații extinse în cercetarea medicală. CD68 este o glicoproteină intens glicozilată transmembranară de tipul I care are o expresie crescută în macrofage și în alte celulele monocitare fagocitare activate. CD68 aparține familiei de proteine lizozomale, dar deși se găsește localizat la nivelul membranei lizozomale poate să migreze la suprafața celulei.

CD163 face parte din categoria receptorilor gunoieri („scavenger receptors”) care se găsesc în mod specific în celulele monocitare: monocite, macrofage, microglia. CD163 este o proteină transmembranară ce cuprinde un scurt domeniu intracitoplasmatic și funcționează ca un receptor endocitar al complexului hemoglobină-haptoglobină. Prin acest mecanism se realizează absorbția formelor libere de hemoglobină eliberate de la nivel celular, dar și a complexelor hemoglobină-haptoglobină.[22],[23]

Receptorul celular CD163 are o capacitate ridicată de captare a hemoglobinei deoarece poate să realizeze procese de endocitoză constitutivă, independente de prezența liganzilor și mai apoi în urma reciclării să se exprime pe suprafața celulei.[24] Endocitoza macrofagică a hemoglobinei cu ajutorul receptorului CD163 este determinată de distrugerea hemului sub acțiunea hemoxigenazei 1(HO-1). Cercetări recente arată un rol antiinflamator puternic al acestui receptor, cu generarea unui răspuns ridicat citokinic. Creșterea numărului și a expresiei

celulare a CD163 a fost asociată cu scăderi ale valorii plasmatică a citokinelor proinflamatorii. [25],[26]

Apoptoza cerebrală posttraumatică

Ipoteza clasică:

În mod tradițional se consideră că traumatismul cranio-cerebral generează în evoluția sa cronologică două tipuri de leziuni cerebrale: primare și secundare. Leziunile cerebrale primare apar ca urmare a acțiunii forțelor mecanice la momentul traumatismului, prin accelerație/decelerație și generează leziuni directe vasculare, nervoase și gliale cu caracter focal sau difuz. Leziunile cerebrale secundare apar în minute-zile de la traumatism datorită alterărilor neurochimice și metabolice subsecvente. Se consideră că răspunsul neuroinflamator după TCC este datorat leziunilor secundare neuronale. În mod particular inflamația amplifică leziunile secundare prin lezare directă neuronală și apariția edemului.

Ipoteza actuală:

Cercetări recente demonstrează importanța apoptozei și o consideră o moarte celulară neacompaniată de o reacție inflamatorie. Deși pierderea celulelor neuronale și gliale a fost considerată inițial ca un rezultat al necrozei combinată cu răspunsul inflamator cerebral, studiile actuale demonstrează importanța morții celulare programate-apoptozei în evaluarea medico-legală a leziunilor cerebrale.[27]

Apoptoza este reglată de gene specifice, cu sinteză activă proteică și participarea transcripției factorilor genetici timpurii (ex.: c-jun, jun-B, jun-D, factori nucleari, proteaze) cu toxicitate glutamat mediată ce include radicali liberi, protein-kinaze și mediatori secundari.[28]

Yakovle și Faden consideră că apoptoza neuronală începe la câteva ore posttraumatic și se poate demonstra în următoarele 3 zile.[29] Prin folosirea tehnicii TUNEL (TdT-mediated dUTP nick and labeling), neuronii apoptotici au fost evidențiați de la 2 ore până la 12 zile posttraumatic.[27] Apoptoza neuronală a fost localizată la nivel lezional și perilezional cortical, în leziuni cerebrale mai vechi de 3 zile.

Cercetările lui Williams și ale colab. au pus în evidență modificări apoptotice neuronale la nivelul substanței albe lezate chiar și la un an de la traumatismul cerebral.[30]

Rolul caspazelor în declanșarea morții celulare programate

Caspazele reprezintă o familie de proteaze cisteinil aspartat specifice, bine conservate la organisme multicelulare, ce funcționează ca regulatori centrali ai apoptozei. Caspazele sunt enzime care fac legătura critică dintre inflamația și moartea celulară.

Activarea acestor endopeptidaze este controlată prin producția proprie de forme zimogene inactive care în urma activării catalitice se transformă în dimeri sau agregate complexe macromoleculare. Rolul caspazelor în cadrul morții celulare programate a fost stabilit în multiple studii.[31],[32] În timpul morții celulare programate activarea caspazei 3 duce la proteoliza proteinelor reparatorii ADN, proteinelor citoscheletului, la alterări morfologice celulare și ale ADN-ului nuclear ce definesc apoptoza. Actual au fost identificate

cel puțin 14 tipuri de caspaze de la 1 la 14, ce acționează asupra diverselor substraturi celulare ce conțin aspartat.[33] Caspazele implicate în apoptoză au fost subclasificate în funcție de mecanismul de acțiune în caspaze inițiatoare (caspazele 8 și 9) și efectorie (caspazele 3,6, 7). Caspazele inițiatoare activează caspazele efectorii care vor dezintegra proteinele structurale membranare și vor activa multiple sisteme enzimatică ducând în final la fragmentarea ADN-ului nuclear și la distrugerea membranei.

Se consideră că la mamifere există 2 căi principale responsabile de activarea cascadei caspazelor: intrinsecă (mitochondrială) și extrinsecă (prin intermediul receptorilor).[34],[35]

Ambele căi duc la generarea caspazei 3, care împreună cu alte caspaze cu rol efector (de ex. Caspaza 7 și 6) coordonează apoptoza celulară generând schimbări fenotipice celulare caracteristice apoptozei.[36]

Caspaza 3 mediator al apoptozei neuronale

Caspaza 3 este considerată ca un mediator central al apoptozei celulelor neuronale. [37]Caspaza 3 activată prezintă multe ținte celulare. Caspaza 3 clivează proteinele asociate reparării ADN-ului cum ar fi protein-kinaza ADN dependentă (ADN-PK) și poli polimeraza (ADP-riboză).[38] Modelul clivajului poli polimerazei (ADP-riboză) este similar modelului temporal prin care se realizează fragmentarea ADN-ului în traumatismele cranio-cerebrale.[39]

Cercetări experimentale au pus în evidență procese apoptotice neuronale survenite în urma traumatismelor craniene atât șoareci cât și la oameni.[40],[41],[42] S-au identificat posttraumatic la nivelul celulelor cerebrale modificări apoptotice incipiente cum ar fi prezența expresiei bcl-2 dar și tardive: fragmentarea ADN-ului, condensarea nucleară și ratatinarea celulară.

Studii efectuate pe șobolani au descoperit creșterea expresiei celulare cerebrale a caspazei 3 în urma traumatismelor cranio-cerebrale.[43] Sunt necesare studii comprehensive privind expresia și cascada biochimică a activării caspazei 3 după traumatismele cranio-cerebrale, iar datele în privința administrării inhibitorilor caspazei 3 în scop curativ după traumă lipsesc.

Caspaza 3 neuronală duce la modificări ireversibile sau pe termen lung ale semnalizării celulare prin substanțele clivate. O activare puternică determină moartea celulară; oricum activarea locală a substanțelor specifice pare să fie implicată în multe mecanisme reglatorii, începând de la moartea fiziologică neuronală din timpul dezvoltării și maturizării sistemului nervos central și până la moartea neuronală tardivă din cadrul traumatismelor cranio-cerebrale, ducând de asemenea la pierderi neuronale progresive în bolile neurodegenerative

Astrocitoza reactivă posttraumatică

Astrocitoza reactivă este un proces specific prin care astrocitele răspund la toate leziunile cerebrale, reprezentând un rezultat al leziunilor structurale ale sistemului nervos central.

Investigarea imunohistochimică a astrocitozei reactive

Studiul imunohistochimic al expresiei proteinei gliale fibrilare acide (GFAP) este folosit ca marker tipic în identificarea astrocitelor reactive. Alți markeri moleculari folosiți pentru determinarea imunohistochimică a astrocitelor reactive sunt glutamin sintetaza și S100β.[44] Utilitatea acestor markeri este limitată pentru că spre deosebire de GFAP aceștia nu sunt specifici celulelor astrocitare.

La fel ca și ceilalți membri ai familiei de proteine intermediare filamentare, GFAP este unul dintre cele mai stabile și mai puțin solubile elemente celulare, iar în condiții fiziologice normale nu se găsește dispersat la nivel citoplasmatic. Colorația imunohistochimică GFAP nu se evidențiază în mod uzual în celulele astrocitare indemne la nivel corpului astrocitar, se observă prezența GFAP la baza prelungirilor principale astrocitare, GFAP fiind absent în totalitate la nivelul proceselor astrocitare subțiri, filamentare.

GFAP nu este detectat prin tehnici de imunohistochimie la nivelul astrocitelor nereactive, aparținând sistemului nervos sănătos sau la distanță față de leziunile cerebrale. Studii experimentale au arătat că proteina glială fibrilară acidă (GFAP) nu este esențială pentru îndeplinirea funcțiilor fiziologice astrocitare, dar este importantă în procesele de astrocitoză reactivă și pentru formarea cicatricilor gliale.[45],[46]

Modificări evolutive specifice astrocitozei reactive posttraumatice

Actual nu există o definiție unanimită acceptată a astrocitozei reactive, iar încadrarea în grupe de severitate a leziunilor astrocitare prezintă variații importante în funcție de autori.

Caracteristici principale ale astrogliozei reactive:

-astroglioza reactivă reprezintă o serie de perturbări moleculare ale funcției celulare astrocitare petrecute în urma leziunilor SNC, atât patologice cât și traumatice;

-modificările astrocitare îmbracă aspecte variate de severitate în funcție de intensitatea leziunilor cerebrale, de la alterări ale expresiei moleculare cu hipertrofie celulară progresivă până la hiperplazie astrocitară și formarea de cicatrici gliale în leziunile cerebrale grave;

-astrocitele pot să prezinte modificări funcționale, fie prin câștigarea sau pierderea anumitor funcții celulare; aceste perturbări pot avea atât rol protector dar și repercursiuni negative asupra celulelor neuronale și gliale înconjurătoare.[47]

Studii recente bazate pe inhibarea translației genetice a moleculei GFAP, cu ajutorul antiserurilor specifice de tip mRNA, au demonstrat că expresia GFAP coordonează funcțiile neuritelor implicate în promovarea sau inhibarea celulelor gliale reactive. Aceste studii evidențiază potențialul rol terapeutic al serurilor inhibitorii ale GFAP, mai ales prin înlăturarea blocajului regenerării axonale, și deschid un nou capitol în tratamentul leziunilor cerebrale.[48]

II. PARTEA SPECIALĂ

-Prima direcție de cercetare-

Contribuții privind principalele tipuri de fracturi craniene decelate necroptic și neevidențiate la examenul CT cranian

Introducere

Acest studiu își propune să evidențieze incidența principalelor tipuri de fracturi craniene și localizările acestora care pot scăpa diagnosticului imagistic prin CT.

Obiectivele studiului:[49]

-determinarea gravității leziunilor cerebrale asociate fracturilor craniene nediagnosticate imagistic;

-stabilirea unor posibile corelații între perioada de supraviețuire posttraumatică și acuratețea examenului imagistic CT cranian;

-evidențierea celor mai frecvente tipuri de fracturi craniene ce nu sunt diagnosticate la examenul imagistic CT cranian;

-stabilirea caracteristicilor morfologice necroptice ale fracturilor craniene neevidențiate imagistic;

-decelarea principalelor regiuni anatomice craniene la nivelul cărora explorarea imagistică CT realizează subdiagnosticarea/nediagnosticarea focarelor de fractură;

-depistarea necroptică a celor mai frecvente leziuni traumatiche cranio-cerebrale nediagnosticate la examenul CT cranian, ce sunt asociate fracturilor craniene neevidențiate imagistic.

Material și metodă

Acest studiu s-a realizat prin analiza retrospectivă a 115 cazuri de traumatisme cranio-cerebrale autopsiate în cadrul Institutului Național de Medicină Legală „Mina Minovici”, București în perioada 01.01.2011-01.01.2012.[49]

Criterii de includere: cazurile de traumatisme cranio-cerebrale cu fracturi craniene diagnosticate necroptic, care au fost spitalizate anterior decesului; intervalul de supraviețuire posttraumatic cuprins între minimum 1 oră și maximum 20 de zile; efectuarea a cel puțin o examinare CT cranio-cerebrală sau mai multe examinări în funcție de intervalul de supraviețuire; au fost selectate cazurile la care explorarea imagistică s-a efectuat pe secțiuni multiple, continue, în plan axial la 5mm distanță una față de cealaltă, cu ajutorul unui CT scan spiral.[49]

Criterii de excludere: TCC cu fracturi craniene diagnosticate necroptic, care au fost spitalizate anterior decesului și au fost supuse intervențiilor neurochirurgicale; cazurile ce au fost spitalizate anterior decesului având interval de supraviețuire posttraumatic mai mic de o oră sau mai mare de 20 de zile; cazurile explorate imagistic cu ajutorul CT cranian prin realizare de imagini reconstructive sagitale și coronale; absența examenului CT cranian pe toată perioada internării.[49]

S-a efectuat o analiză comparativă între rezultatele imagistice și cele necrotice privind fracturile craniene luându-se în considerare următorii parametri: tipul fracturii; traiecul și întinderea acesteia; localizarea anatomică.

Rezultate

Din totalul de 115 cazuri de traumatisme cranio-cerebrale analizate, s-a constatat că în 35 de cazuri au existat fracturi craniene care nu au fost diagnosticate la examenul CT cranian.

Fracturile craniene nediate diagnosticate au fost evidențiate la sexul masculin în 27 cazuri și în 8 cazuri la sexul feminin.

Referitor la repartiția pe grupe de vârstă a fracturilor craniene nediate diagnosticate la examenul CT se remarcă preponderența peste vârsta de 50 ani, 25 cazuri, reprezentând 71,42% din totalul fracturilor nediate diagnosticate. Au fost raportate 9 cazuri în intervalul de vârstă 70-80 ani (25,71%) și un număr de 4 cazuri la pacienți pediatrici, în intervalul de vârstă 0-10 ani (11,42%).[49]

În cele mai multe cazuri în care au fost omise fracturi craniene la examenul imagistic, respectiv 18 cazuri a fost efectuată o singură examinare CT, iar supraviețuirea pacientului a fost sub 5 zile (51,42%). La victimele traumatismelor cranio-cerebrale care au fost spitalizate între 5-10 zile anterior decesului s-a evidențiat de asemenea o incidență crescută a fracturilor craniene omise la examinarea imagistică cu ajutorul Computer Tomografului, respectiv 12 cazuri (34,28%). La pacienții care au supraviețuit peste 10 zile și la care s-au efectuat mai multe examinări CT s-au descoperit doar 5 cazuri de fracturi craniene nediate diagnosticate imagistic (14,28%).[49]

Referitor la gravitatea traumatismului cranio-cerebral, s-a remarcat că :31 de pacienți au prezentat TCC grav cu GCS=3-4 puncte (68,57%) și GCS=4-7 puncte(20%) și 4 pacienți au prezentat TCC de gravitate medie, având GCS=11 puncte(11,42%).

Mecanismele de producere ale fracturilor craniene care nu au fost diagnosticate la examenul CT: accidente rutiere în 12 cazuri(34,28%); căderi accidentale de la același nivel în 12 cazuri(34,28%); precipitări în 6 cazuri(17,14%); agresiuni fizice în 5 cazuri(14,28%).

La autopsia medico-legală s-au evidențiat fracturi care nu au fost diagnosticate imagistic la nivelul neurocraniului în 77,15% din cazuri și la nivelul viscerocraniului în 22,85% din cazuri.

La nivelul viscerocraniului s-au decelat 8 cazuri de fracturi craniene, 4 la nivelul orbitei (3,47% din totalul cazurilor luate în studiu) și 4 cazuri la nivelul piramidei nazale (3,47% din totalul cazurilor luate în studiu).

Cele mai multe cazuri de fracturi nediate diagnosticate au interesat neurocraniul, 27 de cazuri, fiind situate preponderent la nivelul calotei cu sau fără iradiere la baza craniului. Au fost evidențiate în 6 cazuri și fracturi izolate ale bazei craniului, ce au fost omise în cadrul diagnosticului imagistic.[49]

Fracturi liniare simple, fără deplasare interesând calota, fără iradiere la baza craniului au fost descoperite în 8 cazuri, reprezentând 6,95% din cazuri (22,85% din totalul fracturilor nediate diagnosticate) și au implicat cu predilecție aria parietală, urmată de localizarea frontală.

S-au pus în evidență câte 2 cazuri de fracturi interesând fiecare din regiunile: parietală, parieto-temporală și parieto-frontală, acestea reprezentând câte 1,7% din totalul cazurilor investigate, și câte 5,71% din totalul fracturilor nediagnosticate. La nivelul calotei s-au decelat de asemenea 2 cazuri de fracturi frontale, 1,7% din cazurile analizate și 5,71% din totalul fracturilor nediagnosticate.

Fracturile liniare simple, fără deplasare, interesând calota și iradiate la baza craniului, au fost evidențiate în 12 cazuri, reprezentând 10,43% din cazurile analizate și 34,28% din fracturile nediagnosticate. Acestea au fost localizate mai ales în ariile parietală și temporală, cu iradiere preponderent în etajul mediu.

Fracturile izolate de bază craniană au fost evidențiate în 6 cazuri (5,21% din cazurile analizate), reprezentând 17,14% din fracturile nediagnosticate. Fracturile de bază craniană au avut traiect liniar fără deplasare implicând cu predilecție etajul anterior și mediu. La autopsia medico-legală s-au descoperit 2 cazuri de fracturi implicând etajului anterior, 2 cazuri dispuse atât în etajul mediu cât și cel anterior precum și 2 cazuri în etaj mediu.

În acest studiu atât fracturile calotei craniene iradiate la nivelul bazei cât și fracturile izolate ale endobazei care nu au fost evidențiate la CT au interesat frecvent etajul mediu unilateral al bazei predominant la nivelul aripii mari a osului sfenoid și a stâncii osului temporal.[49]

Într-un singur caz s-a remarcat o subdiagnosticare la examenul CT a lungimii traiectului de fractură craniană. Explorarea imagistică cerebrală a arătat doar traiectul Temporo-Parietal stâng al fracturii nu și iradierea focarului de fractură până la nivelul regiunii occipitale stângi, descoperită necroptic.

Fisurile craniene au fost decelate în 3 cazuri, reprezentând 2,60% din totalul cazurilor analizate și 8,57% din totalul fracturilor craniene nediagnosticate. La necropsie au fost remarcate 2 fisuri interne la nivelul oaselor frontale și o fisură externă în regiunea Fronto-Temporală dreaptă.

Disjuncții ale oaselor craniene nediagnosticate imagistic au fost asociate fracturilor de calotă în 5 cazuri, reprezentând 4,34% din totalul cazurilor analizate și 14,28% din totalul fracturilor craniene nediagnosticate. S-au evidențiat: o disjuncție a suturii sagitale, două disjuncții suturale Temporo-Parietale unilaterale și două disjuncții la nivelul suturii lambdoide. La autopsie nu s-au evidențiat macroscopic dehiscente la nivelul suturii coronare.

Analiza cazurilor de fracturi craniene nediagnosticate imagistic a arătat predominanța fracturilor liniare, nedepimate, fără deplasare frecvent neramificate atât la nivelul boltei cât și la baza craniului. S-a evidențiat 1 singură fractură cominutivă ce nu a fost descoperită la examenul tomografic cranian. Traiectul acestei fracturi începea de la nivelul regiunii neurocraniene Fronto-Temporale drepte cu iradiere în etajele anterior și mediu ale bazei craniului.[49]

-A doua direcție de cercetare-

Considerații privind cazurile de traumatisme cranio-cerebrale autopsiate în cadrul SJML Teleorman

Introducere

Studiul își propune să evidențieze principalele caracteristici necroptice ale traumatismelor cranio-cerebrale, prin analiza exhaustivă a cazurilor medico-legale autopsiate în cadrul Serviciului Județean de Medicină Legală Teleorman în decurs de 9 ani.

Obiectivele studiului:

-stabilirea principalelor aspecte lezionale cerebrale survenite în cadrul traumatismelor cranio-cerebrale produse ca urmare a diferitelor mecanisme traumatice;

-observarea aspectelor morfologice necroptice specifice traumatismelor cranio-cerebrale întâlnite la victimele accidentelor de trafic rutier în corelație cu modul de producere al acestora;

-evidențierea topografiei lezionale a celor mai frecvente leziuni traumatice asociate cazurilor de traumatisme cranio-cerebrale în raport cu diversele mecanisme de producere ale leziunilor;

-analiza valorilor alcoolemiei întâlnite la victimele traumatismelor cranio-cerebrale în funcție de modalitățile de producere ale leziunilor cranio-cerebrale;

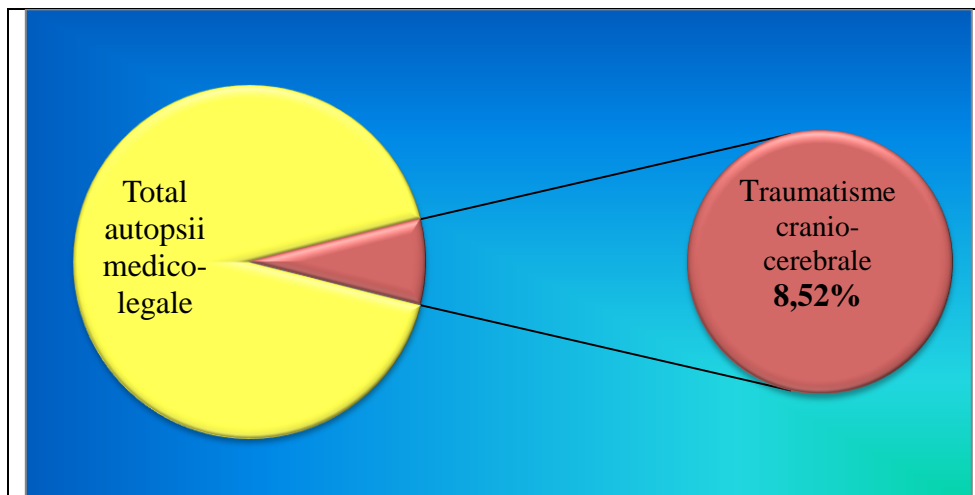
-evidențierea principalelor caracteristici ale fracturilor craniene în raport cu circumstanțele de producere ale TCC.

