

*Katedra i Zakład Medycyny Sądowej
Akademii Medycznej w Gdańsku*



*ul. Dębowa 23,
80-204 Gdańsk
tel: +48-58 349 12 50
fax: +48-58 341 04 85
e-mail: kizms@amg.gda.pl
www.kizms.amg.gda.pl*

Dorota Pieśniak

***Ocena przydatności
badania histopatologicznego krwiałków podtwardówkowych
do ustalenia czasu ich powstania
w praktyce sądowo-lekarskiej***

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej AMG

Kierownik Katedry i Zakładu:
Dr hab. med. Zbigniew Jankowski

Rozprawa doktorska
Promotor: Dr hab. med. Zbigniew Jankowski

Gdańsk 2008

Składam serdeczne podziękowania

Panu dr. hab. med. Zbigniewowi Jankowskiemu

za nieocenioną pomoc i rady, życzliwość i cierpliwość,

a Koleżankom i Kolegom z Zakładu Medycyny Sądowej AMG

dziękuję za okazaną pomoc i wsparcie.

SPIS TREŚCI

I. Wstęp	5
I.1. Definicja i rodzaje krwiaków podtwardówkowych	5
I.2. Lokalizacja krwiaków podtwardówkowych	5
I.3. Zarys epidemiologii krwiaków podtwardówkowych	6
I.4. Budowa opony twardej i pajęczej, z uwzględnieniem ultrastruktury	8
I.4.1. Anatomia opony twardej	8
I.4.2. Budowa histologiczna i ultrastruktura opony twardej i pajęczej	9
I.4.3. Kontrowersyjna przestrzeń podtwardówkowa	12
I.4.4. Naczynia opony twardej mózgu a krwiaki wewnątrzczaszkowe	14
I.4.4.1. Tętnice oponowe	14
I.4.4.2. Zatoki żyłne opony twardej	14
I.4.4.3. Żyły mostowe	14
I.5. Mechanizm powstawania krwiaka podtwardówkowego	15
I.5.1. Inne źródła krwiaków podtwardówkowych	16
I.6. Organizacja krwiaka podtwardówkowego	17
I.7. Krwiaki podtwardówkowe jako problem opiniodawczy w orzecznictwie sądowo-lekarskim	17
II. Cel i założenia pracy	21
III. Materiał	23
IV. Metody	27
IV.1. Procedura histopatologiczna	27
IV.2. Procedura immunohistochemiczna dotycząca przeciwciał CD68 i CD34	27
V. Wyniki i omówienie	29
V.1. Zmiany w skrzepie krwi, tworzącym krwiak podtwardówkowy, w wewnętrznej części opony twardej i w torebce krwiaka podtwardówkowego a czas przeżycia po urazie głowy	29
V.1.1. Erytrocyty i leukocyty-neutrofile	29
V.1.2. Makrofagi	38
V.1.3. Angiogeneza	46
VI. Dyskusja	52
VII. Wnioski	63

Spis treści

VIII. Streszczenie (Abstract).....	65
IX. Piśmiennictwo.....	69
X. Aneks	73

I. WSTĘP

I.1. Definicja i rodzaje krwiaków podtwardówkowych

Krwiak podtwardówkowy (łac. haematoma subdurale; ang. subdural hematoma – SDH) to krwiak wewnątrzczaszkowy, w którym krew gromadzi się między wewnętrzną powierzchnią opony twardej, a zewnętrzną powierzchnią opony pajęczej. W czasie sekcji zwłok lub w wykonanych za życia badaniach obrazowych (TK i MRI) krwiak zajmuje przestrzeń anatomiczną, zawartą między tymi oponami. (3, 6, 10, 11, 18, 22, 29, 38, 46, 48) Według części badaczy jest to przestrzeń patologiczna, która ma być jedynie potencjalną przestrzenią, nie istniejąca w warunkach fizjologicznych. Do takiego wniosku doprowadziły ich przede wszystkim wyniki badań eksperymentalnych na zwierzętach, co zostanie omówione w dalszej części pracy. (6, 10, 11, 38)