Material și metodă

Studiul s-a realizat prin analiza cazurilor medico-legale autopsiate în cadrul Serviciului Județean de Medicină Legală Teleorman, între anii 2007-2016. Analiza include un studiu retrospectiv al cauzisticii medico-legale necroptice desfășurat între anii 2007-2014 și un studiu prospectiv al cauzisticii realizat între anii 2015-2016. A fost selectat un lot de studiu ce a cuprins toate cazurile de deces datorate traumatismelor cranio-cerebrale. Au fost incluse în studiu doar cazurile în care pe certificatul de deces TCC a fost stabilit ca și cauză de deces indiferent de prezența asocierilor lezionale.

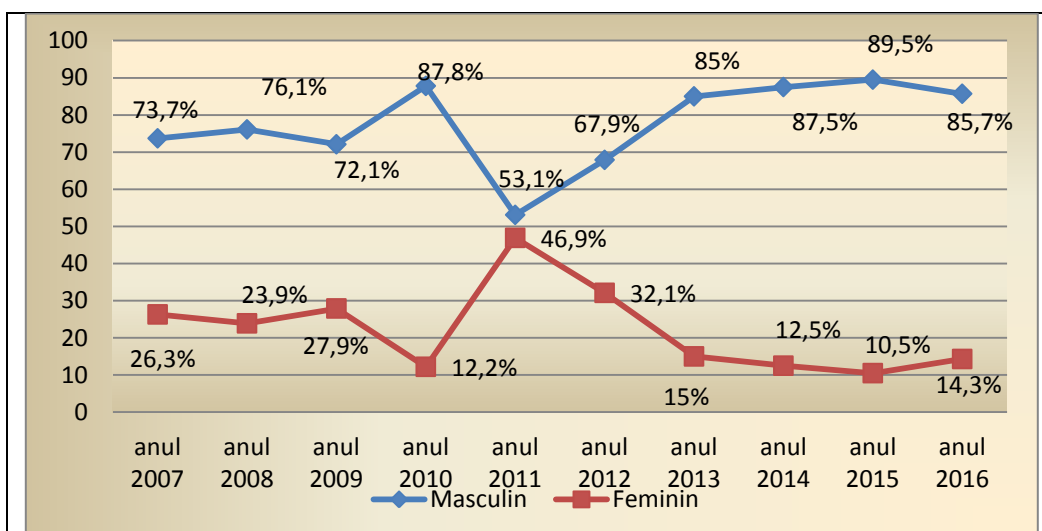
Rezultate

Din totalul de 3564 de autopsii medico-legale efectuate în cadrul Serviciului Județean de Medicină Legală Teleorman în perioada 2007-2016 în 304 cazuri traumatismele cranio-cerebrale au constituit cauza decesului. Incidența traumatismelor cranio-cerebrale tanatogeneratoare din totalul cazurilor autopsiate analizate a fost de 8,52%.(Grafic 7.1.a.)



Grafic 7.1.a. Incidența traumatismelor craniocerebrale autopsiate în perioada 2007-2016 în cadrul SJML Teleorman

Din totalul de 304 de cazuri autopsiate ce au prezentat traumatisme craniocerebrale, 232 cazuri au interesat sexul masculin (76%) și 72 de cazuri sexul feminin(24%). Prevalența crescută a traumatismelor craniocerebrale la sexul masculin se păstrează indiferent de anul studiat pentru toate grupele de vârstă între anii 2007-2016. Cea mai ridicată prevalență a traumatismelor craniocerebrale la sexul masculin, 89,5% din cazuri a fost observată în anul 2015 iar cea mai scăzută în anul 2011, respectiv 53,1% din cazuri.(Grafic 7.2.b.)

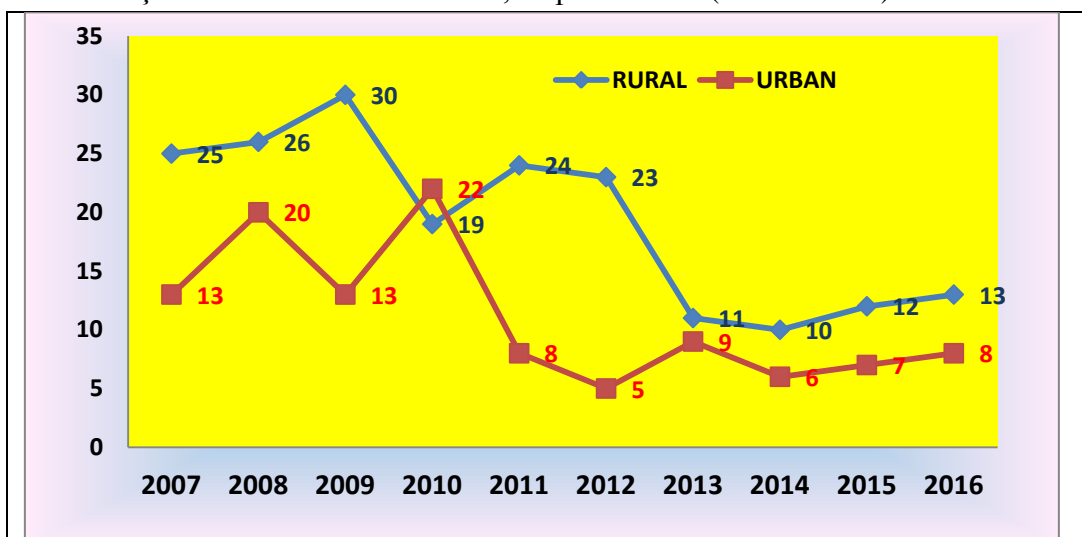


Grafic 7.2.b. Distribuția anuală pe sexe a cazurilor de traumatisme craniocerebrale analizate

O incidență ridicată a traumatismelor craniocerebrale s-a remarcat la grupele de vârstă: 50-60 ani(18%din cazurile analizate) și 70-80 ani(16%din cazurile analizate). Incidența scăzută a traumatismelor craniocerebrale s-a evidențiat la copiii sub 10 ani(3%), precum și la bătrâni peste 80 de ani(6%).

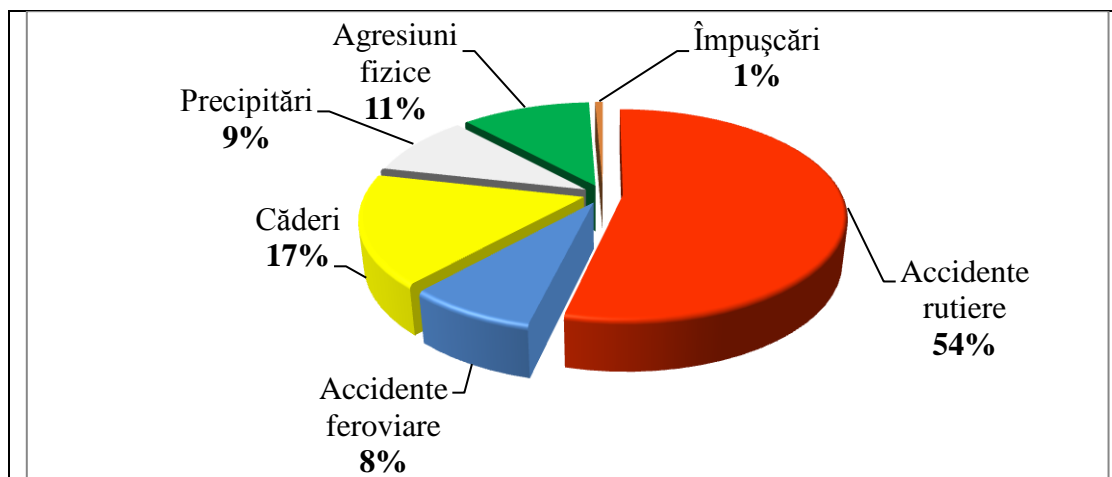
Din totalul de 304 cazuri analizate, 193 de cazuri au implicat persoane domiciliat în mediul rural(63%) și 111 cu domiciliul în mediul urban(37%). Incidența crescută a

traumatismelor cranio-cerebrale în rândul populației urbane a fost observată între anii 2007-2009, precum și 2011-2016. În anul 2010 incidența traumatismelor cranio-cerebrale soldate cu decesul a fost ușor crescută în mediul urban, respectiv 54%.(Grafic 7.4.b.)



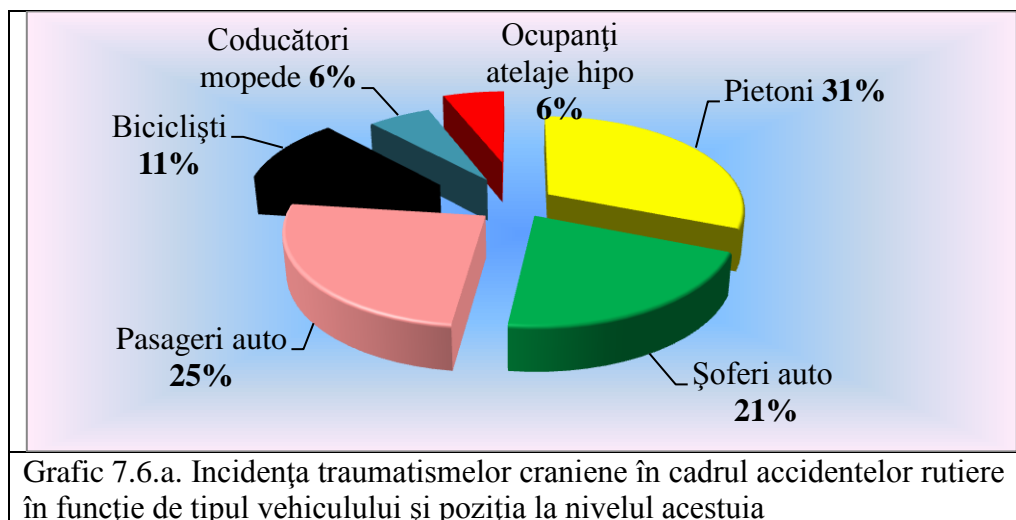
Grafic 7.4.b. Tendința anuală de variație raportată la mediul de proveniență pentru cazurile de traumatisme cranio-cerebrale analizate

Privitor la mecanismele de producere ale traumatismelor craniene analizate se remarcă o incidență crescută a accidentelor rutiere, 54% din cazuri, a căderilor de la același nivel în 17% din cazuri, urmate de agresiunile fizice în 11% din cazuri. S-a evidențiat o incidență mai scăzută a traumatismelor craniene produse prin precipitare, 9% din cazuri, accidente feroviare în 8% din cazuri precum și prin împușcare, 1% din cazuri.(Grafic 7.5.a.)



Grafic 7.5.a. Distribuția cazurilor analizate în funcție de modul de producere al traumatismului cranian

În cadrul accidentelor rutiere implicând autoturisme s-au evidențiat leziuni traumatiche cranio-cerebrale preponderent la pietoni, în 31% din cazuri, urmași de pasageri auto în 25% din cazuri și de șoferi autoturismelor în 21% din cazuri. Accidentele rutiere implicând bicicliști s-au întâlnit în 11% din cazuri, iar un procent redus al leziunilor craniene, de câte 6% a fost prezentat de ocupanții mopedelor și ai atelajelor hipo(căruțe).(Grafic 7.6.a.)

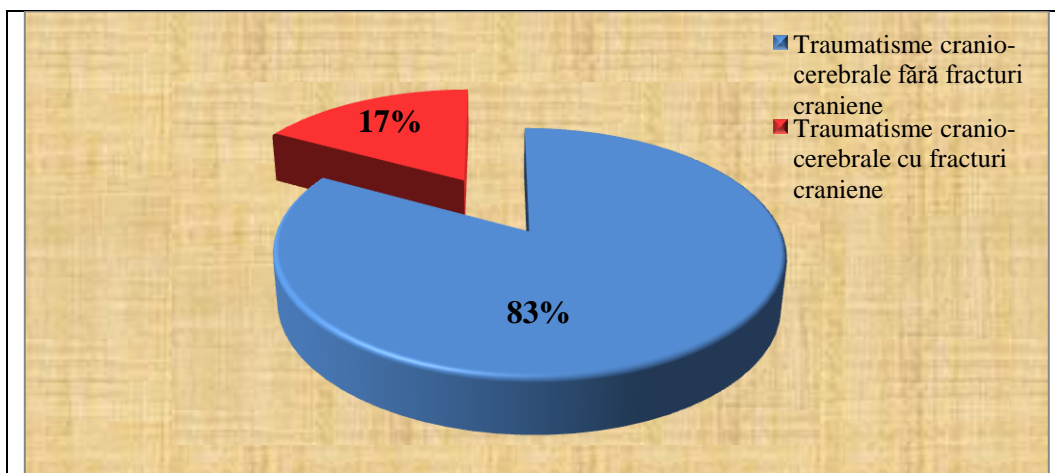


Din totalul cazurilor de traumatisme crano-cerebrale analizate în 84% de cazuri s-au recoltat probe de sânge pentru determinarea alcoolemiei. În 55% de cazuri determinările alcoolemiei au fost cuprinse între 0-0,5g‰, în 13% de cazuri valorile alcoolemiei au fost cuprinse între 0,5-1g‰ și în 12% din cazuri alcoolemia a fost cuprinsă între 1,5-2 g‰. La un număr mai scăzut de cazuri au fost înregistrate valori crescute ale alcoolemiei, respectiv în 6% din cazuri alcoolemia a fost cuprinsă între 2-2,5g‰, iar în 5% din cazuri alcoolemia a fost cuprinsă între 2,5-3 g‰.

Referitor la valorile alcoolemiei întâlnite la cazurile de traumatisme crano-cerebrale survenite ca urmare a agresiunilor fizice s-au constatat în 44% din cazuri valori ale alcoolemiei mai mici de 0,5 g‰, iar 30% din cazuri au prezentat valori ale alcoolemiei de peste 1,5g‰.

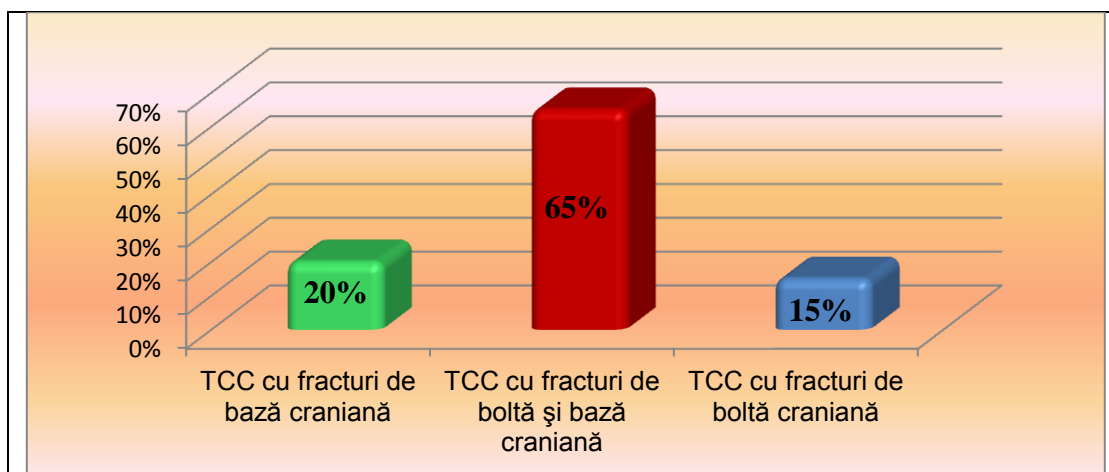
Analiza autopsiilor realizate în cadrul Serviciului Județean de Medicină Legală Teleorman între anii 2007-2016 a arătat multiple asocieri lezionale întâlnite la cazurile cu traumatisme crano-cerebrale. Din totalul cazurilor studiate leziunile traumatice cu localizare exclusiv crano-cerebrală au fost evidențiate în 56% din cazuri. La cazurile ce au prezentat topografie lezională multiplă s-a remarcat o prevalență ridicată a traumatismelor toracice în 30% din cazuri urmate de cele ale membrilor inferioare în 19% din cazuri. Un procent mai scăzut al leziunilor traumatice asociate s-a constatat la nivelul regiunii abdominale, 14% din cazuri, membrilor superioare, 13% din cazuri, precum și la nivelul coloanei vertebrale în 8% din cazuri.

Din totalul de 304 cazuri de traumatisme crano-cerebrale incluse în studiu, în 253 de cazuri (83%) s-au evidențiat fracturi craniene. Leziunile cerebrale care nu au fost însoțite de leziuni osoase craniene au fost descoperite în numai 51 de cazuri (17%).(Grafic 7.26.a.)



Grafic 7.26.a. Incidența fracturilor craniene la cazurile de traumatisme cranio-cerebrale analizate

Analiza cazurilor de traumatisme cranio-cerebrale care au prezentat fracturi craniene arată o incidență crescută a fracturilor craniene de boltă iradiate la baza craniului în 65% din cazuri. În 20% din cazurile studiate s-au descoperit fracturi localizate doar la nivelul calotei craniene, în timp ce fracturile izolate de bază craniană au fost mai puțin evidențiate, respectiv în 15% din cazuri.(Grafic 7.27.a.)

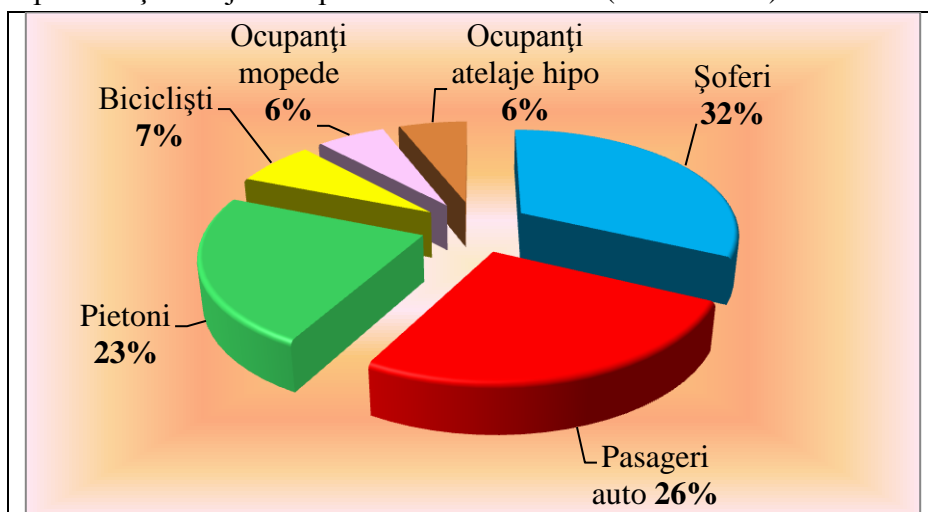


Grafic 7.27.a. Repartiția procentuală a fracturilor craniene în raport cu localizarea anatomică pentru cazurile analizate

La victimele accidentelor de trafic rutier care au prezentat fracturi localizate la nivelul bolții craniene s-a evidențiat o incidență crescută în rândul șoferilor de autoturisme la 40% din cazuri. S-a observat că pasageri autoturismelor și pietonii care au fost implicați în accidente rutiere au prezentat aceeași incidență a fracturilor de boltă craniană respectiv 27% din cazuri. La bicicliști s-au evidențiat 6% din cazurile de fracturi ale bolții craniene. Nu s-au evidențiat fracturi craniene izolate la nivelul calotei la ocupanții de moped și atelaje hipo.

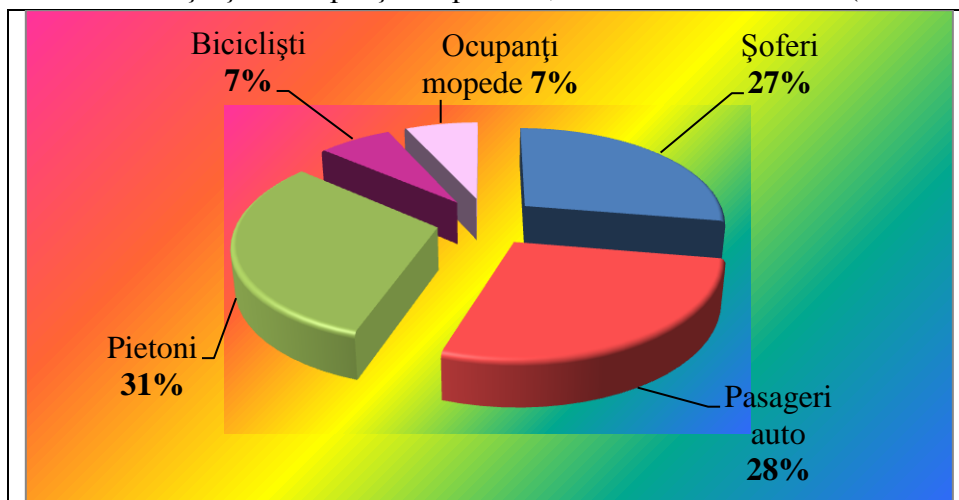
Din totalul cazurilor de traumatisme cranio-cerebrale produse ca urmare a accidentelor rutiere ce au prezentat fracturi asociate de boltă și bază craniană, 32% din cazuri au implicat

șoferi autoturismelor, în 26% din cazuri pasageri autoturismelor și în 23% din cazuri pietoni. La bicicliști s-au evidențiat 7% din cazurile de fracturi asociate de boltă și bază craniană, iar la ocupanții mopederelor și atelajelor hipo câte 6% din cazuri. (Grafic 7.33.)



Grafic 7.33. Incidența fracturilor de boltă și bază craniană în cadrul accidentelor rutiere

Cele mai multe fracturi de bază craniană întâlnite în accidentele rutiere au fost evidențiate la pietoni în 31% din cazuri. Pasageri autoturismelor au prezentat fracturi izolate de bază craniană în 28% din cazuri, iar șoferi în 27% din cazuri, o incidență mai scăzută observându-se la bicicliști și la ocupanții mopederelor, de câte 7% din cazuri. (Grafic 7.34.)



Grafic 7.34. Incidența fracturilor de bază craniană în cadrul accidentelor rutiere

Din totalul de 304 cazuri de traumatisme cranio-cerebrale analizate 31% au prezentat hemoragii lepto-meningeale, 26% din cazuri contuzii cerebrale și 15% dilacerări cerebrale. Hematoame cerebrale au fost evidențiate necroptic la 28% din cazuri. S-a constatat o incidență crescută a hematoamelor subdurale, care au fost depistate în 16% din cazuri. Hematoamele extradurale au reprezentat 8% din cazuri, în timp ce hematoamele intraparenchimotoase au fost cel mai rar evidențiate în 4% din cazuri.

-A treia direcție de cercetare-

Contribuții privind diagnosticul IHC al TCC în funcție de momentul decesului posttraumatic

Introducere

Având în vedere diversitatea aspectelor morfologice microscopice întâlnite la nivelul țesutului cerebral în funcție de momentul producerii TCC, studiul dorește să stabilească dacă investigația microscopică imunohistochimică a celulelor cerebrale caspaz3+,gfap+,cd68+ și cd163+ poate fi utilizată ca un criteriu obiectiv medico-legal de estimare a vechimii leziunilor cerebrale.

Obiectivele studiului:

-analiza semicantitativă a principalelor aspecte microscopice cerebrale evidențiate cu ajutorul colorației uzuale H-E, în raport cu momentul producerii evenimentului traumatic;

-studiul cu ajutorul tehnicilor de colorație imunohistochimică, prin marcarea specifică a celulelor cerebrale caspaz3+,gfap+,cd68+ și cd163+ a aspectelor histopatologice specifice diferitor tipuri de leziuni cerebrale, și analiza cantitativă a acestora la nivelul ariilor cerebrale:lezionale, perilezionale și la distanță în funcție de momentul decesului posttraumatic;

-evidențierea unor posibile corelații între celulele cerebrale marcate imunohistochimic: caspaz3+,gfap+,cd68+ și cd163+ și intervalul de supraviețuire post TCC;

-analiza comparativă între modificările microscopice cerebrale decelate uzual prin aplicarea colorației H-E și tehnicile de imunohistochimie, cu evidențierea celulelor cerebrale caspaz3+,gfap+,cd68+ și cd163+ dar și stabilirea unor posibile corelații între acestea în funcție de momentul producerii TCC.

Material și metodă

Studiul se bazează pe analiza cazurilor medico-legale autopsiate în cadrul Serviciului Județean de Medicină Legală Teleorman în perioada 2007-2016. Analiza cuprinde un studiu retrospectiv în perioada 2007-2014 și un studiu prospectiv realizat între anii:2015-2016.

Din totalul cazurilor medico-legale studiate, a fost selectat în vederea examenului microscopic un eșantion ce a cuprins 22 de cazuri, care au fost repartizate în 2 loturi.

LOTUL I de studiu include 13 cazuri de traumatisme cranio-cerebrale cu interval variabil de supraviețuire posttraumatic, de la deces instantaneu și până la 4 luni posttraumatic. În funcție de intervalul de supraviețuire posttraumatic cazurile analizate au fost incluse în 4 categorii:deces în perioada supraacută(survenit de la câteva secunde, minute posttraumatic până la maximum 1 oră posttraumatic-3 cazuri);deces în perioada acută(survenit de la 1 oră până la maximum 24 de ore posttraumatic-3 cazuri);deces în perioada subacută(survenit între 1 și 14 zile posttraumatic-3 cazuri);deces în perioada cronică(survenit după 2 săptămâni posttraumatic-4 cazuri).

LOTUL II de studiu reprezintă lotul martor fiind alcătuit din 9 cazuri ce nu au prezentat istoric traumatic cranio-cerebral și la care necroptic nu au fost evidențiate leziuni cranio-cerebrale. Nu au fost incluse în lot cazuri cu antecedente de boli cerebro-vasculare.Cazurile

selectate au prezentat atât mecanism violent (5 cazuri) cât și neviolent(4 cazuri) de producere a decesului.

Tehnica de lucru utilizată

La fiecare dintre cele 13 cazuri aparținând lotului I, care au prezentat traumatisme cranio-cerebrale, au fost recoltate la necropsie câte 2 fragmente tisulare cerebrale. La fiecare dintre cele 9 cazuri martor aparținând lotului II, a fost recoltat câte un fragment tisular cerebral. Fragmentele cerebrale recoltate la autopsie au fost ulterior introduse în soluție fixatoare cu formol tamponat 10% și închise ermetic în recipiente cu un volum de 5 ori mai mare de formol decât masa piesei pentru o perioadă de 2 săptămâni. Fragmentele tisulare au fost incluse ulterior în blocuri de parafină.

Tehnica uzuală de colorarea secțiunilor cu H-E, tehnica IHC de colorare a secțiunilor precum și examenul microscopic al fragmentelor de țesut cerebral recoltate au fost realizate în Compartimentul de Anatomie Patologică și Laboratorul de IHC din cadrul Laboratorului Central „Medcenter”, București.

Cu ajutorul unui microtom SAKURA Accu-Cut SRM de la nivelul fiecărui bloc de parafină s-au taiat câte 3 secțiuni de 1,5-2μm grosime în plan coronal. Secțiunile au fost întise bine într-o baie de apă termostată la 400 °C și ulterior au fost etalate pe lame speciale, tratate în prealabil cu polysină (Polysine Slides). Lamele obținute au fost ținute timp de 4-6 ore la 600 °C. Secțiunile au fost supuse la 3 băi succesive de câte 8-10 minute în soluție SLIDE BRITE (Biocare Medical). Ulterior s-au realizat băi cu etanol absolut în diluții succesive, 95%-80%, timp de câte 8-10 minute. Secțiunile au fost rehidratate în apă deionizată timp de 10-15 minute. Secțiunile au fost colorate inițial folosind tehnica uzuală de colorare a secțiunilor cu Hematoxilin-Eozină.

Tehnica imunohistochimică de colorare a secțiunilor

Tehnica imunohistochimică a fost realizată manual, cu folosirea de anticorpi marcați în vederea determinării celulelor CASPAZ3+,GFAP+,CD68+ și CD163+.

Blocarea peroxidazei endogene- tratarea secțiunilor timp de 5 minute la temperatura camerei cu Peroxidazed 1 (Biocare medical), mai apoi lamele au fost spălate cu soluție tampon cu pH 7,6-TBS plus(Biocare medical).

Demascarea antigenului- s-a realizat prin fierbere timp de 45 de minute la o temperatură de 95⁰C (HIER-heat induced epitop retrieval) folosind Decloaking Chamber și o soluție tampon pe bază de citrat, cu pH 6, cu stabilitate ridicată la temperatură înaltă. Secțiunile au fost tratate cu Carezyme I – Trypsin (Biocare medical). Ulterior lamele au fost imersate în soluție tampon cu pH 7,6-TBS plus(Biocare medical).

Blocarea nespecifică- secțiunile au fost tratate cu soluție Background Sniper(Biocare medical) timp de 10 minute la temperatura camerei. La sfârșit lamele au fost spălate cu soluție tampon cu pH 7,6-TBS plus(Biocare medical).

Aplicarea Anticorpilor primari- pe secțiuni a fost aplicați 60 de minute la temperatura camerei următorii Ac primari : anti CASPASE-3(cleaved), anti GFAP, anti CD68 și anti CD163. La sfârșitul fiecărei etapei lamele au fost spălate cu soluție tampon pH 7,6-TBS

plus(Biocare medical).Fiecare Ac primar a fost utilizat în diluții conforme cu recomandările producătorului (Tabel VIII.2).

Tabel VIII.2.Anticorpii primari utilizați în realizarea colorației imunohistochemice

| Anticorpi primari utilizați | Tipul anticorpilor | Clona | Producătorul | Diluția |
|------------------------------------|---------------------------|--------------|---------------------|----------------|
| <i>CASPASE- 3 (cleaved)</i> | Policlonal de iepure | N/A | BIOCARE | 1:150 |
| <i>GFAP (M)</i> | Monoclonal de șoarece | GA-5 | BIOCARE | 1:100 |
| <i>CD68 [KP 1]</i> | Monoclonal de șoarece | KP1 | BIOCARE | 1:300 |
| <i>CD163</i> | Monoclonal de șoarece | 10D6 | BIOCARE | 1:100 |

Sistemul de detecție sondă/polimer- s-a fost folosit un sistem de detecție universal - MACH 4 Universal HRP-Polymer (Biocare medical), care poate detecta anticorpi atât anti-șoarece cât și anti-iepure. La nivelul secțiunilor a fost aplicată mai întâi sonda timp de 10 minute și mai apoi polimerul universal timp de 20 minute. La sfârșitul etapei lamele au fost spălate cu soluție tampon pH 7,6-TBS plus(Biocare medical).

Aplicarea DAB Cromogen- la nivelul secțiunilor a fost aplicat cromogen de tip 3,3'- Diaminobenzidină (DAB)-Biocare medical, în diluția recomandată de producător. La sfârșitul etapei lamele au fost spălate timp de 1-2 minute în apă deionizată.

Supracolorarea cu Hematoxilină CAT- lamele au fost imersate în Hematoxilină CAT(Biocare medical) timp de 1 minut..

Deshidratarea, clarificarea și montarea- secțiunile au fost imersate în baia Ottix Shaper (Diapath) timp de 10 minute și apoi în baia Ottix Plus (Diapath) pentru 10 minute, ulterior fiind montate pe lame cu ajutorul mediului de montare Micromount (Diapath).

Examinarea microscopică

Fragmentele cerebrale au fost examinate cu microscopie luminoasă, utilizându-se diferite obiective de mărire cu ajutorul microscopului cu lumină transmisă Leica ICC 50W cu sistem de fotografiere inclus.

Colorația standard Hematoxilin-Eozină

La cazurile aparținând lotului I (LOT TCC) au fost realizate câte 6 lame. La cazurile aparținând lotului martor s-au realizat câte 3 lame. S-au analizat câte 5 câmpuri microscopice, la obiectiv de 20x, de la nivelul celor trei/șase lame ale fiecărui caz studiat.

Examinarea semicantitativă a modificărilor histologice cerebrale a urmărit parametrii:

a. Stabilirea tipului leziunilor cerebrale :focale (1);difuze (2).

b. Stabilirea gradului de: congestie vasculară, edemului cerebral posttraumatic, reacției inflamatorii cerebrale, hemoragiei cerebrale și severității leziunilor neuronale și gliale. Cuantificarea parametrilor histologici s-a realizat astfel: 0=fără modificări; 1=modificări ușoare; 2=modificări moderate; 3=modificări severe.

Colorația inunohistochimică

S-a realizat o analiză cantitativă a numărului de celule caspaz3+, gfap+, cd68+ și cd163+ pentru fiecare dintre cazurile analizate.

Pe fiecare dintre cele trei/șase lame ale unui caz au fost analizate câte 5 câmpuri microscopice, cu obiectiv 20x, iar cu ajutorul unei grile oculare standardizate s-a realizat numărătoarea cu putere aleatorie mare a numărului de celule caspaz3+, gfap+, cd68+ și cd163+ pe câmp. Numărul final mediu de celule caspaz3+, gfap+,cd68+ și cd163+ pentru fiecare caz a fost stabilit prin numărarea tipurilor celulare menționate pe fiecare lamă, realizându-se o medie a determinărilor de pe fiecare 3/6 lame ale cazului. Densitatea celulelor caspaz3+, gfap+, cd68+ și cd163+ a fost stabilită raportându-se numărul final mediu de celule/mm² țesut cerebral.

Pentru lotul de traumatisme cranio-cerebrale s-a realizat o analiză cantitativă regională a numărului de celule caspaz3+, gfap+, cd68+ și cd163+ determinându-se numărul final mediu de celule la nivelul ariilor lezională, perilezională și la distanță. Densitatea celulelor cerebrale caspaz3+, gfap+, cd68+ și cd163+ la nivelul ariilor lezională, perilezională și la distanță a fost determinată prin raportarea numărului final mediu de celule/mm² țesut cerebral.

Analiza statistică

Datele au fost prelucrate statistic utilizând softul SPSS (SPSS pentru windows, versiunea 17.0). În etapa analitică, compararea loturilor și validarea ipotezei studiului, s-a făcut prin aplicarea testului parametric t-Student, varianta „Independent – Samples T Test” și a testul nonparametric Mann-Witney U. Testul de analiză a variației (ANOVA) precum și testul nonparametric Kruskal-Wallis au fost folosite pentru stabilirea diferențelor între parametrii grupurilor analizate.

Diferențele dintre loturi au fost considerate „semnificative statistic” la un prag acceptat p mai mic sau egal cu 0.05. Pentru compararea variabilelor calitative s-a aplicat testul Chi pătrat χ^2 sau Fisher's Exact Test. Relația dintre densitățile celulelor cerebrale și diferite variabile de interes a fost testată cu ajutorul analizei de corelație.

Rezultate

Colorația IHC pentru evidențierea celulelor cerebrale CASPAZ3+

Analiza lotului de studiu cu traumatisme cranio-cerebrale având interval variabil de supraviețuire posttraumatic a relevant următoarele aspecte:

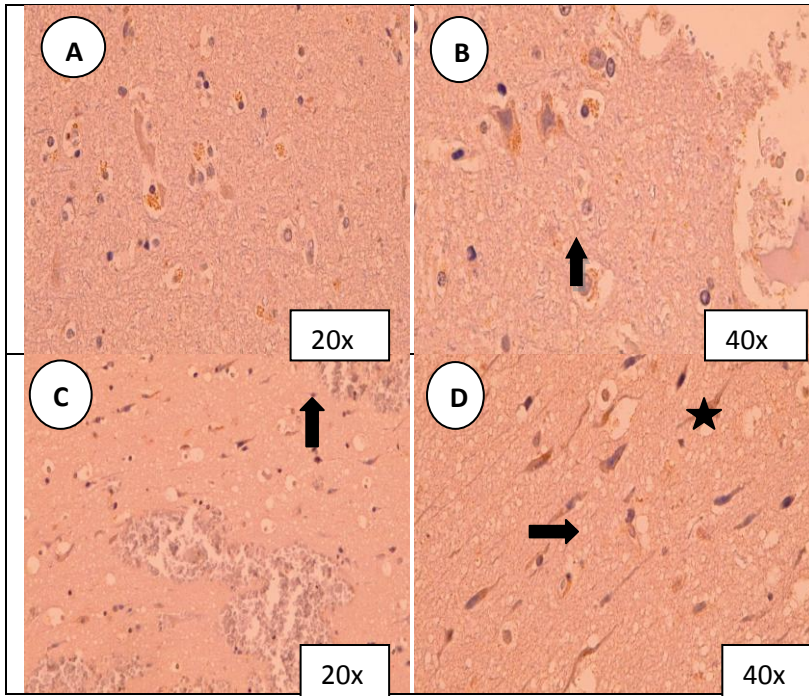
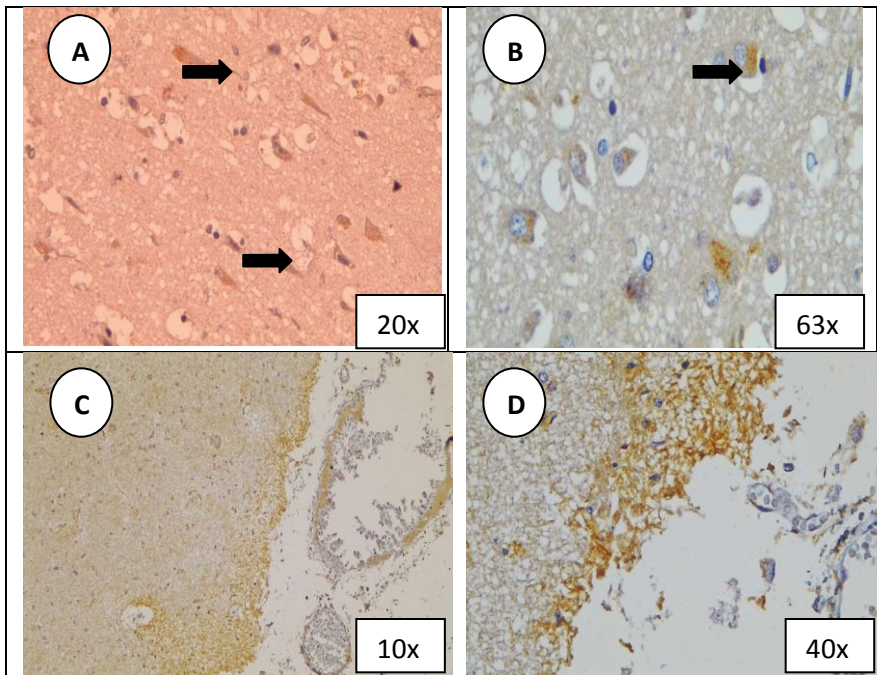


Fig.8.7. **La 25 de minute posttraumatic:** A,B (perilezional) evidențierea de neuroni caspaz3+ la nivel ariei perilezionale. Caspaza 3 a fost evidențiată sub formă de granule maronii dispersate la nivelul citoplasmei corpilor neuronali direct proporțional cu gradul de afectare neuronală; **La 45 de minute posttraumatic:** C(lezional-perilezional) ,D(perilezional)-neuroni și rare celule gliale caspaz3+ la nivelul ariei perilezionale. Caspaza 3 a fost observată sub formă de granule maronii dispuse difuz la nivelul citoplasmei corpilor neuronali și a celulelor gliale.

➡ celule neuronale caspaz3+, ★ celule gliale caspaz3+.



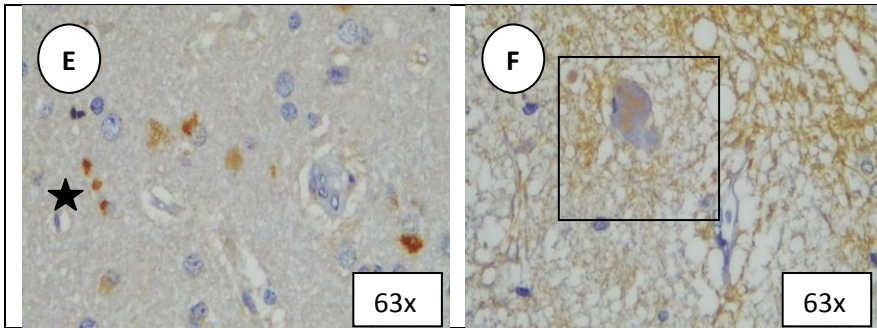


Fig 8.8. La o oră posttraumatic: A,B(perilezional) se observă numeroase celule neuronale caspaz3+ predominant la nivel perilezional. La 3 ore posttraumatic(C-F) se observă celule neuronale și gliale caspaz3+ dispuse mai ales lezional. C,D-Densificare a granulelor caspazice la nivel lezional cerebral, se observă multiple granule maronii de caspază 3 distribuite difuz extracelular, la nivelul țesutului cerebral subpial. E- Detaliu de la nivel lezional, multiple celule apoptotice gliale și neuronale caspaz3+; F -Detaliu de la nivel lezional, neuron în apoptoză. La 1 oră și la 3 ore posttraumatic caspaza3 a fost evidențiată sub formă de granule maronii dispuse difuz intracelular la nivelul citoplasmei neuronilor și celulelor gliale

➡ celule neuronale caspaz3+, ★ celule gliale caspaz3+.

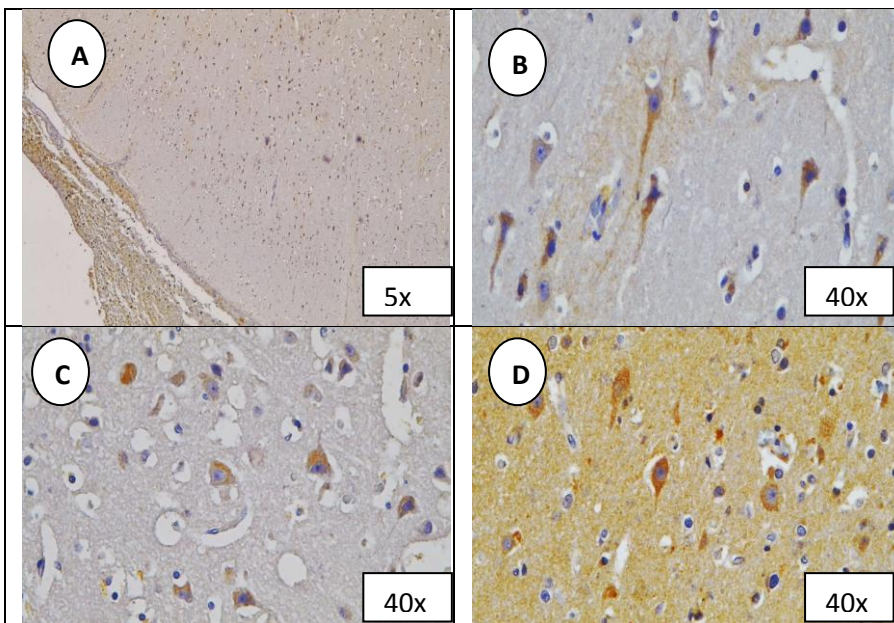


Fig.8.9. La 6 ore posttraumatic(A,B,) A-număr ridicat de celule caspaz3+ neuronale situate lezional și perilezional cerebral;B-detaliu perilezional cu observarea de granule maronii caspazice extracelulare dispuse difuz neomogen în substanța cerebrală, în jurul neuronilor caspaz3+. La 1 zi posttraumatic(C)-numeroase celule neuronale și gliale caspaz3+ situate perilezional. La 6 zile posttraumatic(D)-celule apoptotice neuronale și gliale caspaz3+ la nivel perilezional, se observă dispoziția extracelulară a granulelor caspaz3+ cu aspect difuz omogen la nivelul substanței cerebrale. La 6 ore, 1 zi și 6 zile posttraumatic expresia crescută a caspaza3 la nivel neuronal și glial a făcut ca aspectul maroniu granular difuz intracitoplasmatic să fie mai puțin observat, mai frecvent citoplasma celulelor neuronale și gliale a fost ocupată în totalitate de multiple granule caspazice cu aspect confluent de „pată caspazică”. Atât la nivel lezional cât mai ales perilezional granulele maronii de caspază 3 au prezentat pe alocuri dispersie extracelulară tisulară cerebrală, fiind situate difuz neomogen la 6 ore posttraumatic(B) și difuz omogen la 6 zile posttraumatic(D)

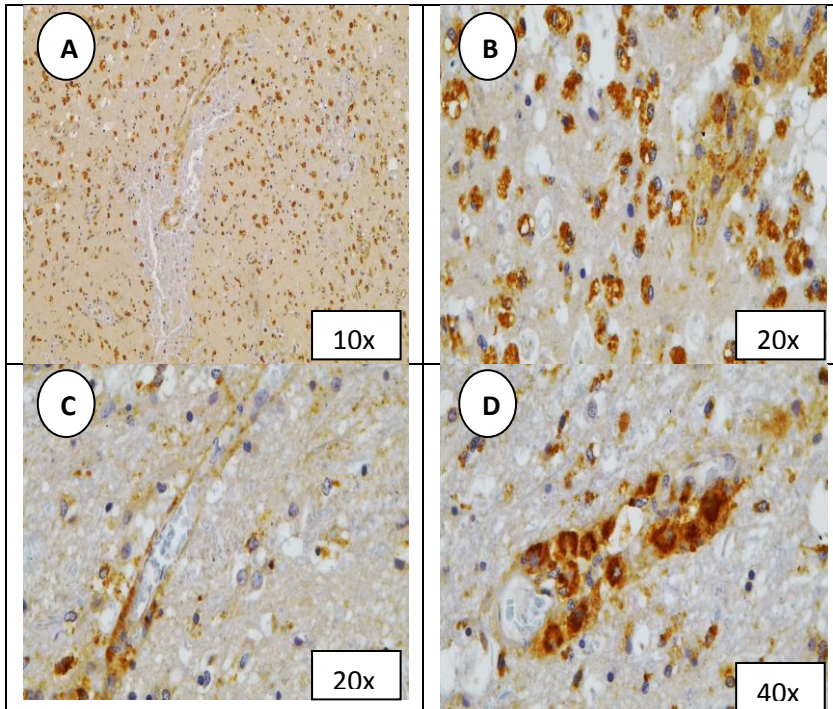
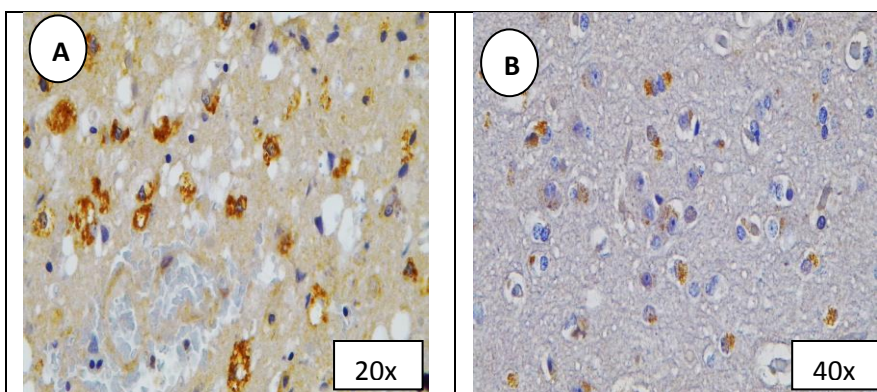


Fig.8.10. La 8 zile posttraumatic(A-D) se observă cea mai intensă reacție pozitivă a caspazei 3 și cel mai ridicat număr de celule neuronale și gliale caspaz3+.A-multiple celule neuronale și gliale caspaz3+ distribuite lezional și perilezional. B-Leziuni severe de apoptoză neuronală și glială la nivel perilezional;C-Granule maronii de caspază 3 distribuite la nivelul endoteliului vascular, zona lezională; D-Multiple granule maronii de caspază3,intens colorate situate la nivelul celulelor gliale perivasculare-apoptoze ale celulelor gliale perivasculare; Caspaza 3 a fost evidențiată sub formă de numeroase granule maronii, cu intensitate variabilă a colorației de la galben-marونی până la marونی-închis dispuse pe un fond gălbui citoplasmatic cu realizarea unui aspect mozaicat celular.Granulele maronii de caspaz3+ au ocupat aproape în totalitate citoplasma celulară, evidențindu-se numeroase celule neuronale și gliale caspaz3+cu nucleul lizat.