W klinice stosowany jest odnoszący się do osób żywych podział krwiaków podtwardówkowych na ostre, podostre i przewlekłe. Na podstawie obserwacji klinicznych przyjęto, że w krwaku ostrym objawy kliniczne występują w czasie do trzech dni od urazu głowy, podostrym w okresie trzech dni do trzech tygodni, a w przewlekłym powyżej trzech tygodni. (3, 5, 19, 29, 33)

Ze względu na przyczynę wyróżniamy krwiaki podtwardówkowe urazowe, będące następstwem doznanego urazu głowy oraz nieurazowe. (2)

I.2. Lokalizacja krwiaków podtwardówkowych

Ostry krwiak podtwardówkowy zazwyczaj zlokalizowany jest na powierzchni wypukłej półkul mózgu w okolicy czołowo-ciemieniowej, ciemieniowej lub ciemieniowo-skroniowej, rzadziej na podstawie mózgu w dole środkowym. Najczęściej krwiak podtwardówkowy powstaje między półkulami mózgu, w tylnym dole czaszki lub obustronnie na wypukłościach półkul mózgu. Sporadycznie krwiak umiejscawia się wokół namiotu mózdzku lub pod mózdzkiem. Obustronne krwiaki podtwardówkowe są najczęściej spotykane u noworodków. Typowym miejscem powstania krwiaka przewlekłego jest przestrzeń nad jedną z półkul mózgu, zwłaszcza okolica czołowo-skroniowa i ciemieniowa, przy czym w 15-20% przypadków przewlekłe krwiaki podtwardówkowe występują obustronnie. (9, 15, 19, 23, 30, 32)

I.3. Zarys epidemiologii krwiaków podtwardówkowych

W piśmiennictwie mało jest publikacji dotyczących epidemiologii krwiaków podtwardówkowych w ostatnim okresie.

Krwiaki podtwardówkowe stwierdzono u 46% spośród 700 chorych leczonych z powodu ciężkich urazów czaszki i mózgu w wybranych instytutach neurologicznych w Szkocji, Holandii i USA odpowiednio w latach 1968, 1972 i 1974. (18)

W grupie 3367 chorych, tj. wszystkich chorych hospitalizowanych i leczonych w Katedrze i Klinice Chirurgii Urazowej AMG z powodu urazu czaszkowo-mózgowego w latach 1981-84; 1989-92 oraz 1997-2000 krwiaki podtwardówkowe stwierdzono u 204 (6,06% pacjentów), w tym u 194 (5,76% chorych) rozpoznano ostry krwiak podtwardówkowy. (17)

Krwiakom podtwardówkowym, zwłaszcza ostrym, często towarzyszy uszkodzenie mózgu, którego następstwa są odpowiedzialne za częstsze wystąpienie powikłań i wyższą śmiertelność. Dlatego też przypadki krwiaków podostrych i przewlekłych rokują pomyślniej. Analiza kliniczna dokumentacji Katedry i Kliniki Chirurgii Urazowej AMG wykazała, że w latach 1989-1992 śmiertelność wśród chorych z ostrym krwiakiem podtwardówkowym wynosiła 73,44%, natomiast w okresie 1997-2000 istotnie mniej – 42,65% przypadków. W grupie chorych z podostrym i przewlekłym krwiakiem podtwardówkowym śmiertelność była znacznie niższa i wynosiła 23,33% przypadków takich chorych. (17)

W USA krwiaki podtwardówkowe występują w około 33% przypadków po ciężkim urazie głowy (GCS – skala śpiączki Glasgow – poniżej 9). Izolowany krwiak podtwardówkowy występuje u około połowy pacjentów ze stwierdzonym krwiakiem podtwardówkowym. W przypadkach izolowanych krwiaków podtwardówkowych śmiertelność wynosi około 20%, natomiast przy współistnieniu krwiaka podtwardówkowego z innymi uszkodzeniami wewnątrzczaszkowymi ok. 50 % przypadków kończy się zgonem. (48)