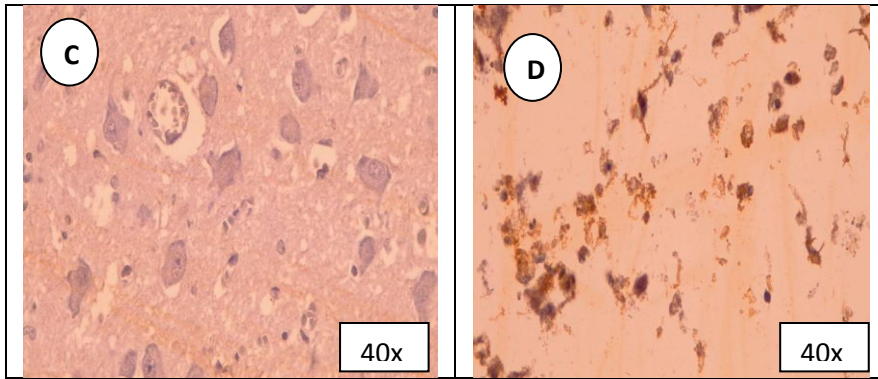
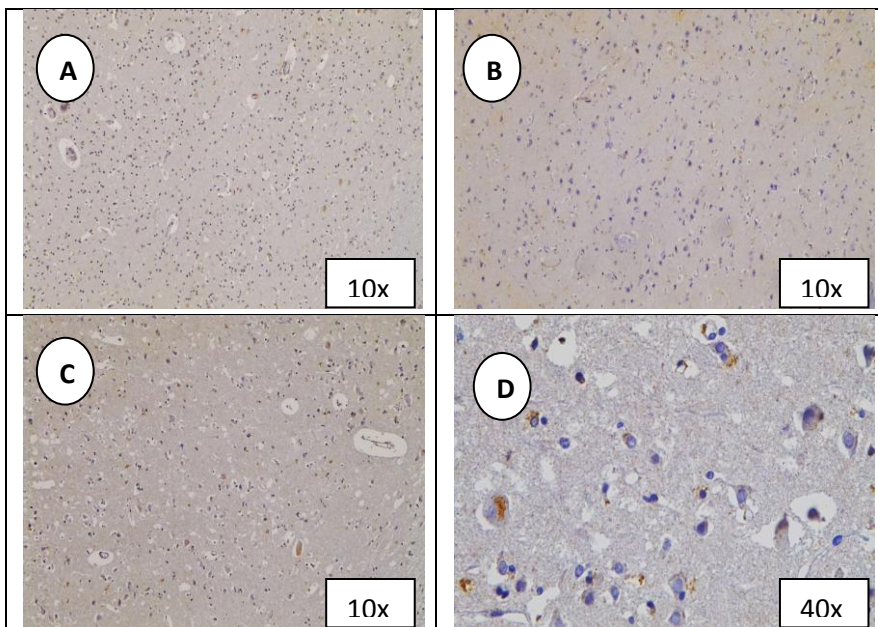


Fig.8.11. La 2 săptămâni posttraumatic(A) se observă multiple celule neuronale și gliale caspaz3+ la nivel lezional și perilezional. La 1 lună posttraumatic(B) se remarcă scăderea numărului de celule neuronale și gliale caspaz3+ lezional și perilezional. La 2 săptămâni(A) și la 1 lună posttraumatic(B) caspaza 3 a fost observată sub formă de numeroase granule maronii cu intensitate variabilă a colorației de la galben-marونیu și până la marونیu închis pe fondul unei colorații gălbui a citoplasmei cu realizarea unui aspect mozaicat al celulelor neuronale și gliale caspaz3+, rare celule neuronale și gliale caspaz3+ au prezentat o distribuție granulară difuză citoplasmatică a granulelor caspazice. La 2 luni posttraumatic(C) nu au fost evidențiate celule neuronale și gliale caspaz3+. La 4 luni posttraumatic(D) reacție nespecifică a caspazei 3 datorită modificărilor distructive tisulare severe cerebrale. Caspaza 3 a fost evidențiată preponderent extracelular, granulele maronii caspaz3+ fiind dispuse perineuronal și perigial cu aspect granular confluent. Au fost evidențiate puține celule neuronale și gliale caspaz3+ cu dispoziție difuză intracitoplasmatică a granulelor maronii caspaz3+.



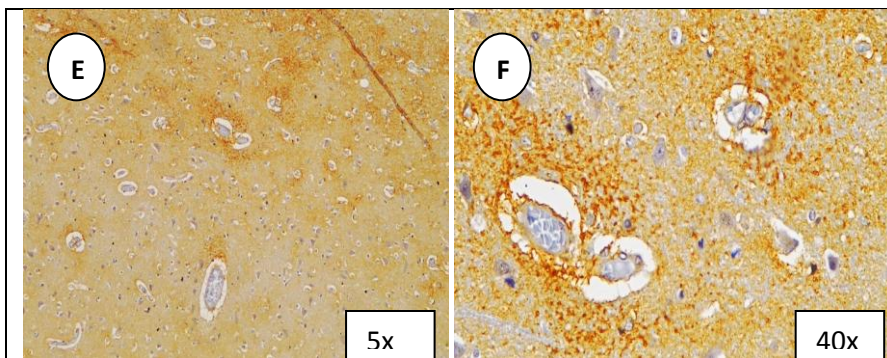
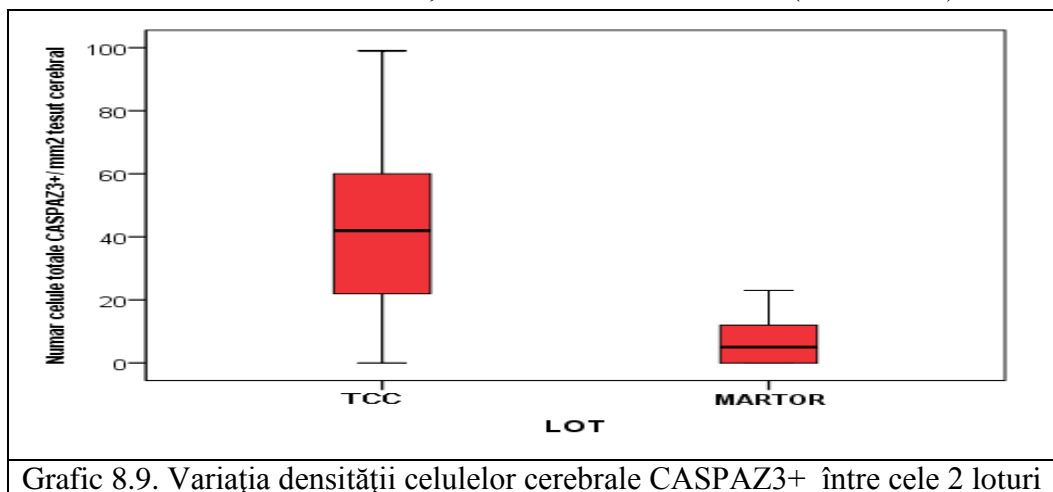
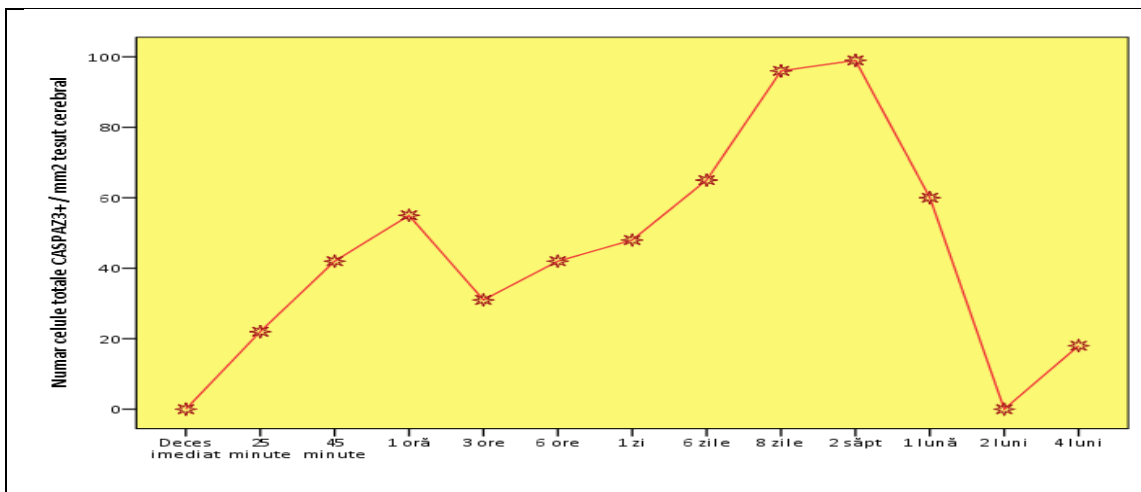


Fig.8.12. **Analiza cazurilor de control:** A- Reacție negativă a caspazei 3 în cadrul infarctului miocardic acut; B- Reacție slab pozitivă a caspazei 3 în submersia hidrică; C- Reacție slab pozitivă a caspazei 3 în strangulare; D- Rare celule neuronale caspaz3+ distribuite difuz la nivel cerebral în strangulare. Caspaza 3 a fost evidențiată sub formă de mici granule maronii distribuite difuz în citoplasma neuronilor; E- Reacție cerebrală intens pozitivă a caspazei 3 în cadrul șocului toxico-septic; F- Detaliu în șocul toxico-septic distribuție extracelulară a granulelor maronii de caspază 3 focal difuz și perivascular. Multiple celule gliale caspaz 3+, ce au prezentat multiple granule maronii dispuse difuz intracitoplasmatic.

Analiza statistică a densității celulelor cerebrale CASPAZ3+ a arătat diferențe semnificative statistice ale densității celulare ($p < 0.05$) între cele 2 loturi analizate. Densitatea cerebrală a celulelor CASPAZ3+ a fost mai ridicată atât ca amplitudine cât și ca tendință centrală în cazurile aparținând lotului de studiu, ce a inclus traumatismele crano-cerebrale cu intervale variabile de supraviețuire față de cazurile din lotul martor, care nu au prezentat istoric de traumatisme crano-cerebrale, având alte cauze de deces. (Grafic 8.9.)



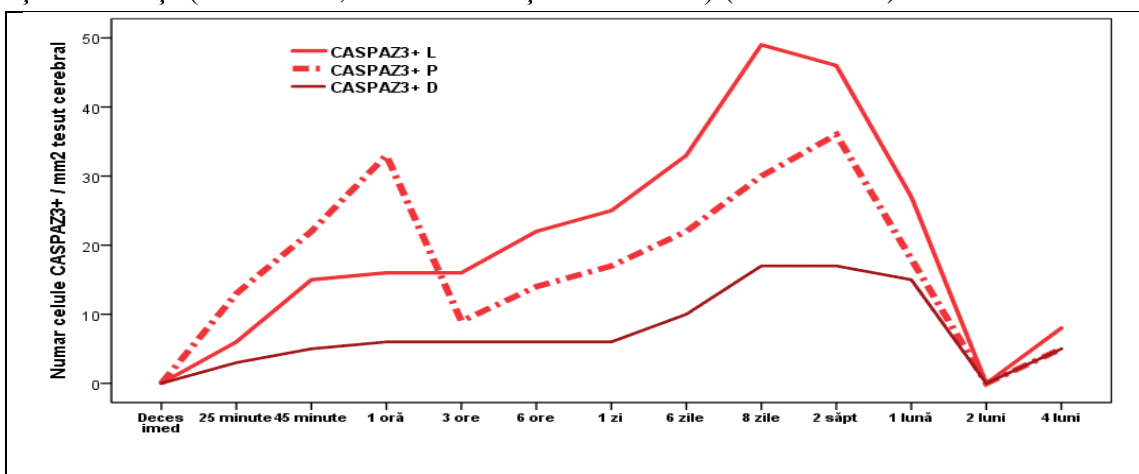
Analiza stratificată a densității celulelor CASPAZ3+ de tip neuronal și glial în raport cu diagnosticul necrotic evidențiază diferențe semnificative statistice ($p < 0.05$) între cele două loturi analizate, valorile medii ale ambelor tipuri celulare CASPAZ3+ fiind superioare în lotul cu traumatisme crano-cerebrale față de cele din lotul martor. Diferențele semnificative statistice ale numărului celulelor CASPAZ3+ neuronale și gliale s-au consemnat între lotul cu TCC și cele 2 subloturi martor ($p < 0.05$) chiar și în cazul raportării la tipul morții.



Grafic 8.12. Variația densității celulelor cerebrale CASPAZ3+ în raport cu durata de supraviețuire posttraumatică, în cadrul lotului de studiu cu traumatisme cranio-cerebrale

În raport cu durata de supraviețuire posttraumatică, densitatea celulelor cerebrale CASPAZ3+, prezintă o evoluție variabilă. La 2 săptămâni posttraumatic s-a înregistrat cea mai ridicată densitate cerebrală a celulelor CASPAZ3+. (Grafic 8.12.)

Analiza variației densității celulelor neuronale și gliale CASPAZ3+ în funcție de momentul decesului posttraumatic a arătat că indiferent de momentul decesului posttraumatic densitatea celulelor cerebrale CASPAZ3+ neuronale a fost mai ridicată decât densitatea celulelor gliale CASPAZ3+. În raport cu aria lezională, densitatea celulelor cerebrale CASPAZ3+ situate lezional și perilezional a fost semnificativ mai mare ($p=0.0102$, $p=0.0151$) decât a celor de la distanță. Valorile maxime ale densității celulelor CASPAZ3+ s-au înregistrat la nivel lezional (medie de 19,8 celule/mm² țesut cerebral) fiind urmate de valorile densității celulelor CASPAZ3+ la nivel perilezional (medie de 16,5 celule/mm² țesut cerebral) și la distanță (medie de 7,4 celule/mm² țesut cerebral). (Grafic 8.14.)



Legendă: L=lezional;P=perilezional;D=la distanță față de leziune.

Grafic 8.14. Variația densității celulelor cerebrale CASPAZ3+ la nivel lezional,perilezional și la distanță în funcție de durata de supraviețuire posttraumatism cranio-cerebral

Analiza densității celulelor cerebrale CASPAZ3+ în funcție de perioada de supraviețuire posttraumatică arată că densitatea maximă a celulelor cerebrale CASPAZ3+ se consemnează în perioada decesului subacut iar densitatea minimă în perioada supraacută a decesului.

Dacă analiza densității celulelor cerebrale CASPAZ3+ se face în raport cu aria lezională și perioada decesului posttraumatic în cazul decesului acut ($p=0.003$) și subacut ($p=0.033$) celule CASPAZ3+ de la nivel lezional(CASPAZ3+L) sunt semnificativ mai multe decât cele situate la distanță. În perioada decesului supraacut și acut posttraumatic cele mai multe celule CASPAZ3+ au fost evidențiate la nivel perilezional iar în perioadele subacute și cronice ale decesului posttraumatic s-a reamărcat o densitate ridicată a celulelor CASPAZ3+ la nivel lezional.

Colorația IHC pentru evidențierea celulelor cerebrale GFAP+

Analiza lotului de studiu cu traumatisme crano-cerebrale având interval variabil de supraviețuire posttraumatic a relevat următoarele aspecte:

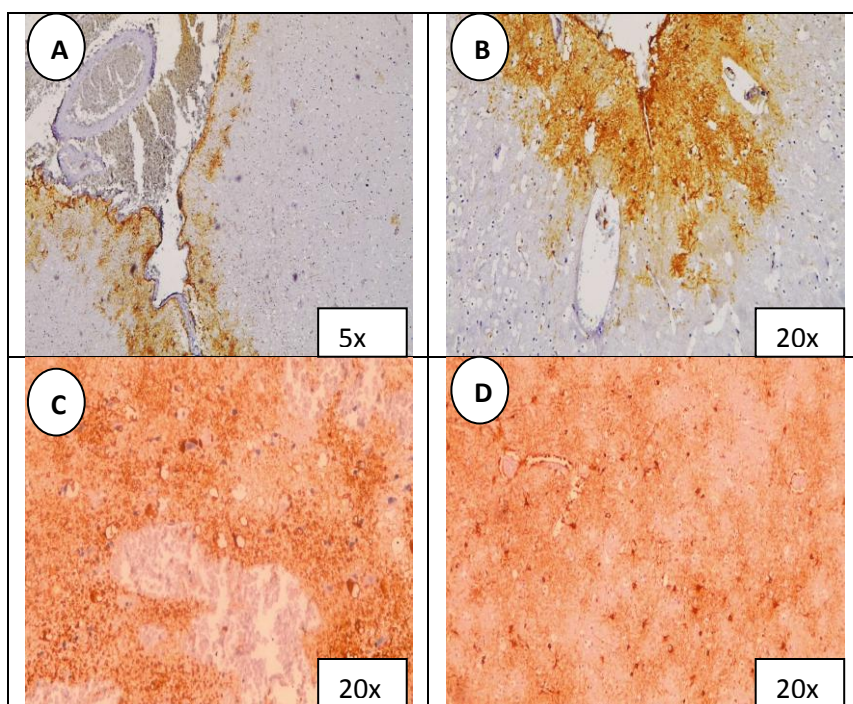


Fig.8.13. Deces imediat posttraumatic:A,B(lezional-perilezional), imunopozitivitate scăzută a reacției GFAP+ cu creșterea expresiei celulelor GFAP+ la nivel lezional și perilezional, se observă astrocite ușor hipertrofiate mai ales la nivelul corpului celular, prelungiri astrocitare subțiri cu aspect filamentar. **La 25 de minute posttraumatic** :C(lezional-perilezional),D(perilezional) – imunopozitivitate redusă a reacției GFAP+,aspect de ușoară hipertrofie astrocitară, balonizarea corpului celular cu prelungiri astrocitare subțiri, aspect de „arborizație perineuronală” în ariile ischemice perilezionale.[50]

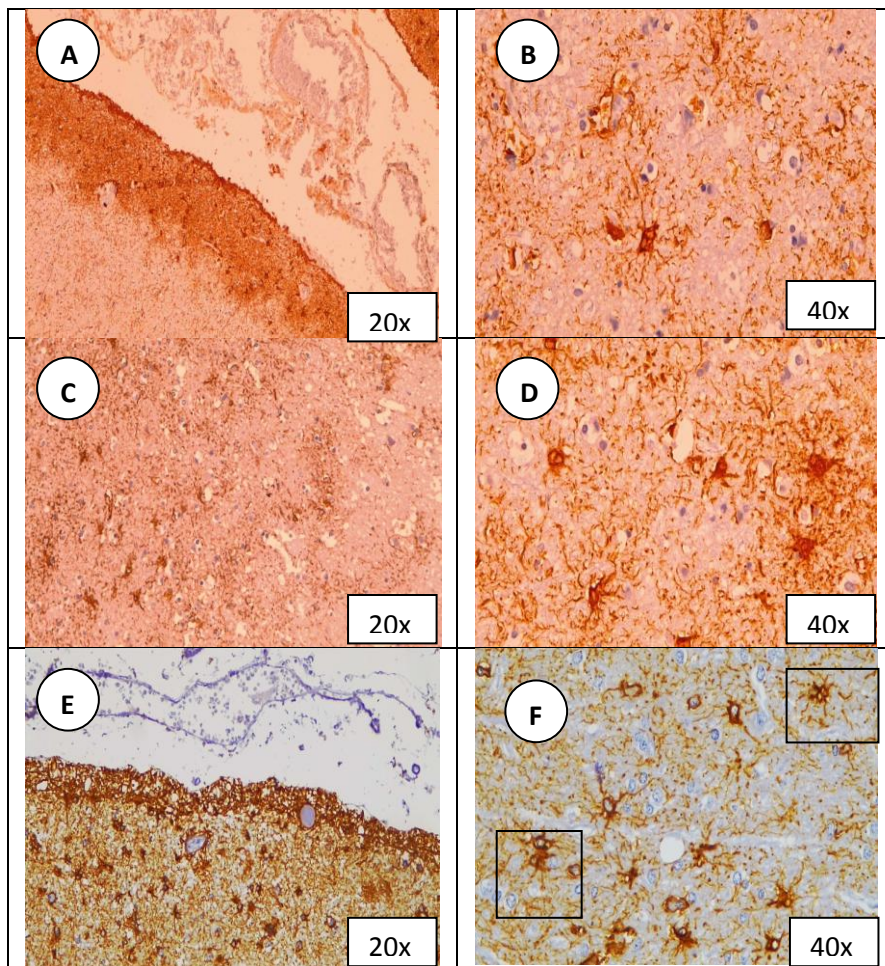
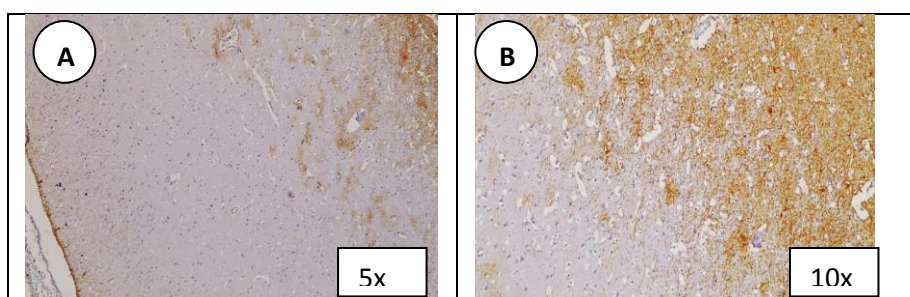


Fig.8.14. La 45 de minute posttraumatic: A(lezional-perilezional), B(perilezional) imunopozitivitate moderată a reacției GFAP, cu prezența de multiple celule astrocitare moderat hipertrofiate atât lezional cât și perilezional, se observă mărirea în volum a corpului astrocitar și evidențierea prelungirilor celulare ce apar îngroșate, nu se observă suprapuneri ale domeniilor astrocitare.**La 1 oră posttraumatic:** C,D(perilezional), imunopozitivitate moderată a reacției GFAP, celule astrocitare moderat hipertrofiate, corp astrocitar crescut în volum cu evidențierea de numeroase prelungiri astrocitare îngroșate, rare zone de suprapunere ale domeniilor astrocitare.**La 3 ore posttraumatic:** E(lezional),F(perilezional)imunopozitivitate ridicată a reacției GFAP, numeroase astrocite moderat hipertrofiate, corp astrocitar mult mărit în volum cu multiple prelungiri astrocitare îngroșate, se observă suprapuneri ale domeniilor celulelor astrocitare(F). [50]



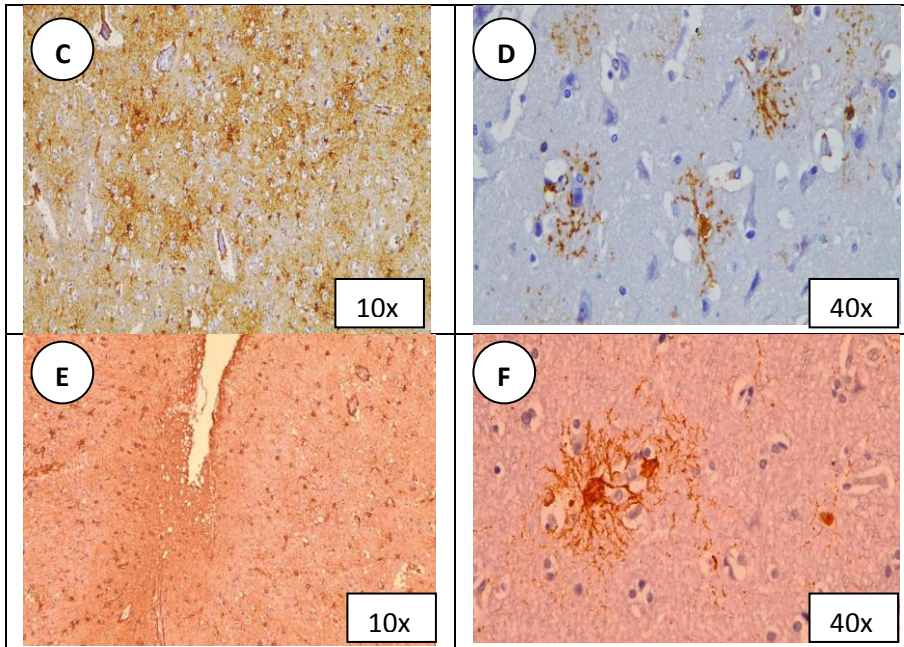


Fig.8.15. La 6 ore posttraumatic: A(lezional),B(lezional-perilezional) imunopozitivitate crescută a reacției GFAP,se observă numeroase celule astrocitare GFAP+perilezional.Astroците GFAP+ au prezentat modificări hipertrofice moderate, corp astrocitar crescut în volum, prelungiri astrocitare îngroșate, cu rare arii de suprapunere ale prelungirilor astrocitare. **La 1 zi posttraumatic:** C,D(perilezional) imunopozitivitate crescută a reacției GFAP, hipertrofie astrocitară moderată, pe alocuri se observă fragmentarea celulelor astrocitare, corpul astrocitar este destins de volum și apare separat de prelungirile astrocitare hipertrofice adiacente. **La 6 zile posttraumatic:** E(lezional-perilezional),F(perilezional) imunopozitivitate ridicată a reacției GFAP, densitate scăzută a celulelor GFAP+ mai ales la nivel lezional. Astroците cu modificări hipertrofice moderate, corp destins de volum, multiple prelungiri astrocitare îngroșate, arii de suprapunere ale prelungirilor astrocitare.[50]

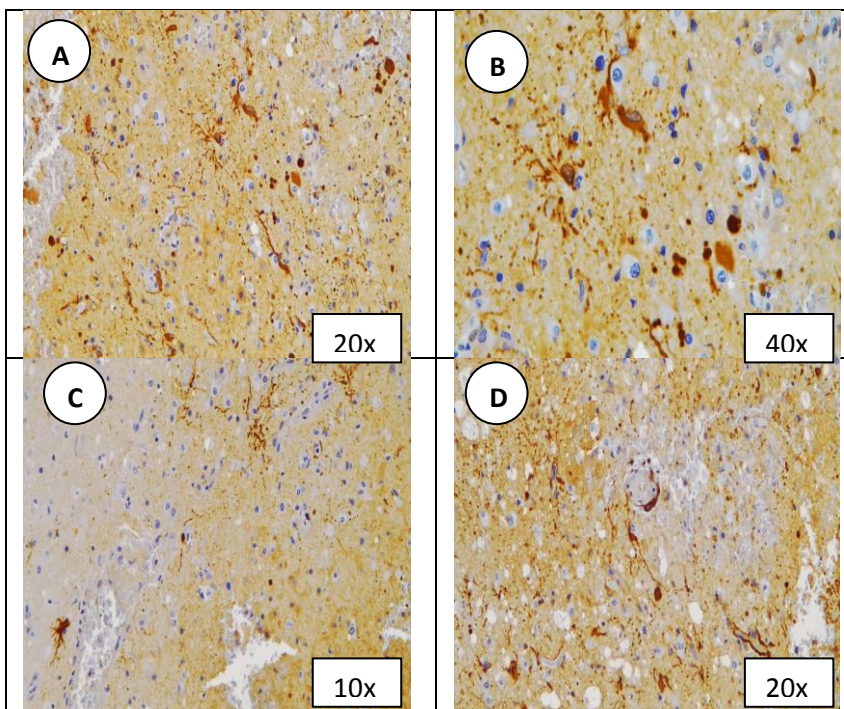


Fig.8.16. La 8 zile posttraumatic:A,B(lezional)imunopozitivitate crescută a reacției GFAP, număr scăzut de celule GFAP+ cu modificări hipertrofice moderate cu alterarea morfologiei celulare,corpul celular astrocitar mult mărit de volum ce apare separat de prelungirile astrocitare. **La 2 săptămâni posttraumatic :**C,D (lezional), imunopozitivitate ridicată a reacției GFAP, celule astrocitare cu hipertrofie moderată și alterări morfologice, leziuni extinse de fragmentare astrocitară,aspect dispersat al corpurilor și prelungirilor astrocitare. [50]

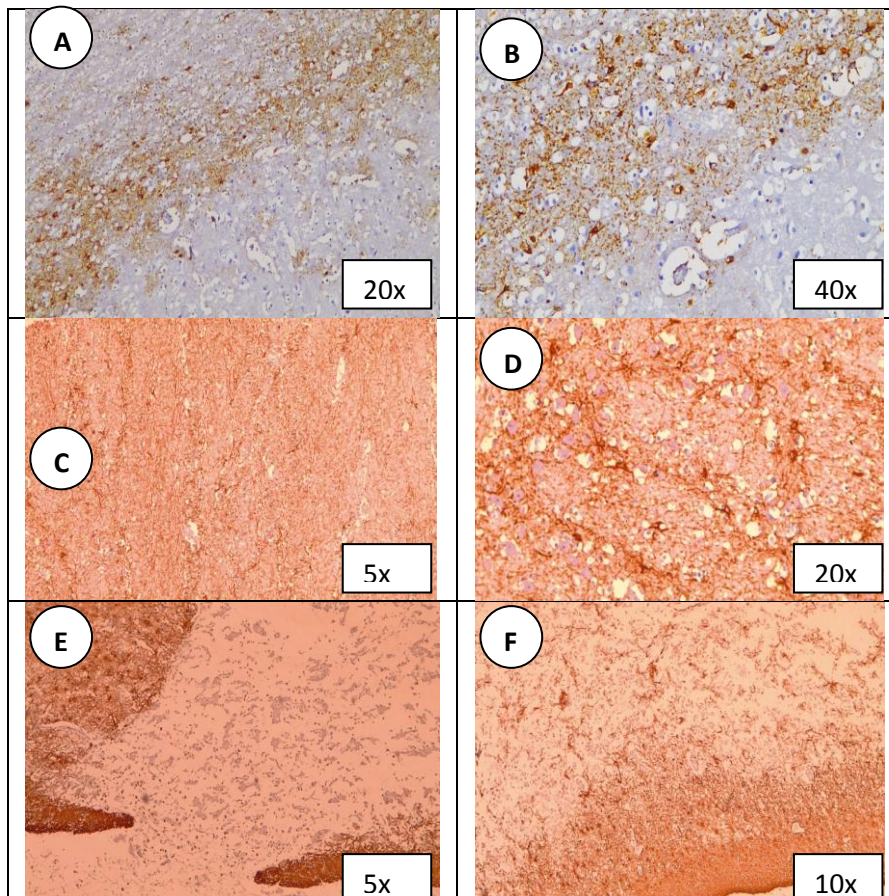


Fig.8.17. La 1 lună posttraumatic:A(lezional-perilezional),B(lezional) imunopozitivitate ridicată a reacției GFAP, numeroase celule GFAP+ la nivel lezional cu hipertrofie astrocitară severă, corp astrocitar mult crescut în volum, prelungiri astrocitare îngroșate, confluențe, astrocitoză reactivă severă cu formarea unei cicatrice gliale. **La 2 luni posttraumatic:** C,D(lezional) necroză laminară cu glioză, imunopozitivitate ridicată a reacției GFAP, celule astrocitare cu hipertrofie severă, numeroase zone de suprapunere ale prelungirilor astrocitare și constituirea unor zone cicatriceale gliale extinse. **La 4 luni posttraumatic:**E,F(lezional-perilezional) imunopozitivitate ridicată a reacției GFAP, număr redus de celule astrocitare cu modificări hipertrofice severe și alterări importante ale morfologiei, numeroase corpuri astrocitare separate de pseudopodele astrocitare, domenii de suprapunere ale celulelor astrocitare. [50]

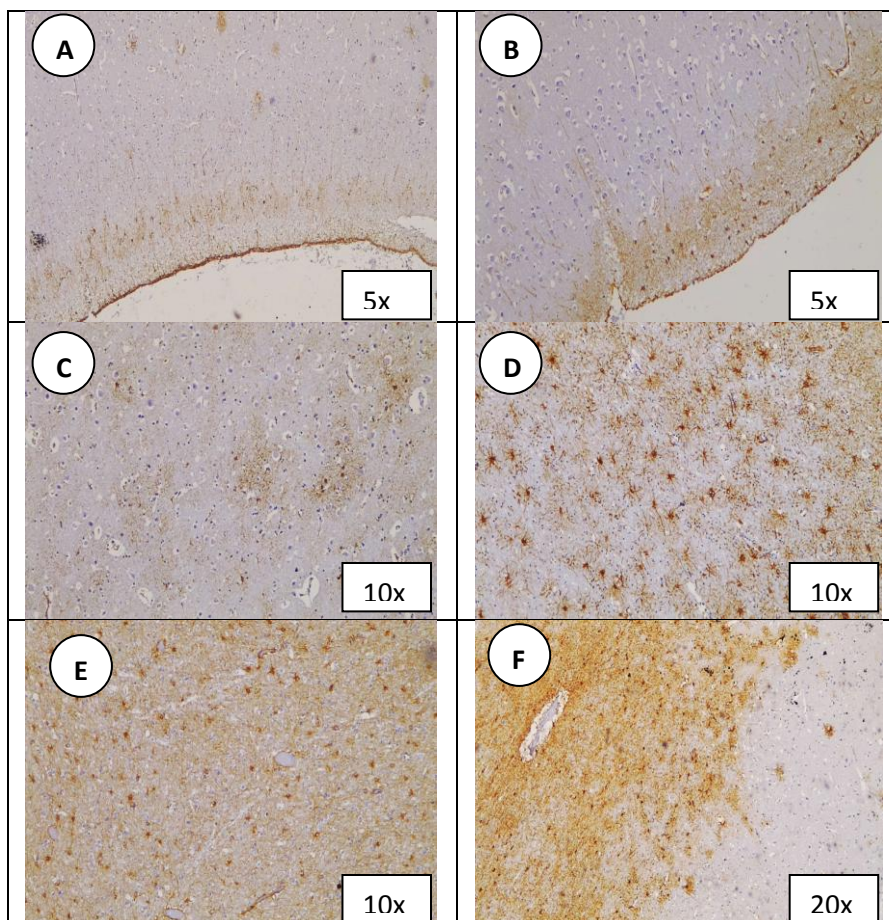
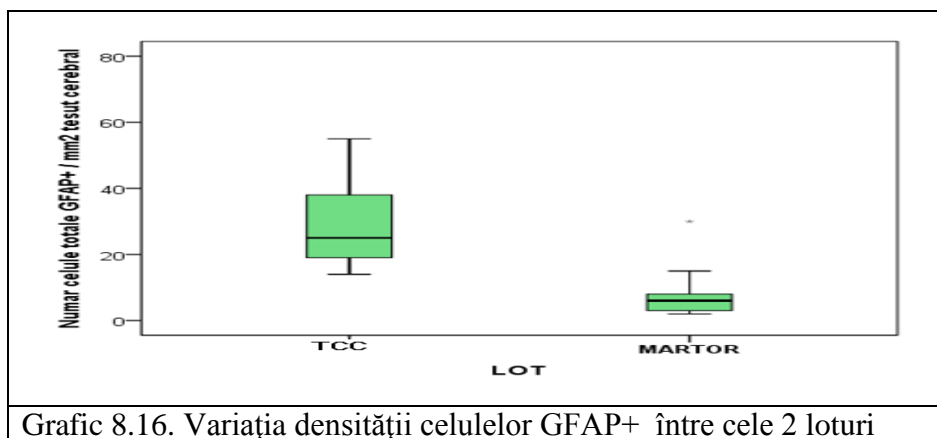


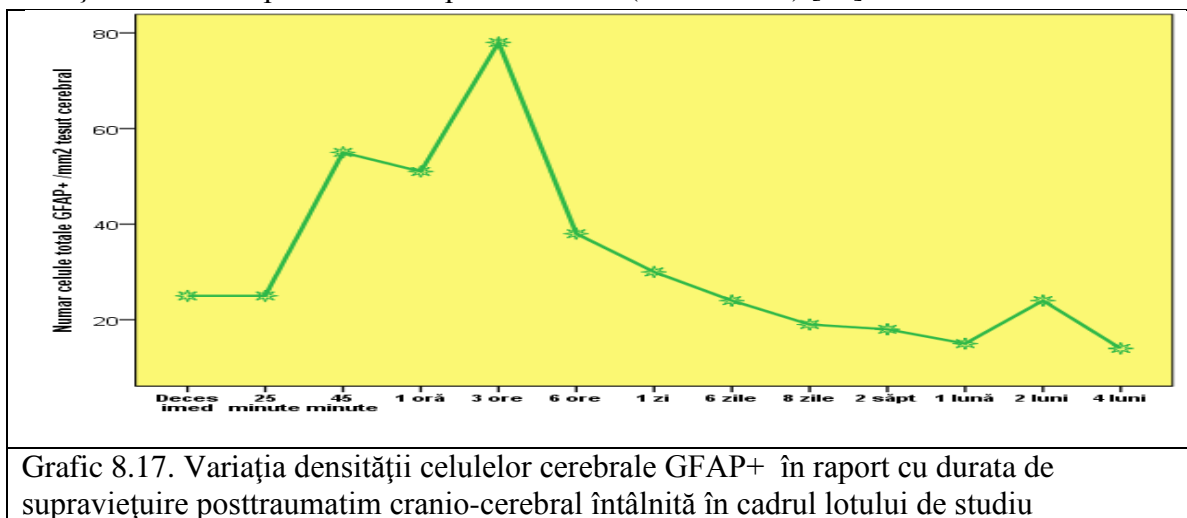
Fig.8.18. Analiza cazurilor de control :Intensitate redusă a colorației imunohistochimice GFAP, rare celule celule astrocitare ușor hipertrofice dispersate difuz la nivelul parenchimului cerebral, evidențierea corpului celular ușor mărit cu prelungiri astrocitare subțiri, filamentare în intoxicația cu organofosforice(A) ,trombembolism pulmonar(B) și strangulare(C).Intensitate moderată a colorației imunohistochimice GFAP,număr moderat de celule astrocitare cu modificări ușoare de hipertrofie dispersate omogen, difuz la nivel cerebral, balonizarea corpului astrocitar cu pseudopode astrocitare filamentare în miocardofibroză (D) și hipotermie(E). Intensitate moderată a reacției GFAP,expresie crescută a astrocitelor GFAP+ ușor hipertrofice dispuse focal difuz perivascular în electrocuție.(F) Corp celular balonizat cu prelungiri astrocitare subțiri, fără domenii de suprapunere ale prelungirilor astrocitare.[50]

Analiza statistică a densității celulelor cerebrale GFAP+ a arătat diferențe semnificative statistic ale densității celulare între cele 2 loturi analizate($p < 0.05$). Densitatea cerebrală a celulelor GFAP+ a fost mai ridicată atât ca amplitudine cât și ca tendință centrală în cazurile aparținând lotului de studiu, ce a inclus traumatismele cranio-cerebrale cu intervale variabile de supraviețuire față de cazurile din lotul martor, care nu au prezentat istoric de traumatisme cranio-cerebrale, având alte cauze de deces.(Grafic 8.16.) [50]



Grafic 8.16. Variația densității celulelor GFAP+ între cele 2 loturi

În raport cu durata de supraviețuire posttraumatică, densitatea celulelor cerebrale GFAP+ prezintă o evoluție variabilă, ascendentă, cu un maxim la 3 ore, urmată de o descreștere continuă până la 4 luni posttraumatic.(Grafic 8.17.) [50]

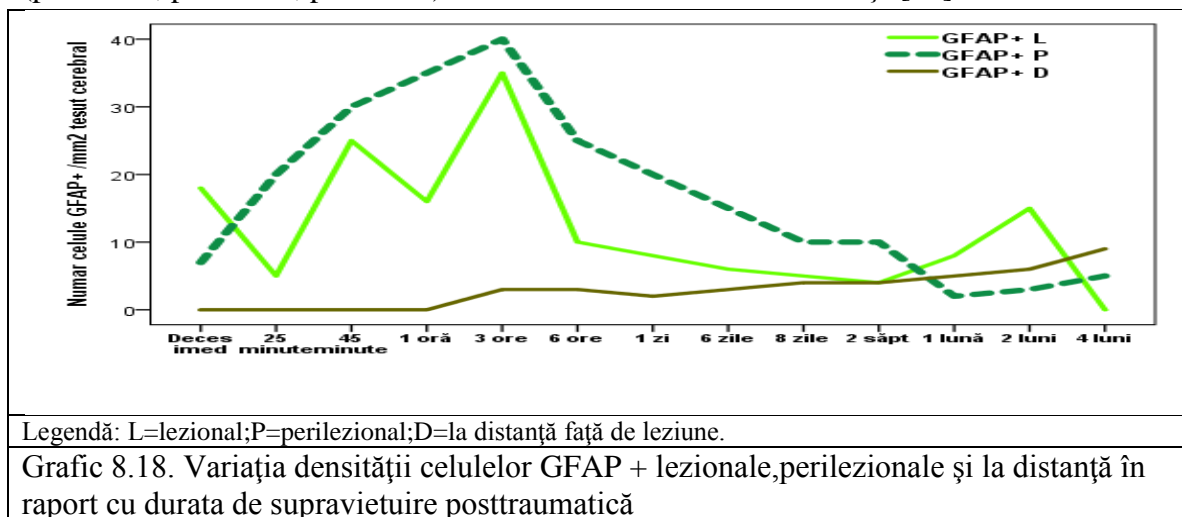


Grafic 8.17. Variația densității celulelor cerebrale GFAP+ în raport cu durata de supraviețuire posttraumatim cranio-cerebral întâlnită în cadrul lotului de studiu

Analiza densității celulelor cerebrale GFAP+ în raport cu aria lezională arată că densitatea celulelor cerebrale GFAP+ lezionale și perilezionale a fost semnificativ mai mare ($p=0.0221$, $p=0.0277$) decât a celulelor situate la distanță. Valorile maxime se înregistrează pentru celulele GFAP+ perilezionale (medie de 17,08 celule/mm² țesut cerebral) urmate de celulele GFAP+ lezionale (medie de 11,92 celule/mm² țesut cerebral) și cea mai scăzută valoare se înregistrează pentru celulele cerebrale GFAP+ situate la distanță față de leziune (medie de 3 celule/mm² țesut cerebral).(Grafic 8.18.) [50]