Biorąc pod uwagę okoliczności doznania urazu głowy, który spowodował powstanie krwiaka podtwardówkowego, w materiale Katedry i Kliniki Chirurgii Urazowej AM w Gdańsku najczęściej były to ofiary wypadków komunikacyjnych (34,72%), pobicia (28,72%) oraz upadków z wysokości i z pozycji stojącej (26,34%). W badanym materiale prawie 5% stanowiły urazy głowy doznane w czasie uprawiania sportu. Okoliczności tzw. inne oraz nieznanne stanowiły odpowiednio 3,36% oraz 2,17% wszystkich przyczyn urazów głowy. (17)

Autorzy amerykańscy Wilberger i in. na podstawie analizy 5-letniego materiału klinicznego stwierdzili, że najczęstszą przyczyną krwiaków podtwardówkowych były upadki

(53%), wypadki samochodowe (37%) i motocyklowe (7%), przy czym najwyższa śmiertelność dotyczyła motocyklistów (71%). (55, 56)

W doniesieniu z Filipin upadki jako przyczyna krwiaków podtwardówkowych zajmowały jedną z ostatnich pozycji (15,7%), przed uszkodzeniami postrzałowymi (2,4%) i nieznanymi okolicznościami (6,0%). Najliczniejszą grupę przyczyn stanowiły wypadki samochodowe (54,2%), w tym potracenia pieszych 31,3%, obrażenia u pasażerów pojazdów 14,5% i u kierowców 8,4%. Tępe urazy głowy doznane w innych okolicznościach powodowały krwaki podtwardówkowe w 21,7% przypadków, w tym w 19,3% przyczyną było pobicie. (53)

Powyższe wskazuje, że krwaki podtwardówkowe stanowią częste następstwo urazów głowy i mają istotne znaczenie nie tylko w neurotraumatologii, ale również w medycynie sądowej.

Nieliczne przypadki nierozpoznanych bezpośrednio po urazie krwiaków podtwardówkowych ujawniają się najczęściej jako krwaki przewlekłe po upływie różnie długiego czasu. Zdarza się, że są stwierdzane w czasie sądowo-lekarskiej sekcji zwłok osób zmarłych z innych przyczyn. Przewlekłe krwaki podtwardówkowe ujawniane w czasie patomorfologicznej sekcji zwłok są określane przez patomorfologów jako pachymeningiosis haemorrhagica interna, dawniej rozpoznawane były jako pachymeningitis haemorrhagica interna (krwotoczne zapalenie opony twardej) (23, 37) i nie przypisywano im przyczyny urazowej, co zdaniem medyków sądowych oraz neuropatologów sądowych jest niesłuszne. W przypadkach przewlekłych krwiaków podtwardówkowych, zwłaszcza u osób w podeszłym wieku, zmienione stosunki anatomiczne wewnątrz czaszki w związku z zanikiem mózgu o różnej etiologii sprzyjają powstaniu krwiaka podtwardówkowego nawet po urazie godzącym w głowę z bardzo małą siłą, czego pacjent może nie zauważyć. Łatwiej dochodzi wówczas do uszkodzenia żył mostowych, a zwiększenie objętości wolnej przestrzeni wewnątrzczaszkowej sprzyja gromadzeniu się krwi bez występowania objawów klinicznych krwiaka w ciągu dłuższego czasu po urazie. Nie wyklucza to urazowej etiologii takiego krwiaka. (3, 5, 12, 13, 14, 27, 31, 34, 57)

Według Meagher i wsp. w 25-50% przypadków klinicznie rozpoznanych przewlekłych krwiaków podtwardówkowych chorzy nie pamiętali momentu doznania urazu głowy. (32)