Analiza densității celulelor cerebrale GFAP+ în raport cu aria lezională și perioada decedului posttraumatic arată că densitatea celulelor GFAP+ diferă semnificativ statistic în cazul celulelor GFAP+ perilezionale (0.005) și respectiv a celulelor GFAP+ situate la distanță. Densitatea maximă a celulelor GFAP+ de la nivelul ariei lezionale a fost întâlnită în decesul acut(20,33 celule/mm² țesut cerebral) iar cea minimă în decesul subacut(6,33 celule/mm² țesut cerebral). Densitatea maximă a celulelor GFAP+perilezionale s-a observat în decesul acut(33,33 celule/mm² țesut cerebral) și cea minimă în decesul cronic (5 celule/mm² țesut

cerebral). Densitatea maximă a celulelor GFAP+ de la distanță s-a înregistrat în decesul cronic (6 celule/mm² țesut cerebral) iar cea minimă în decesul supraacut. În cazul decesului supraacut, acut și subacut celulele perilezionale GFAP+ au fost semnificativ statistic ($p=0.0462$; $p=0.0023$; $p=0.0151$) mai multe decât cele de la distanță. [50]



Colorația IHC pentru evidențierea celulelor cerebrale CD68+

Analiza lotului de studiu cu traumatisme crano-cerebrale având interval variabil de supraviețuire posttraumatic a relevat următoarele aspecte:

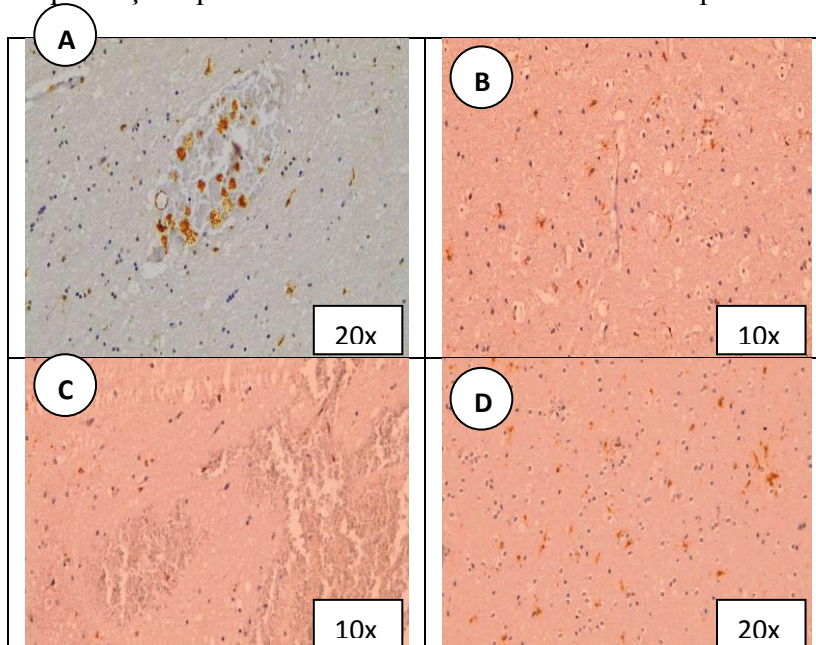


Fig.8.20. **Deces imediat posttraumatic:** A (lezional-perilezional) celule macrofagice activate CD68+ cu reacție fagocitară hematică, situate predominant lezional, la nivelul focarelor hemoragice. **Deces la 25 de minute posttraumatic:** B (perilezional) celule microgliale activate CD68+ dispuse difuz omogen cerebral, reacție de satelitoză în jurul celulelor neuronale lezate. **Deces la 45 de minute posttraumatic:** C (lezional-perilezional),

D(perilezional), rare celule macrofagice CD68+ la nivel lezional; celule microgliale activate CD68+ dispuse omogen difuz, predominant perilezional.

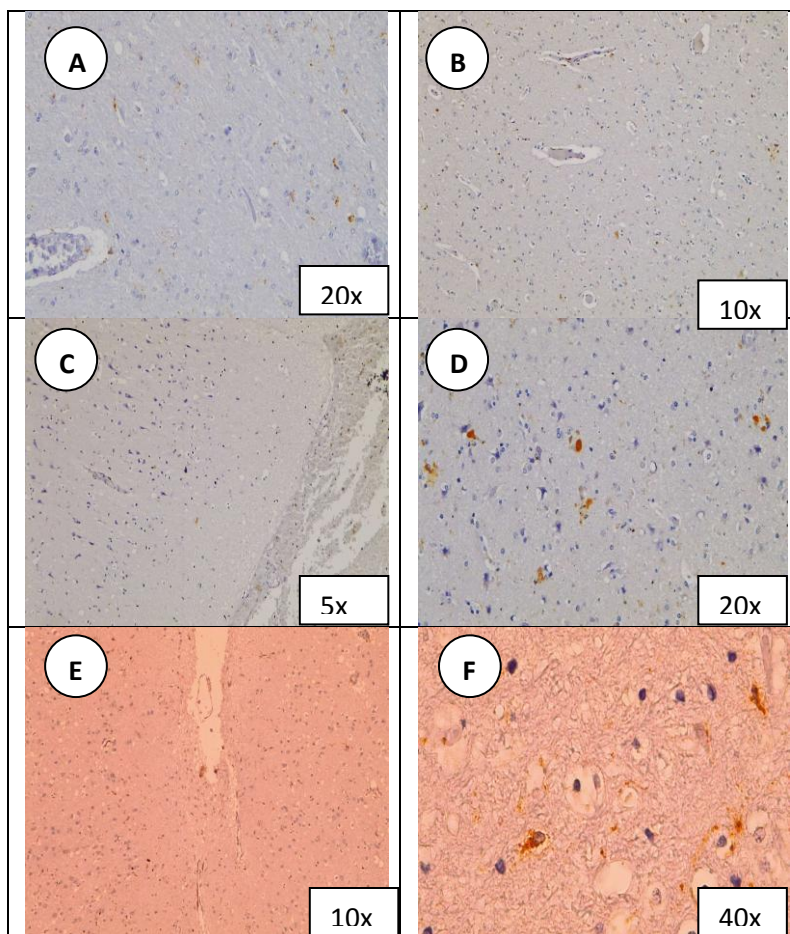


Fig.8.21. La 3 ore de supraviețuire posttraumatic, A(perilezional) și la 6 ore de supraviețuire posttraumatic, B(perilezional) rare celule microgliale activate CD68+ dispuse difuz la nivel cerebral. La 1 zi posttraumatic: C(lezional-perilezional), D(perilezional) număr scăzut de celule microgliale activate CD68+ dispuse omogen. La 6 zile posttraumatic: E(lezional-perilezional), F(perilezional) rare celule microgliale activate CD68+ dispuse omogen difuz la nivelul parenchimului cerebral. Celulele microgliale activate au efect de satelitoză perineuronală, fiind situate în jurul neuronilor hipoxici.

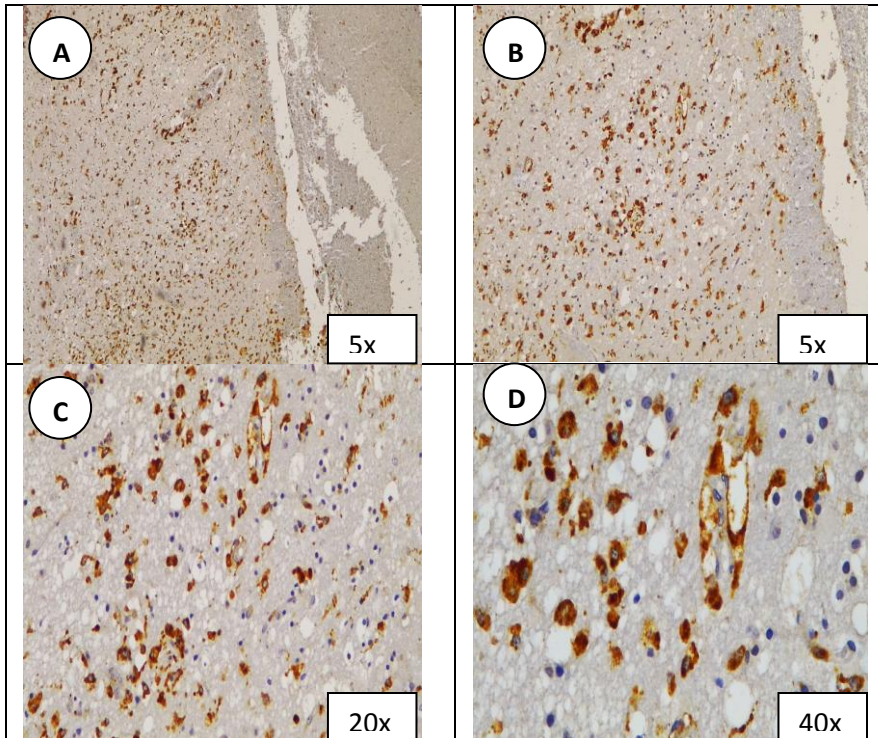


Fig.8.23. La 8 zile posttraumatic: A,B(lezional-perilezional);C,D(lezional) se remarcă un număr crescut de macrofage activate CD68+ dispuse lezional și perilezional. Rare celule microgliale activate CD68+ situate lezional și perilezional. Numeroase celule macrofagice activate CD68+situate perivascular la nivel lezional(C,D)

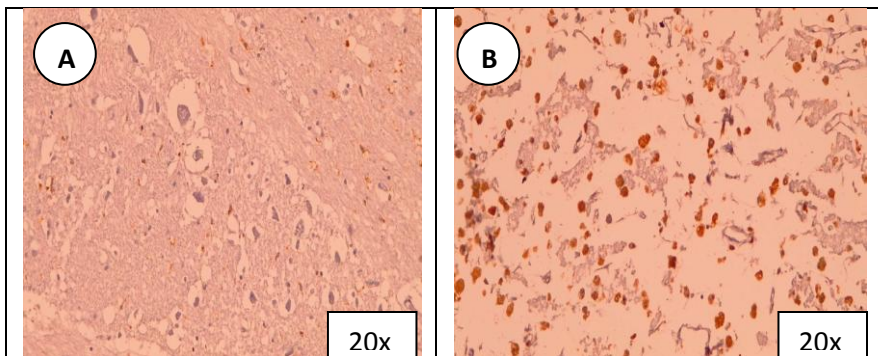


Fig.8.24. La 2 luni de supraviețuire posttraumatic: A(lezional-perilezional) celule macrofagice și microgliale activate CD68+ dispuse lezional și perilezional. La 4 luni de supraviețuire posttraumatic: B(lezional)multiple celule macrofagice activate CD68+încărcate cu hemosiderină la nivelul unor focare hemoragice vechi.

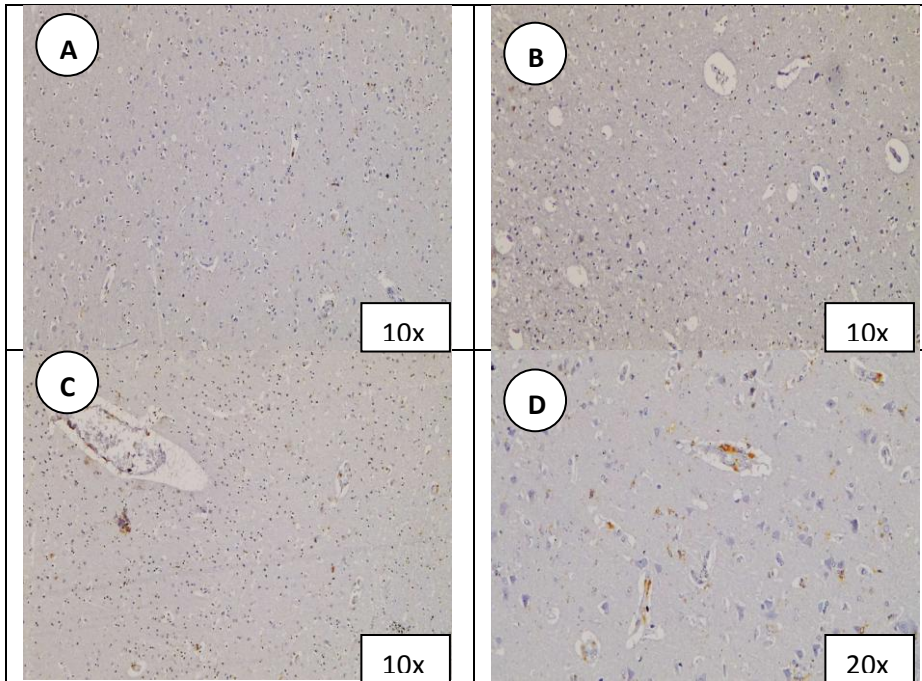
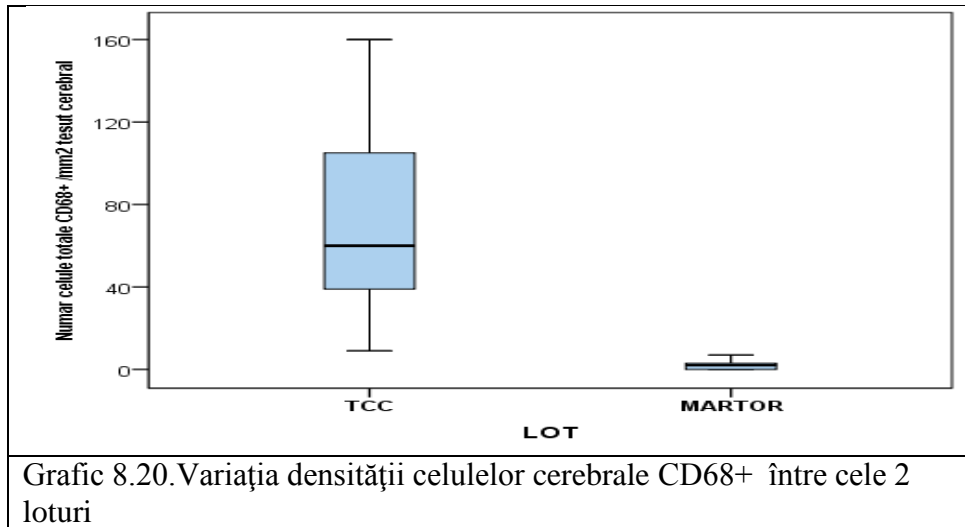
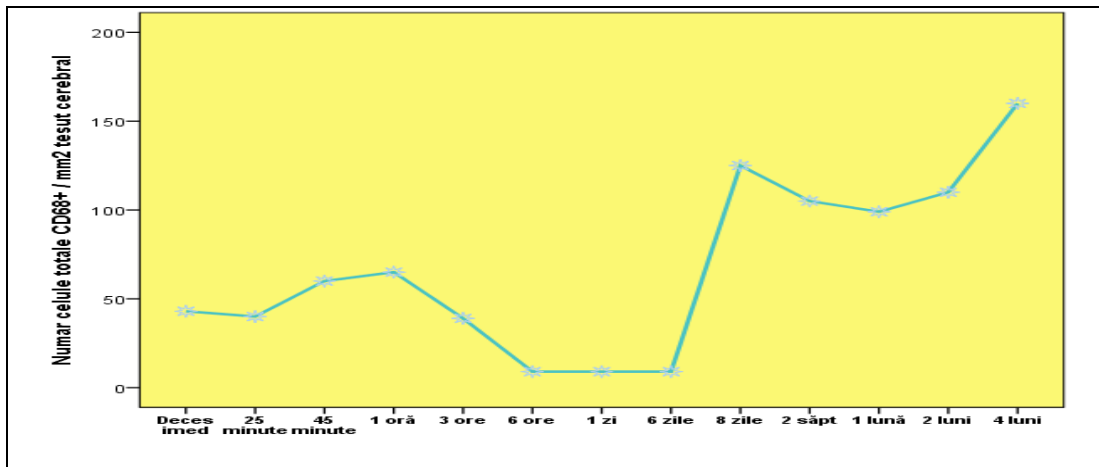


Fig.8.25. Analiza microscopică a cazurilor din lotul martor. Reacție negativă pentru CD68 în miocardofibroză(A) și strangulare(B). Rare celule macrofagice CD68+ în infarctul miocardic acut(C), rare celule macrofagice dispuse perivascular în șocul toxico-septic(D).

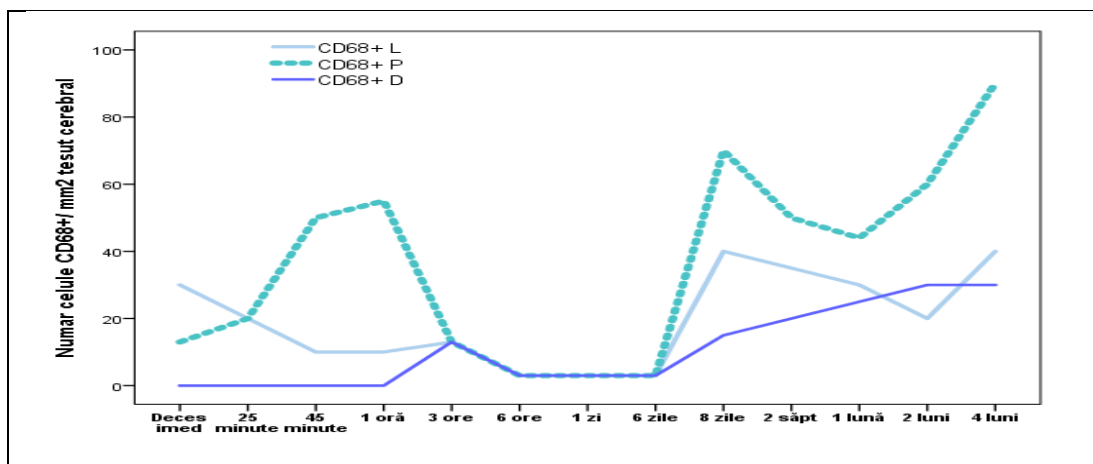
Analiza statistică a densității celulelor cerebrale CD68+ a arătat diferențe semnificative statistic ale densității celulare între cele 2 loturi analizate ($p < 0.05$). Densitatea cerebrală a celulelor CD68+ a fost mai ridicată atât ca amplitudine cât și ca tendință centrală în cazurile aparținând lotului de studiu, ce a inclus traumatismele cranio-cerebrale cu intervale variabile de supraviețuire față de cazurile din lotul martor, care nu au prezentat istoric de traumatisme cranio-cerebrale, având alte cauze de deces. (Grafic 8.20.)



De la decesul imediat posttraumatic și până la 4 luni de supraviețuire posttraumatic s-a observat o evoluție variabilă a densității cerebrale a celulelor cerebrale CD68+. Între 6 ore și 6 zile posttraumatic s-a evidențiat cea mai redusă densitate a celulelor CD68+. Cea mai ridicată densitate cerebrală a celulelor CD68+ a fost înregistrată la 4 luni de supraviețuire posttraumatism cranio-cerebral.(Grafic 8.21.)



Grafic 8.21. Variația densității celulelor cerebrale CD68+ în raport cu durata de supraviețuire posttraumatică întâlnită la cazurile de traumatisme cranio-cerebrale



Legendă: L=lezional;P=perilezional;D=la distanță față de leziune.

Grafic 8.22. Variația densității cerebrale a celulelor CD68+ lezionale,perilezionale și la distanță în raport cu durata de supraviețuire posttraumatică

Analiza densității celulelor cerebrale CD68+ în raport cu aria lezională arată că valorile maxime se înregistrează pentru celulele CD68+ perilezionale (medie de 36,46 celule/mm²tesut cerebral) urmate de celulele CD68+ lezionale (medie de 19,77 celule/mm²tesut cerebral) și cea mai scăzută valoare se înregistrează pentru celulele cerebrale CD68+ situate la distanță față de leziune (medie de 10,92 celule/mm²tesut cerebral).(Grafic 8.22.)

Analiza densității celulelor cerebrale CD68+ în raport cu aria lezională și perioada decesului posttraumatic arată că densitatea celulelor cerebrale CD68+ diferă semnificativ statistic în cazul celulelor CD68+ situate la distanță ($p=0.001$). Densitatea maximă a celulelor CD68+ indiferent de aria lezională/perilezională/la distanță se înregistrează în decesul cronic. Densitatea minimă a celulelor CD68+ de la nivel lezional și perilezional se observă în decesul acut, iar a celulelor CD68+ de la distanță în decesul supraacut.

Colorația IHC pentru evidențierea celulelor cerebrale CD163+

Analiza lotului de studiu cu traumatisme cranio-cerebrale având interval variabil de supraviețuire posttraumatic a relevat următoarele aspecte:

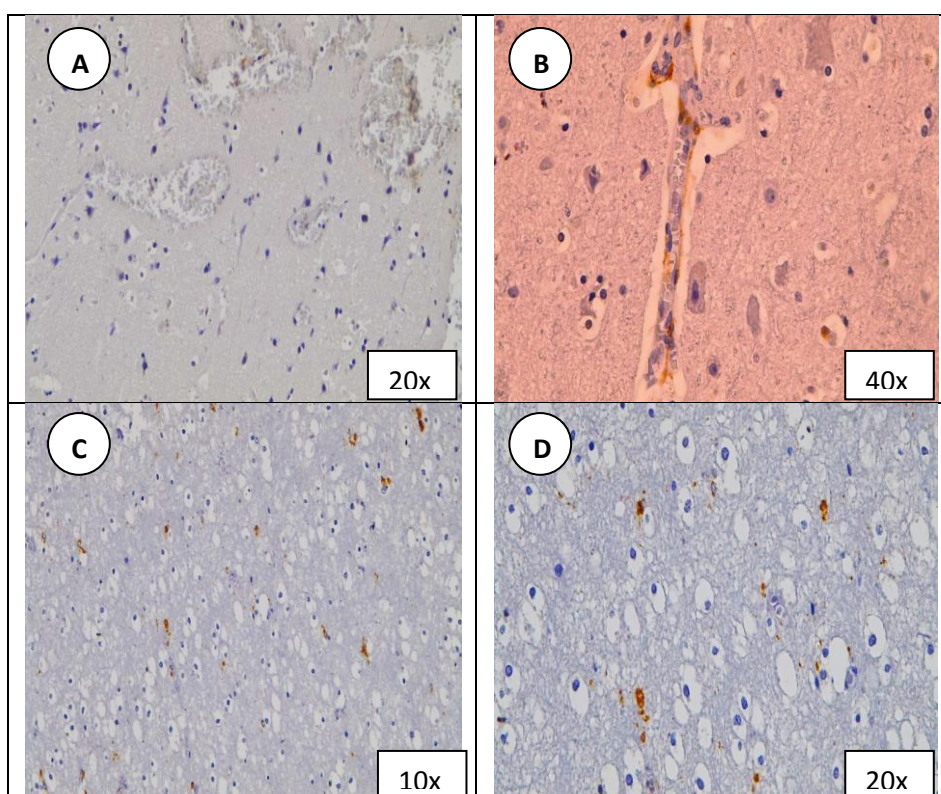


Fig.8.26. În decesul imediat posttraumatic: A (lezional-perilezional) a fost observată o reacție negativă imunohistochimică pentru CD163; În decesul la 25 de minute posttraumatic: B (perilezional) s-au observat rare celule macrofagice CD163+ dispuse mai ales perivascular; În decesul la 1 oră posttraumatic: C; D (perilezional) s-au remarcat rare celule macrofagice CD163+ distribuite difuz la nivel cerebral.