Wintzen analizując 212 przypadków wszystkich stwierdzonych krwiaków podtwardówkowych w latach 1959-1978 stwierdził, że w 23,6 % przypadków nie było w wywiadzie informacji świadczących o urazie głowy, poprzedzającym powstanie krwiaka. W tej grupie krwiak podtwardówkowy rozpoznano u 205 chorych w czasie zabiegu

operacyjnego, u 5 dopiero w czasie sekcji zwłok, a w 2 przypadkach w czasie badania TK. Ten sam autor podał także, że zebrany wywiad lekarski odnośnie do urazu głowy był negatywny w 85% przypadków przewlekłych i 5% ostrych krwiałków podtwardówkowych. (57)

Przyczyną braku informacji o urazie głowy w przypadkach urazowych krwiałków podtwardówkowych są: brak świadków zdarzenia, w czasie którego osoba doznaje urazu/urazów głowy (zwłaszcza w sytuacjach, w których uraz głowy jest skutkiem przestępstwa) i niepamięć pokrzywdzonego dotycząca zdarzenia, w czasie którego doznał on urazu głowy w związku z występującą bezpośrednio po urazie niepamięcią dotyczącą czasu zdarzenia, a także niepamięcią wsteczną bądź następczą. Niepamięć ta jest następstwem spowodowanego przez uraz głowy wstrząśnienia bądź stłuczenia mózgu.

I.4. Budowa opony twardej i pajęczej, z uwzględnieniem ultrastruktury

I.4.1. Anatomia opony twardej

Opona twarda jest jedną z trzech błon łącznotkankowych otaczających ośrodkowy układ nerwowy – mózg i rdzeń kręgowy. Najtwardsza i najmocniejsza, a tym samym najmniej podatna na uszkodzenie mechaniczne jest opona twarda, leżąca najbardziej obwodowo od powierzchni mózgu. Jej powierzchnia zewnętrzna bezpośrednio graniczy z powierzchnią wewnętrzną kości czaszki, a powierzchnia wewnętrzna z pajęczynówką mózgu lub rdzenia kręgowego.

Makroskopowo opona twarda składa się z dwóch blaszek: zewnętrznej (lamina externa), stanowiącej okostną kości czaszki oraz wewnętrznej (lamina interna). Obie blaszki przylegają do siebie, rozdzielając się jedynie w miejscu zatok żylnych, zbiornika endolimfy oraz zwoju półksiężycowatego nerwu trójdzielnego. Zdwojona blaszka wewnętrzna opony twardej wytwarza wypustki opony twardej: sierp mózgu, namiot mózdzku, sierp mózdzku i przeponę siodła. Dzielą one jamę czaszki na łączące się ze sobą w części centralnej przestrzenie i stabilizują części anatomiczne mózgowia. (3, 4)

Na podstawie badań opon mózgowo-rdzeniowych, w tym opony twardej w mikroskopie świetlnym i w mikroskopie elektronowym, wykonanych głównie w latach 80. i 90. ubiegłego wieku, ustalono ich budowę histologiczną i ultrastrukturę, a także mechanizm powstawania w warunkach patologicznych przestrzeni anatomicznej między nimi, zwanej przestrzenią podtwardówkową, w której może gromadzić się krew, płyn mózgowo-rdzeniowy

lub ropa, tworząc odpowiednio: krwiak, wodniak lub ropniak podtwardówkowy. (6, 7, 10, 11, 38, 49)

I.4.2. Budowa histologiczna i ultrastruktura opony twardej i pajęczej

W mikroskopie świetlnym opona twarda ma jednolitą, niewarstwową budowę histologiczną. Jest ona utworzona z tkanki łącznej włóknistej, zawierającej włókna kolagenowe oraz elastyczne i naczynia krwionośne (4, 47)

Badania opony twardej w mikroskopie elektronowym transmisyjnym wykazały, że ze względu na ultrastrukturę w oponie twardej można wyróżnić trzy warstwy:

1. zewnętrzną, sąsiadującą z wewnętrzną powierzchnią kości czaszki, określaną jako warstwa okołookostnowa opony twardej (periosteal dura);
2. wewnętrzną od strony pajęczynówki, określaną jako warstwa oponowa opony twardej (meningeal dura)
3. oraz najbardziej wewnętrzną, bezpośrednio przylegającą do opony pajęczej warstwę komórek granicznych opony twardej (dural border cells - DBC).

W warstwie okołookostnowej (periosteal dura), przylegającej do kości czaszki przeważają przeplatające się ze sobą włókna kolagenowe, warunkujące właściwości mechaniczne opony i związaną z nimi jej odporność na urazy mechaniczne, co powoduje, że stanowi ona osłonkę chroniącą mózg przed mechanicznym jego uszkodzeniem. Między pęczkami włókien kolagenowych znajdują się wydłużone, nieco spłaszczone komórki, których budowa w mikroskopie elektronowym odpowiada fibroblastom. Są one ułożone równolegle do powierzchni opony. Ta część opony twardej, bezpośrednio przylegająca do kości czaszki, zawiera także nerwy i naczynia krwionośne. Występują w niej włókna elastyczne, ale w znacznie mniejszej ilości niż włókna kolagenowe.

Warstwa wewnętrzna opony twardej, w odróżnieniu od jej warstwy zewnętrznej zawiera proporcjonalnie więcej fibroblastów w stosunku do włókien kolagenowych.

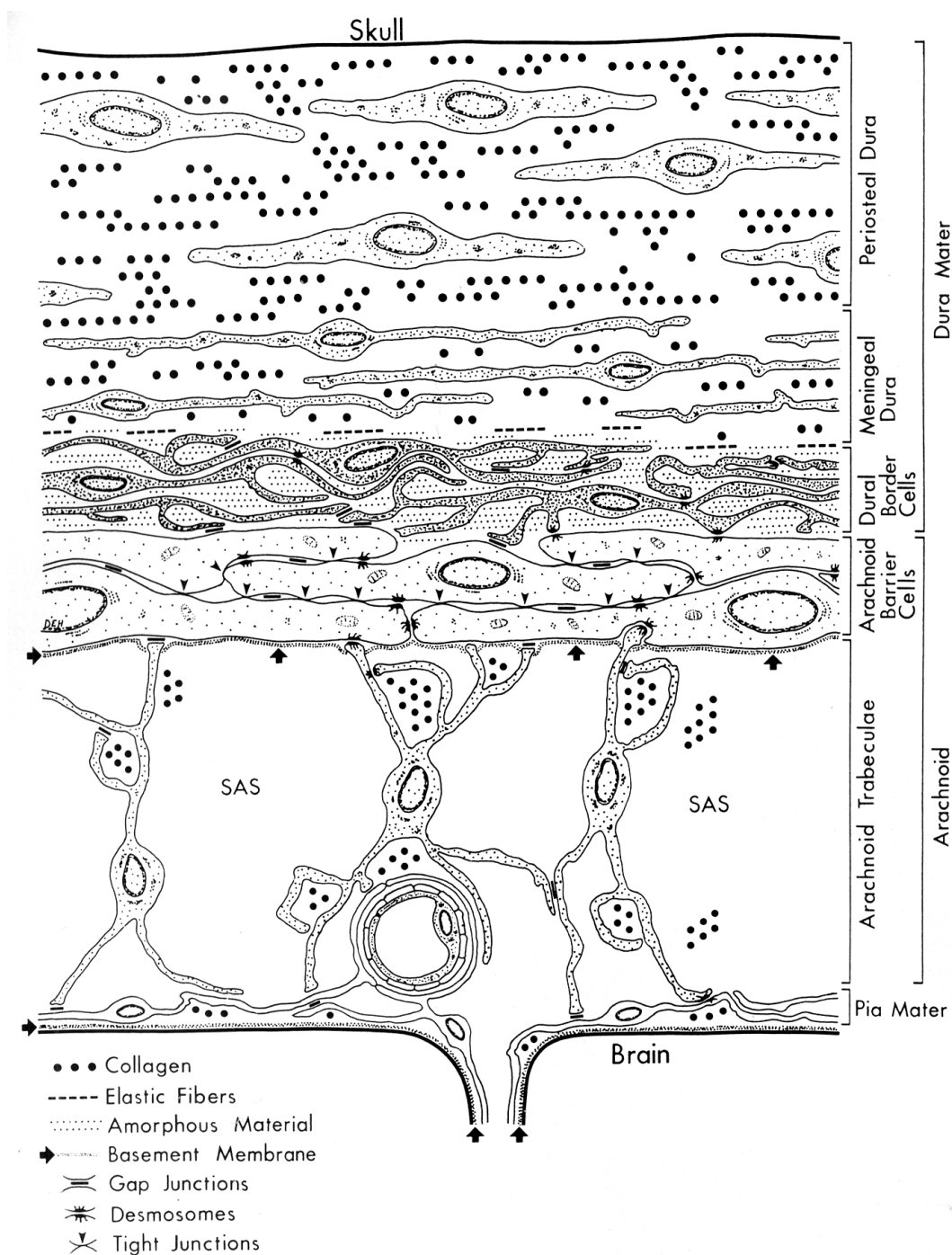
Trzecia, najbardziej wewnętrzna warstwa opony twardej, granicząca z pajęczynówką jest utworzona z populacji jednolitych, wydłużonych i spłaszczonych komórek nazwanych przez Nabeshima (35) komórkami granicznymi opony twardej (dural border cells – DBC).