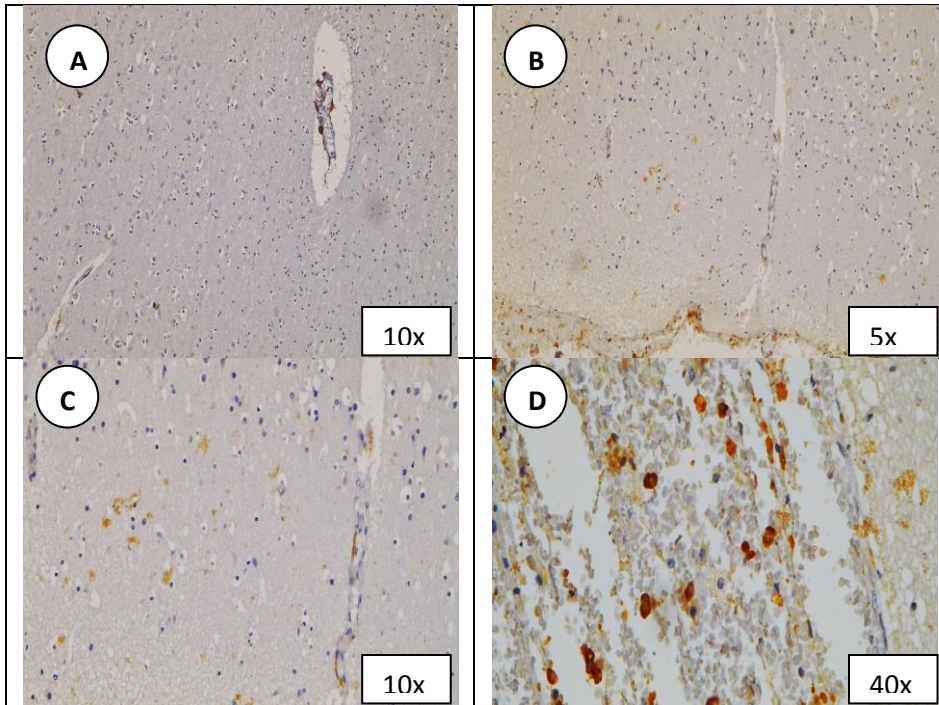
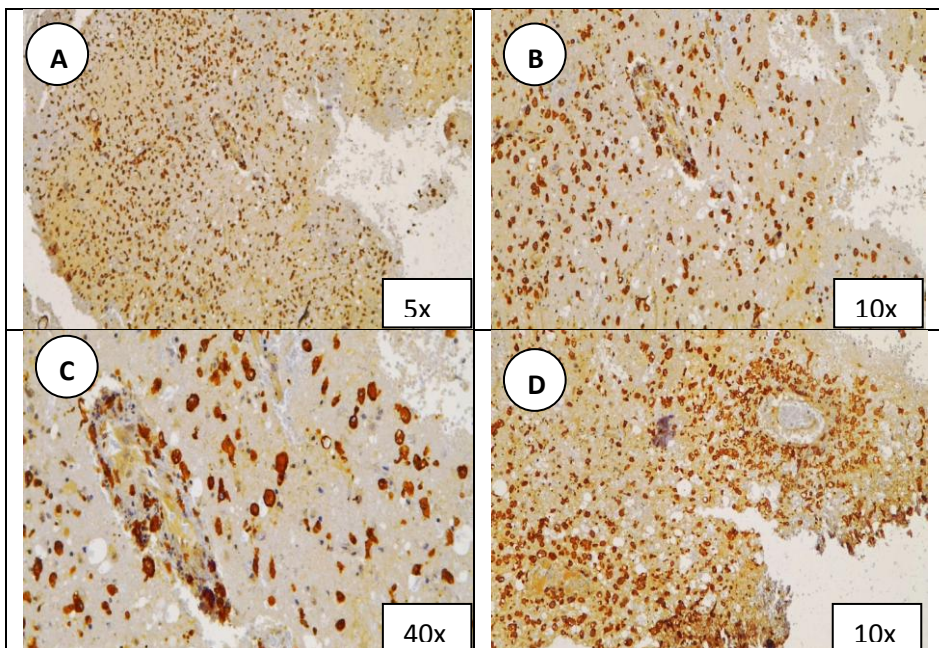


Fig.8.27. La 3 ore posttraumatic:A(perilezional) s-a remarcat un număr redus de celule macrofagice CD163+ distribuite difuz, predominant perivascular la nivel cerebral. La 6 ore posttraumatic la nivel perilezional și la distanță (B,C) se remarcă un număr ușor crescut de celule CD163+ cu morfologie macrofagică și microglială. La nivelul ariilor hemoragice lezionale cerebrale(D) se observă multiple celule macrofagice activate CD163+.



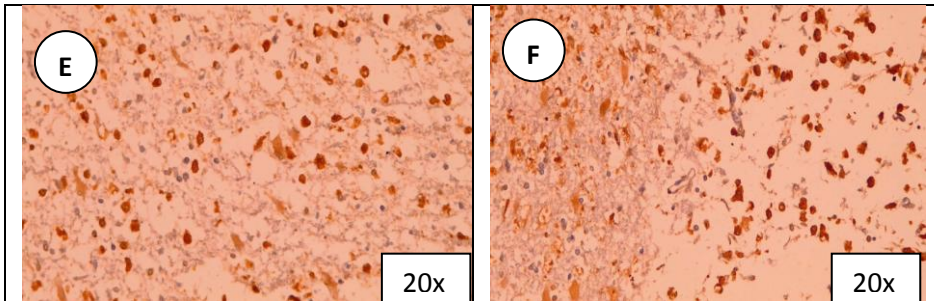


Fig.8.28. La 8 zile zile de supraviețuire posttraumatic: A,B(lezional-perilezional),C(perilezional) se observă un număr ridicat de celule CD163+ atât la nivel lezional,perilezional și la distanță. Cele mai multe celule CD163+ evidențiate lezional și perilezional au fost macrofage activate(B) fiind dispuse perivascular, intravascular și difuz la nivel cerebral(C). La 1 lună posttraumatic: D(lezional) se remarcă un număr ridicat de celule macrofagice activate CD163+ dispuse perivascular, în jurul vaselor cerebrale cu leziuni de necroză ischemică, intravascular și difuz la nivel cerebral. La 4 luni posttraumatic: E(perilezional), F(lezional-perilezional) se remarcă multiple celule macrofagice activate CD163+ dispuse perineuronal, lezional și perilezional.

Analiza microscopică imunohistochimică a țesutului cerebral recoltat de la cazurile aparținând lotului martor, care nu au prezentat traumatisme cranio-cerebrale, a arătat următoarele aspecte(Fig.8.29.):

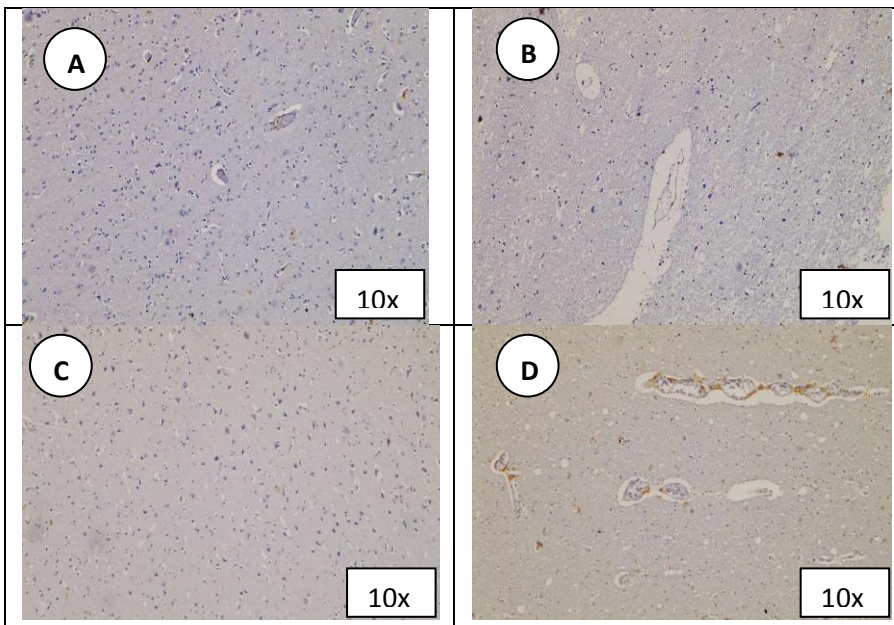
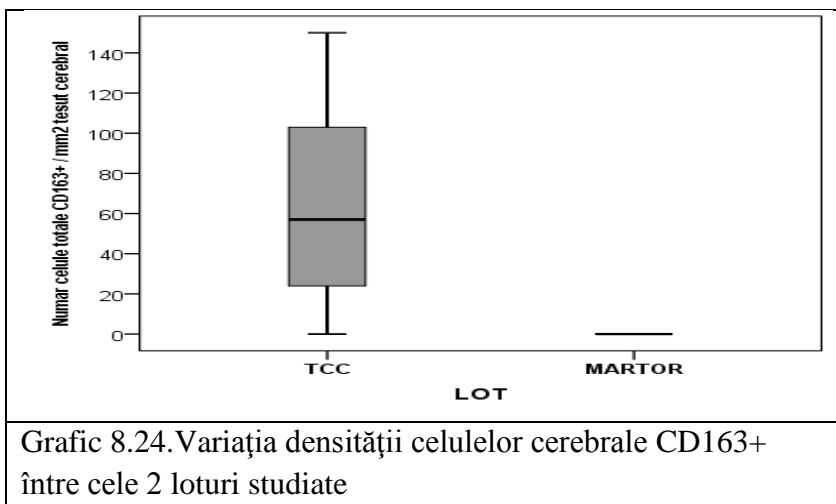
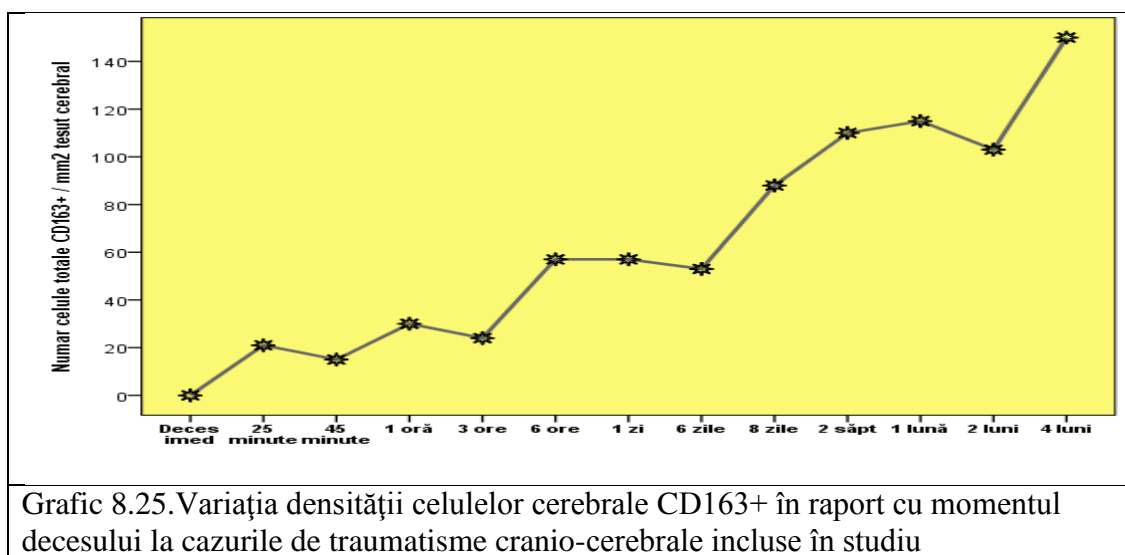


Fig.8.29. Analiza cazurilor de control: Reacție negativă imunohistochimică pentru CD163 în hipotermie(A),strangulare(B) și trombembolism pulmonar(C). Rare celule macrofagice CD163+ distribuite predominant perivascular în sepsis(D.)

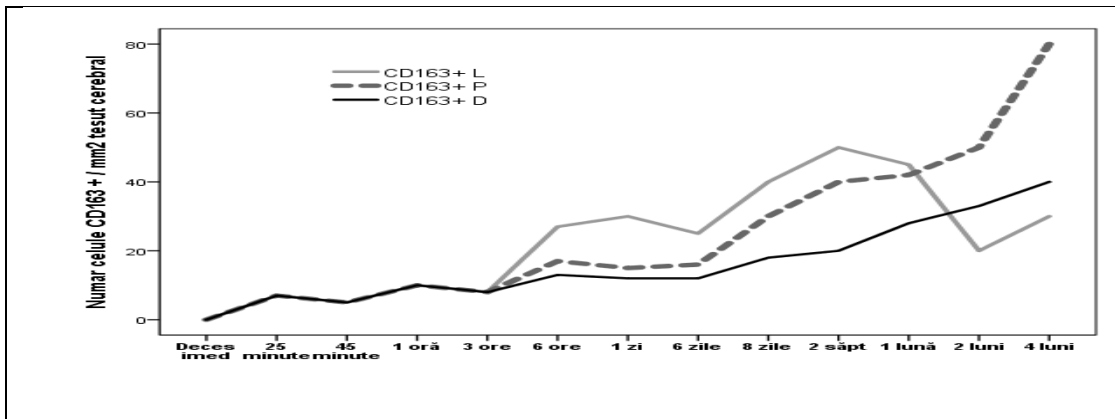
Analiza statistică a densității celulelor cerebrale CD163+ a arătat diferențe semnificative statistic ale densității celulare între cele 2 loturi analizate($p < 0.05$). Densitatea cerebrală a celulelor CD163+ a fost mai ridicată atât ca amplitudine cât și ca tendință centrală în cazurile aparținând lotului de studiu, ce a inclus traumatismele cranio-cerebrale cu intervale variabile de supraviețuire față de cazurile din lotul martor, care nu au prezentat istoric de traumatisme cranio-cerebrale, având alte cauze de deces.(Grafic 8.24.



În raport cu durata de supraviețuire posttraumatică, densitatea celulelor cerebrale CD163+ prezintă o tendință ascendentă de la decesul imediat posttraumatic și până la 4 luni de supraviețuire posttraumatic. (Grafic 8.25.)



La nivel global analiza cazurilor de traumatisme cranio-cerebrale în raport cu aria lezională cerebrală, nu a arătat variații semnificative statistice ($p > 0.05$) ale densității celulelor CD163+ între ariile lezionale, perilezionale și cele de la distanță. Valorile maxime au fost înregistrate de celulele CD163+ situate în ariile perilezionale și lezionale (perilezional: medie de 24,6 celule/mm² țesut cerebral; lezional: medie de 22,9 celule/mm² țesut cerebral) iar cele minime în aria situată la distanță față de leziune (medie de 15,8 celule/mm² țesut cerebral). (Grafic 8.26.)



Legendă: L=lezional;P=perilezional;D=la distanță față de leziune.

Grafic 8.26. Variația densității celulelor cerebrale CD163+ lezionale,perilezionale și la distanță în raport cu durata de supraviețuire posttraumatism cranio-cerebral

Analiza densității celulelor cerebrale CD163+ în raport cu aria lezională și perioada decesului posttraumatic arată că densitatea celulelor perilezionale CD163+ diferă semnificativ statistic în funcție de momentul decesului posttraumatic ($p=0.010$ lezional, $p=0.002$ perilezional, $p=0.001$ la distanță de leziune). În raport cu momentul decesului posttraumatic, doar în cazul decesului subacut, celulele CD163+ de la nivel lezional sunt semnificativ statistic ($p=0.0212$) mai numeroase față de cele situate la distanță de leziune. Densitatea maximă a celulelor CD163+ lezionale, perilezionale și la distanță se observă în perioada decesului cronic iar cea minimă în decesul supraacut.

Corelații între densitățile cerebrale ale celulelor CASPAZ3+, GFAP+,CD68+ și CD163+

Analiza de corelație între numărul celulelor cerebrale CASPAZ3+, GFAP+,CD68+ și CD163+ pentru cazurile lotului I -arată o relație directă, pozitivă intensă între numărul de celule cerebrale CD68+ și CD163+ ($r=0.745$; $p=0.003$) și o relație negativă, medie spre intensă între celulele cerebrale GFAP+ și CD163+ ($r=-0.623$; $p=0.023$).

Analiza de corelație între numărul celulelor cerebrale CASPAZ3+, GFAP+,CD68+ și CD163+ pentru cazurile lotului II -evidențiază o relație directă, pozitivă intensă între densitatea cerebrală a celulelor GFAP+ și CD163+ ($r=0.897$; $p=0.001$) precum și între densitatea cerebrală a celulelor GFAP+ și CD68+ ($r=0.689$; $p=0.040$). S-a remarcat totodată o relație pozitivă intensă între densitatea cerebrală a celulelor CD68+ și CD163+ ($r=0.768$; $p=0.016$).

Analiza de corelație între durata supraviețuirii posttraumatice și densitatea cerebrală a celulelor CASPAZ3+,GFAP+,CD68+ și CD163+ în funcție de aria lezională pentru cazurile lotului I -sugerează o legătură puternică între durata supraviețuirii posttraumatice (DS) și densitatea celulelor cerebrale CD163+ perilezionale ($r=0.92$, $p=0.00$), respectiv la distanță ($r=0.88$, $p=0.000$). S-a stabilit de asemenea o legătură moderată între numărul de celule CD163+ lezionale și durata supraviețuirii posttraumatice ($r=0.632$, $p=0.004$). S-au mai

observat legături intense între densitatea celulelor cerebrale GFAP+D ($r=0.86$, $p=0.000$) și a celulelor cerebrale CD68+D ($r=0.79$, $p=0.001$) cu durata supraviețuirii posttraumatice. S-a remarcat o legătură medie între densitatea cerebrală a celulelor CD68+P ($r=0.68$, $p=0.011$) și durata supraviețuirii posttraumatice.

Corelații între rezultatele examenului microscopic uzual și densitatea celulelor cerebrale CASPAZ3+,GFAP+,CD68+ și CD163+

Corelații între gradul edemului cerebral și numărul de celule cerebrale CASPAZ3+/GFAP+/CD68+ /CD163+ la cazurile lotului I -există o relație directă intensă între numărul celulelor cerebrale CASPAZ3+ și gradul edemului cerebral($r=0.739$; $p=0.006$). De asemenea s-a observat o legătură directă de intensitate medie între numărul celulelor cerebrale CD163+ și gradul edemului cerebral($r=0.761$; $p=0.04$).

Corelații între severitatea răspunsului inflamator cerebral și numărul de celule cerebrale CASPAZ3+/ GFAP+/CD68+ /CD163+ pentru cazurile lotului I -există legături directe intense între densitatea celulelor cerebrale CD163+ și severitatea răspunsului inflamator cerebral ($r=0.873$; $p=0.000$) precum și legături directe de intensitate medie între densitatea celulelor cerebrale CD68+ și severitatea răspunsului inflamator cerebral($r=0.609$; $p=0.027$).

Corelații între severitatea hemoragiei cerebrale și numărul de celule CASPAZ3+/GFAP+/CD68+ /CD163+ pentru cazurile lotului I -s-a evidențiat o legătură directă intensă între severitatea hemoragiei cerebrale și numărul de celule cerebrale CASPAZ3+ ($r=0.756$; $p=0.003$). De asemenea s-a observat o corelație strânsă între gradul de severitate al hemoragiei cerebrale și numărul de celule CD68+, corelație extreme de intensă la nivelul ariei lezionale($r=0.844$; $p=0.001$).

Corelații între severitatea leziunilor neuronale și numărul de celule CASPAZ3+/GFAP+/CD68+ /CD163+ pentru cazurile lotului I -există o legătură directă de intensitate moderată între densitatea cerebrală a celulelor CD163+ și gradul de severitate al leziunilor neuronale($r=0.576$; $p=0.039$).

Corelații între severitatea leziunilor gliale și numărul de celule CASPAZ3+/ GFAP+/CD68+ /CD163+ pentru cazurile lotului I -s-a remarcat o legătură directă de intensitate medie între densitatea cerebrală a celulelor CD163+ și gradul de severitate al leziunilor celulelor gliale($r=0.576$; $p=0.039$).

Concluzii și contribuții personale

Concluzii privind prima direcție de cercetare

1. Studiul retrospectiv al cazurilor de traumatisme cranio-cerebrale autopsiate în cadrul Institutului Național de Medicină Legală „Mina Minovici”, București între anii 2011 și 2012 a relevat o incidență de 30,43% a fracturilor craniene evidențiate necroptic ce nu au fost diagnosticate la examenul imagistic Computer Tomografic cranian.

2. Fracturile craniene nediate diagnosticate imagistic au fost localizate predominant la nivelul neurocraniului, în 77,14% din cazuri. Fracturile bolții craniene, au reprezentat 22,85% din totalul fracturilor nediate diagnosticate și au implicat frecvent regiunile parietală și frontală. Fracturile de calotă iradiate la baza craniului, au fost observate în 34,28% din cazurile de fracturi craniene nediate diagnosticate. Acestea au fost localizate mai ales în ariile parietală și temporală, cu iradiere preponderent în etajul mediu. Fracturile izolate de bază craniană au fost remarcate în 17,14% din totalul cazurilor de fracturi craniene nediate diagnosticate.

3. Majoritatea fracturilor craniene nediate diagnosticate imagistic au prezentat traiect liniar și nu s-a remarcat deplasarea fragmentelor osoase. Fracturile craniene cominutive, precum și cele liniare cu deplasare au fost frecvent diagnosticate corect prin examenul imagistic CT. Am observat că examenul CT cranian poate să ducă la o subdiagnosticare a fracturilor endobazei craniene din etajele anterior și mediu. Rezultatele acestui studiu arată acuratețea crescută a diagnosticului imagistic în regiunea occipitală și în etajul posterior al bazei craniului

Concluzii privind a doua direcție de cercetare

1. Analiza cazurilor medico-legale autopsiate în cadrul Serviciului Județean de Medicină Legală Teleorman între anii 2007-2016 a relevat o incidență a traumatismelor cranio-cerebrale de 8,52%. S-a observat o prevalență crescută a traumatismelor cranio-cerebrale la sexul masculin(76%) și la grupa de vârstă cuprinsă între 50-60 de ani(18%).