Inne, spotykane w piśmiennictwie nazwy tych komórek to: komórki podtwardówkowe (subdural cells); komórki jasne (light cells); neurothelium, a także niesłuszna nazwa – podtwardówkowy międzybłonek (subdural mesothelium), co zostanie wyjaśnione w dalszej części omówienia.

Komórki te tworzą po kilka wypustek i rozprzestrzeniają się na znaczne odległości układając się równolegle swoją długą osią do powierzchni opon mózgowych. U ludzi i zwierząt warstwa komórek granicznych wykazuje charakterystyczne cechy ultrastrukturalne. Są to: brak włókien kolagenowych w przeciwieństwie do pozostałych warstw opony twardej; liczne, różnej wielkości i kształtu przestrzenie międzykomórkowe powstałe w związku z nieregularnym układem wypustek tych komórek, zawierające zamiast włókien kolagenowych bezpostaciową drobnoziarnistą substancję, nie wykazującą cech budowy włókienkowej; bardzo mała ilość połączeń międzykomórkowych między komórkami DBC w postaci połączeń zwierających (łac. maculae adherentes, ang. desmosomes). Przestrzenie międzykomórkowe mogą zawierać włókna elastyczne. Istotne znaczenie praktyczne dla właściwości i fizjologii tej warstwy opony twardej ma brak połączeń zamykających (ang. tight junctions) oraz brak błony podstawnej w odróżnieniu od komórek podobnych do międzybłonka (mesothelium), pokrywających zewnętrzną powierzchnię pajęczynówki. Opisane cechy budowy tej warstwy opony twardej powodują, że jest to warstwa „słaba”, podatna i łatwo ulegająca uszkodzeniu.

Wewnętrzna warstwa komórek granicznych opony twardej bezpośrednio sąsiaduje z warstwą komórek pokrywających zewnętrzną powierzchnię pajęczynówki, mających inną strukturę. Warstwa tych komórek jest określana jako warstwa komórek granicznych pajęczynówki (arachnoid barrier cells – ABC). Warstwa ta jest utworzona z ściśle upakowanych komórek, bez jakichkolwiek przestrzeni międzykomórkowych między nimi, natomiast posiadających liczne połączenia międzykomórkowe, głównie połączenia zwierające, połączenia zamykające i połączenia komunikujące jonowo-metaboliczne (ang. nexus; gap junctions). Taka budowa nadaje warstwie granicznej pajęczynówki dużą odporność na uszkodzenie mechaniczne wskutek działania sił oraz uniemożliwia ruch płynów, dużych cząsteczek, a nawet jonów. Powoduje to, że warstwa „słabych” podatnych na uszkodzenie komórek DBC bezpośrednio sąsiaduje z odporną na działanie sił warstwą komórek pokrywających powierzchnię zewnętrzną opony pajęczynowej. Komórki pokrywające powierzchnię zewnętrzną opony pajęczynowej leżą na błonie podstawnej, co dodatkowo umacnia je i zmniejsza ich podatność na uszkodzenie mechaniczne. (6, 10, 11, 38, 43, 54)