2. Din totalul deceselor datorate traumatismelor cranio-cerebrale, leziunile traumatice au fost localizate exclusiv la nivel cranio-cerebral în 56% din cazuri. Leziunile traumatice asociate au interesat cel mai frecvent regiunea toracică în 30% din cazuri, membrele inferioare în 19% din cazuri, membrele superioare în 13% din cazuri și regiunile vertebro-medulare în 8% din cazuri.

3. Fracturile craniene au fost observate la 83% din cazurile de traumatisme cranio-cerebrale analizate. Fracturile craniene de boltă iradiate la baza craniului au fost evidențiate în 65% din cazuri, fracturile localizate doar la nivelul calotei craniene au fost remarcate în 20% din cazurile studiate, în timp ce fracturile izolate de bază craniană au fost constatate doar la 15% din cazurile analizate.

4. Din totalul de 304 cazuri de traumatisme cranio-cerebrale incluse în studiu, în 31% din cazuri s-au constatat hemoragii lepto-meningeale, în 28% din cazuri hematoame cerebrale, în 26% din cazuri contuzii cerebrale și în 15% din cazuri dilacerări cerebrale. S-a constatat o incidență crescută a hematoamelor subdurale, care au fost depistate în 16% din cazuri.

Hematoamele extradurale au reprezentat 8% din cazuri, în timp ce hematoamele intraparenchimatoase au fost cel mai rar observate în 4% din cazuri.

Concluzii privind a treia direcție de cercetare

1. Studiul modificărilor apoptotice cerebrale cu ajutorul tehnicilor de imunohistochimie a arătat că pierderile de celule neuronale și gliale, produse în urma traumatismelor craniocerebrale, nu sunt doar rezultatul fenomenelor necrotice și inflamatorii cerebrale. Caspaza 3, considerată un mediator central al proceselor apoptotice a fost evidențiată la nivelul celulelor neuronale și gliale cerebrale, având o expresie calitativă și cantitativă diferită în funcție de aria lezională și perioada de supraviețuire posttraumatică.

Cel mai ridicat număr de celule CASPAZ3+ l-am observat în perioada decesului subacut(1-14 zile) iar cel mai scăzut număr de celule CASPAZ3+ l-am remarcat în perioada supracută a decesului(<1 oră). În perioada decesului supraacut și acut posttraumatic(1oră-1 zi) cele mai multe celule CASPAZ3+ au fost evidențiate la nivel perilezional în timp ce în perioadele subacute și cronice ale decesului posttraumatic am descoperit o densitate ridicată a celulelor CASPAZ3+ mai ales la nivel lezional.

În perioada timpurie, respectiv în primele 2 săptămâni posttraumatism craniocerebral, expresia caspazei 3 poate fi folosită pentru estimarea momentului traumatic și în funcție de nivelul de exprimare se pot face chiar precizări despre locul impactului.

2. Studiul proceselor de astrocitoză reactivă întâlnite la cazurile de traumatisme craniocerebrale, evidențiate cu ajutorul colorației imunohistochimice cerebrale GFAP, a identificat un spectru larg de transformări ale celulelor astrocitare în funcție de intervalul posttraumatic. Cea mai ridicată densitate cerebrală a astrocitelor reactive GFAP+ a fost observată în cazul perioadei acute de deces(1-24 ore) iar cea mai scăzută în perioada cronică(>2 săptămâni). În perioadele de deces supraacut, acut și subacut posttraumatic cele mai multe astrocite reactive GFAP+ evidențiate au fost localizate la nivel perilezional.

Apariția graduală și diferențiată a astrocitelor reactive în funcție de intervalul posttraumatic cerebral cu distribuție specifică lezional, perilezional și la distanță arată că studiul astrocitozei reactive poate constitui un index obiectiv în evaluarea intervalului posttraumatic.

3. Analiza imunohistochimică a macrofagelor și celulelor microgliale activate CD68+ și CD163+ a relevat un răspuns inflamator cerebral posttraumatic puternic și persistent, densități crescute ale ambelor tipuri de celule fiind observate chiar și după 2 săptămâni de supraviețuire posttraumatism craniocerebral. Densitățile maxime ale celulelor CD68+ și CD163+ le-am observat în decesul cronic. Densitatea minimă a celulelor CD68+ a fost remarcată în decesul acut iar densitatea minimă a celulelor CD163+ în cazul decesului supraacut. Cele mai multe celule CD68+ și CD163+ s-au observat la nivel perilezional.

Reacția macrofagelor și celulelor microgliale CD68+ a fost rapidă, aceste celule apărând precoce posttraumatic, cu densitate diferită la nivel lezional, perilezional și la distanță încă din perioada supracută de deces. Densitatea celulelor cerebrale CD68+ mai ales de la nivel lezional s-a corelat cu extinderea leziunilor hemoragice cerebrale și mai slab cu intervalul

posttraumatic. Răspunsul celulelor macrofagice și microgliale CD163+ a fost mai lent, fără specificitate în funcție de aria lezională în perioada supraacută a decesului, dar persistent corelându-se mai bine cu durata supraviețuirii posttraumatice. Aceste descoperiri arată un posibil rol protector al fenotipului macrofagic și microglial CD163+, celulele CD163+ au fost absente sau au prezentat o densitate scăzută în perioada timpurie posttraumatică, expresia acestora fiind semnificativ mai ridicată în perioada târzie posttraumatică.

Este evident că macrofagele și celulele microgliale activate pot exercita atât acțiune protectoare cât și distructivă asupra parenchimului cerebral conturând un răspuns inflamator plurivalent în care celulele macrofagice și microgliale își modifică fenotipul și funcția în funcție de momentul evolutiv posttraumatic.

4. Analiza cazurilor de traumatisme cranio-cerebrale cu interval variabil de supraviețuire a evidențiat o relație directă între densitățile celulelor cerebrale CD68+ și CD163+, remarcându-se de asemenea o densitate crescută a celulelor GFAP+ la cazurile cu densitate cerebrală scăzută a celulelor CD163+. La nivelul ariei lezionale creșterea expresiei cerebrale a celulelor CASPAZ3+ a fost însoțită de o densitate ridicată a celulelor CD68+. Cazurile la care s-a constatat o densitate ridicată a celulelor GFAP+ la nivel lezional și perilezional au prezentat o densitate scăzută a celulelor CD68+ la nivel lezional. Celulele CD68+ și CD163+ situate perilezional, celulele CD163+ lezionale precum și celulele GFAP+, CD68+, CD163+ situate la distanță au prezentat o densitate cu atât mai ridicată cu cât durata supraviețuirii posttraumatice a fost mai lungă.

Analiza comparativă a apoptozei cerebrale, astrocitozei reactive și a reacției inflamatorii cerebrale cu ajutorul markerilor imunohistochemici specifici poate aduce informații importante privind diagnosticul, prognosticul și elucidarea momentului traumatic în traumatologia cranio-cerebrală.

Contribuții personale

1. Studiul imunohistochimic al expresiei cerebrale a celulelor CASPAZ3+, GFAP+, CD68+ și CD163+ în cadrul traumatismelor cranio-cerebrale cu interval variabil de supraviețuire aduce elemente de noutate în investigația medico-legală a traumatismelor cranio-cerebrale realizând o analiză complexă a modificărilor tisulare cerebrale posttraumatice, prin investigarea reacției inflamatorii cerebrale, proceselor apoptotice și evidențierea proceselor de astrocitoză reactivă cerebrală. Studiile efectuate până în prezent au investigat aceste procese în mod diferențial, în marea majoritate a cazurilor pe animale de laborator la care s-a realizat inducerea experimentală a leziunilor traumatice cranio-cerebrale și care au fost ulterior sacrificate în diverse momente posttraumatic, iar evaluarea imunohistochimică a diferitelor tipuri de celule a fost realizată predominant la nivelul unei zone cerebrale: lezional sau perilezional. O contribuție semnificativă personală a fost analiza cazurilor de traumatisme cranio-cerebrale datorate diverselor circumstanțe de producere ale leziunilor, cu variații privind intensitatea forței mecanice aplicate și a modalității de producere a leziunilor.

Ca și particularitate importantă a studiului imunohistochimic efectuat este și intervalul lung posttraumatic analizat, de la decesul imediat și până la 4 luni posttraumatic.

2. Rezultatele studiului experimental imunohistochimic cerebral prezintă aplicabilitate în practică medico-legală. Deși costurile investigațiilor imunohistochimice cerebrale sunt ridicate, totuși aceste investigații ar putea fi aplicate anumitor cazuri de traumatisme cranio-cerebrale în care examenul microscopic obișnuit nu aduce informații semnificative privind vechimea leziunilor cerebrale, iar datele de anchetă sunt neconcludente în privința stabilirii momentului de producere al TCC.

3. Descoperirea unor noi criterii microscopice de stabilire a momentului traumatic pot crește acuratețea expertizei medico-legale, punând la dispoziția justiției probe științifice obiective, extrem de valoroase, cu utilitate în soluționarea diferitelor cauze penale și civile. Elucidarea momentului de producere al leziunilor traumatice stă la baza constituirii unei legături de cauzalitate între cauza/tipul decesului și etiologia traumatică, putând ajuta chiar în anumite cazuri la identificarea circumstanțială a agresorului. În încadrarea și calificarea faptelor cu caracter penal dar și în stabilirea gravității pedepsei legătura de cauzalitate medico-legală deține o importanță capitală prin analiza participării cauzelor, condițiilor și circumstanțelor în realizarea efectelor posttraumatice.

Posibile direcții de continuare a cercetării doctorale

1. Investigațiile descrise au generat rezultate interesante ce pot constitui punctul de plecare al unor studii complementare privind:

a. aprofundarea proceselor apoptotice cerebrale survenite posttraumatic și efectuarea unor studii comparative ale expresiei cerebrale a caspazei 3 în cadrul leziunilor cerebrale produse antemortem și postmortem stabilind utilitatea acestui marker în determinarea caracteristicilor vitale ale leziunilor traumatice cerebrale.

b. realizarea unor studii coroborate clinice și necroptice care să analizeze valorile sanguine ale GFAP, decelate în diverse perioade de supraviețuire posttraumatism cranio-cerebral deschizând astfel perspective promițătoare în diagnosticul de laborator clinic și medico-legal al traumatismelor cranio-cerebrale precum și determinând astfel utilitatea acestui marker în stabilirea momentului traumatic.

c. realizarea unor studii experimentale privind expresia receptorului CD163 și posibilul său rol protector în evoluția leziunilor cerebrale.

2. Datele experimentale obținute pot deschide noi direcții diagnostice medico-legale și clinice în evaluarea leziunilor traumatice cranio-cerebrale. Rezultatele obținute pot constitui de asemenea punctul de plecare al unor studii experimentale privind posibilul rol terapeutic al serurilor inhibitorii ale caspazei 3 și proteinei gliale fibrilare acide (GFAP) în evoluția clinică a leziunilor cerebrale produse ca urmare a traumatismelor cranio-cerebrale și posibil chiar și în bolile cerebro-vasculare. De asemenea studiul potențialului rol benefic al receptorului CD163 poate ajuta la dezvoltarea unor terapii moleculare, cu rol în îmbunătățirea prognosticului leziunilor cerebrale.

Bibliografie selectivă

1. Beliș V, Naneș C. Traumatologia mecanică în practica medico-legală și judiciară, Ed. Academiei, București, 1985.
2. Beliș V. Medicina legală în practica judiciară. Ed. Orizonturi Lider, București, 2002.
3. Beliș V. Tratat de medicină legală. vol. I, Ed. Medicală, București, 1995.
4. Ziebell JM, Morganti-Kossmann MC. Involvement of pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines in the pathophysiology of traumatic brain injury. *Neurotherapeutics*. 2010;7:22–30.
5. Manson J, Thiernemann C, Brohi K. Trauma alarmins as activators of damage-induced inflammation. *Br J Surg*. 2012;99 Suppl 1:12–20.
6. Buchanan MM, Hutchinson M, Watkins LR, Yin H. Toll-like receptor 4 in CNS pathologies. *J Neurochem*. 2010;114:13–27.
7. Farina C, Aloisi F, Meinl E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol*. 2007;28:138–145.
8. Nagyoszi P, Wilhelm I, Farkas AE, Fazakas C, Dung NT, Hasko J, Krizbai IA. Expression and regulation of toll-like receptors in cerebral endothelial cells. *Neurochem Int*. 2010;57:556–64.
9. Woodcock T, Morganti-Kossmann MC. The role of markers of inflammation in traumatic brain injury. *Front Neurol*. 2013;4:18.
10. Corps KN, Roth TL, McGavern DB. Inflammation and neuroprotection in traumatic brain injury. *JAMA Neurol*. 2015;72:355–362.
11. Bergold PJ. Treatment of traumatic brain injury with anti-inflammatory drugs. *Exp Neurol*. 2016;275(Pt 3):367–380.
12. Hellewell S, Semple BD, Morganti-Kossmann MC. Therapies negating neuroinflammation after brain trauma. *Brain Res*. 2016;1640:36–56.
13. Cardona AE, Gonzalez PA, Teale JM. CC chemokines mediate leukocyte trafficking into the central nervous system during murine neurocysticercosis: role of gamma delta T cells in amplification of the host immune response. *Infect Immun*. 2003;71:2634–2642.
14. Wilson EH, Weninger W, Hunter CA. Trafficking of immune cells in the central nervous system. *J Clin Invest*. 2010;120:1368–1379.
15. Clark RS, Schiding JK, Kaczorowski SL, Marion DW, Kochanek PM. Neutrophil accumulation after traumatic brain injury in rats: comparison of weight drop and controlled cortical impact models. *Journal of neurotrauma*. 1994;11:499–506.
16. Rhodes J. Peripheral immune cells in the pathology of traumatic brain injury? *Curr Opin Crit Care*. 2011;17:122–130.
17. Al Nimer F, Lindblom R, Strom M, Guerreiro-Cacais AO, Parsa R, Aeinband S, Mathiesen T, Lidman O, Piehl F. Strain influences on inflammatory pathway activation, cell infiltration and complement cascade after traumatic brain injury in the rat. *Brain Behav Immun*. 2013;27:109–2.

18. Russo MV, McGavern DB. Inflammatory neuroprotection following traumatic brain injury. *Science*. 2016;353:783–785.
19. Beliş V. Contribuții la studiul reacțiilor vitale. IMF Iași, 1967.
20. Kumar A, Loane DJ. Neuroinflammation after traumatic brain injury: opportunities for therapeutic intervention. *Brain Behav Immun*. 2012;26:1191–1201.
21. Kigerl KA, Gensel JC, Ankeny DP, Alexander JK, Donnelly DJ, Popovich PG. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J Neurosci*. 2009;29:13435-13444.
22. Kristiansen M, Graversen JH., Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, Moestrup SK. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 2001;409: 198-201
23. Schaer CA, Vallelian F, Imhof A, Schoedon G, Schaer DJ. CD163-expressing monocytes constitute an endotoxinsensitive Hb clearance compartment within the vascular system. *J. Leukoc. Biol* 2007;82:106-110.
24. Schaer DJ, Schaer CA, Buehler PW, Boykins RA, Schoedon G, Alayash AI, Schaffner A. CD163 is the macrophage scavenger receptor for native and chemically modified hemoglobins in the absence of haptoglobin. *Blood* 2006;107:373-380.
25. Philippidis P, Mason JC, Evans BJ, Nadra I, Taylor KM., Haskard DO, Landis RC Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery. *Circ. Res*. 2004;94:119-126.
26. Abraham NG, Drummond G. CD163-Mediated hemoglobin heme uptake activates macrophage HO-1, providing an antiinflammatory function. *Circ. Res*. 2006;99:911-914.
27. Dressler J, Hanisch U, Kuhlisch E, Geiger KD. Neuronal and glial apoptosis in human traumatic brain injury. *International Journal of Legal Medicine* 2007;121(5):365-375.
28. Curcă GC. Membrana celulară o poartă în fața mecanismelor morții. Ed. General Partner, București, 1999.
29. Yakovlev AG, Faden AI. Caspase-dependent apoptotic pathways in CNS injury. *Molecular Neurobiology* 2001;24(1-3):131-144.
30. Becker, E. B. & Bonni, A. Cell cycle regulation of neuronal apoptosis in development and disease. *Progress in Neurobiology*; 2004;72:1-25.
31. Nicholson DW, Thornberry NA. Apoptosis. Life and death decisions. *Science* 2003; 299: 214–215.
32. Creagh EM, Martin SJ. Caspases: cellular demolition experts. *Biochem Soc Trans* 2001; 29: 696–702.
33. Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 1997; 91:443–446.
34. Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 2004; 305: 626–629.
35. Curcă GC. Apoptoza o problemă...de viață și de moarte. *Revista de Medicină Legală* 1994;2(4):396-402.

36. Beliș V, Curcă GC. Moartea programată o realitate doar la nivel celular? *Medicina Modernă* 1995;II(12):661-664.
37. Degterev A, Yuan J. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 378–390.
38. Curcă GC. Apoptoza-fascinării factori letali. *Revista de Medicină Legală* 1994;2(3):289-291.
39. Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, and Earnshaw WC. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature*. 1994;371, 346– 347.
40. LaPlaca MC , Raghupathi R, Verma A, Pieper AA, Saatman KE, Snyder SH, and McIntosh TK. Temporal patterns of poly(ADP-ribose) polymerase activation in the cortex following experimental brain injury in the rat. *J. Neurochem*. 1999;73:205–213.
41. Rink A, Fung KM, Trojanowski JQ, Lee VMY, Neugebauer E, McIntosh TK. Evidence of apoptotic cell death after experimental traumatic brain injury in the rat. *Am. J. Pathol*. 1995;147, 1575–1583.
42. Conti AC, Raghupathi R, Trojanowski JQ, McIntosh TK. Experimental brain injury induces regionally distinct apoptosis during the acute and delayed post-traumatic period. *J. Neurosci*. 1998; 18, 5663–5672.
43. Yakovlev AG, Knoblach SM, Fan L, Fox GB, Goodnight R, Faden AI. Activation of CPP32-like caspases contributes to neuronal apoptosis and neurological dysfunction after traumatic brain injury. *J. Neurosci*. 1997;17, 7415–7424.
44. Goncalves CA, Leite MC, Nardin P. Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clin Biochem* 2008;41:755–763.
45. Herrmann JE, Imura T, Song B, Qi J, Ao Y, Nguyen TK, Korsak RA, Takeda K, Akira S, Sofroniew MV. STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury. *J Neurosci* 2008;28:7231–7243.
46. Pekny M, Leveen P, Pekna M, Eliasson C, Berthold CH, Westermarck B, Betsholtz C. Mice lacking glial fibrillary acidic protein display astrocytes devoid of intermediate filaments but develop and reproduce normally. *EMBO J* 1995;14:1590–1598.
47. Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 2009;32:638–647.
48. Lefrançois T, Fages C, Peschanski M, Tardy M. Neurite outgrowth associated with astroglial phenotypic changes induced by antisense glial fibrillary acidic protein (GFAP) mRNA in injured neuronastrocyte cocultures. *Journal of Neuroscience*, 1997;17: 4121-4128.
49. **Duncea RM**, Calotă RG, Moldovan CA, Beliș V. A Retrospective Forensic Study in Head Trauma Patients with Undiagnosed Skull Fractures at Computerised Tomography (CT) Scans. *Modern Medicine*, Celsius Publishing House 2017; 24(1):26-33.
50. **Duncea-Borca RM**, Beliș V, Costescu M, Calotă RG, Kutasi R, Moldovan CA. The Role Of Reactive Astrocytose In The Chronological Evolution Of Traumatic Brain Injury. *Journal Of Mind and Medical Sciences* 2018;5(1):109-116.

LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE

Criteriile minimale (2 articole BDI) ale cercetării științifice de pe parcursul studiului doctoral au fost atinse prin publicarea *in extenso* a următoarelor materiale științifice:

Reviste ISI indexate în Web of Science Core Collection (Thompson ISI):

► **Duncea RM**, Apostol I, Calotă RG, Beliș V. *Forensic and Clinical Diagnosis in „Shaken Baby Syndrome”, between Child Abuse and Iatrogenic Abuse*. Journal of Mind and Medical Sciences. 2017;4(1):13-18. <http://scholar.valpo.edu/jmms/vol4/iss1/4/>. DOI: 10.22543 / 7674.41.P1318. ISSN: 2392-7674.

► **Duncea-Borca RM**, Beliș V, Costescu M, Calotă RG, Kutasi R, Moldovan CA. *The Role Of Reactive Astrocytose In The Chronological Evolution Of Traumatic Brain Injury*. Journal of Mind and Medical Sciences. 2018;5(1):109-116. <https://scholar.valpo.edu/jmms/vol5/iss1/17/>. DOI: 10.22543/7674.51.P109116. ISSN: 2392-7674.

Reviste cu indexare BDI:

► **Duncea RM**, Calotă RG, Moldovan CA, Beliș V. *A Retrospective Forensic Study in Head Trauma Patients with Undiagnosed Skull Fractures at Computerised Tomography (CT) Scans*. Modern Medicine, Celsius Publishing House, 2017, Vol 24, No. 1, 26-33. <http://www.medicinamoderna.ro/article.php?story=20170324100740420>, ISSN: 2360-2473 ISSN-L: 1223-0472.

Proiecte de cercetare științifică:

Obținerea prin concurs a unei burse doctorale în cadrul proiectului “**CERO – Profil de carieră: Cercetător roman**” Cod Contract :**POSDRU/159/1.5/S/135760** . Programul s-a desfășurat în cadrul UMF „Carol Davila”, București în perioada 13.08.2014-07.10.2015.

Publicări de materiale științifice sub formă de rezumat, după comunicarea lor în cadrul unor congrese sau conferințe naționale:

► Stan C, **Duncea RM**, Decu G, Stan Carmen. *Aspecte Particulare ale Traumatismelor Otice și Rino-sinusale în Investigarea Medico-Legală a Traumatismelor Cranio-Faciale*. Al XV-lea Congres National de Medicină Legală cu Participare Internațională, Sovata, 28-30 Mai 2015,72-73.

► **Duncea RM**, Roșu M. *Expertiza Antropologică Într-un Caz de Crimă cu Identificarea Mecanismului și a Agentului Traumatic*. Congresul National de Medicină Legală, Sibiu, 16-19 Mai 2013,61-62.

► **Duncea RM**, Roșu M. *Traumatism Cranian Antemortem sau Modificare Tafonomică datorată Acțiunii Animalelor?* Congresul National de Medicină Legală, Sibiu, 16-19 Mai 2013,65-66.