Rycina 1 przedstawia schemat ultrastruktury opony twardej i pajęczynówki wg Duane E. Haines. (10)



Ryc.1. Schemat ultrastruktury opony twardej i pajęczynówki.

Objaśnienie opisu w języku angielskim na ryc.1:

Skull - czaszka

Brain - mózg

Arachnoid - pajęczynówka

Dura mater - opona twarda

Pia Mater - opona miękka

Arachnoid Trabeculae - beleczki pajęczynówki

Arachnoid Barrier Cells - komórki graniczne pajęczynówki

Dural Border Cells - komórki graniczne opony twardej

Meningeal Dura - warstwa oponowa opony twardej

Periosteal Dura - warstwa okołokostnowa opony twardej

SAS - przestrzeń podpajęczynówkowa

Collagen - kolagen

Elastic Fibers - włókna elastyczne

Amorphous Material - substancja bezpostaciowa

Basement Membrane - błona podstawna

Gap junctions - połączenia komunikujące jonowo-metaboliczne

Desmosomes - połączenia zwierające

Tight junctions - połączenia zamykające

I.4.3. Kontrowersyjna przestrzeń podtwardówkowa

Anatomowie, a także klinicyści: neurologzy, neurochirurdzy i radiolodzy uważają, że mózg jest otoczony przez dwie przestrzenie anatomiczne: podpajęczynówkową i podtwardówkową, z których przestrzeń podpajęczynówkowa jest wypełniona płynem mózgowo-rdzeniowym. (3, 4, 11, 16, 31, 33, 36)

Przestrzeń podtwardówkową ma stanowić wąska, szczelinowata przestrzeń zawarta między wewnętrzną powierzchnią opony twardej, a zewnętrzną powierzchnią pajęczynówki. Powierzchnia wewnętrzna przestrzeni jest wysłana komórkami, które były uważane przez histologów na podstawie badań w mikroskopie świetlnym jako komórki międzybłonka (mesothelium). (6, 10, 11, 40)

W 1920 r. Mallory na podstawie badań w mikroskopie optycznym doszedł do wniosku, że wewnętrzna powierzchnia opony twardej jest wysłana fibroblastami, natomiast powierzchnia zewnętrzna pajęczynówki – komórkami o wyglądzie śródbłonka.

Późniejsze badania w mikroskopie elektronowym nie potwierdziły tej koncepcji. Badania w mikroskopie elektronowym wykazały, że komórki wyściełające przestrzeń podtwardówkową, w odróżnieniu od międzybłonka wyściełającego jamy surowicze ciała (osierdzie, jamy opłucnej, jama otrzewnej), wykazują cechy ultrastrukturalne charakterystyczne dla fibroblastów. Ponadto w odróżnieniu od przestrzeni podtwardówkowej, otwarcie chirurgiczne wysłanych międzybłonkiem jam surowicznych ciała nie powoduje uszkodzenia tkanek i nie towarzyszą mu odczyny naprawcze po ich zamknięciu. (10, 11)

Badania porównawcze zeszkobin z powierzchni jam surowicznych ciała oraz z powierzchni „przestrzeni podtwardówkowej” wykazały, że komórki pokrywające powierzchnię „przestrzeni podtwardówkowej” stanowi populacja komórek niejednorodnych, podobnych do fibroblastów w odróżnieniu od komórek tworzących międzybłonek wyściełający jamy surowicze ciała. (10, 11)

Komórki pokrywające powierzchnię zewnętrzną pajęczynówki były spłaszczone lub kostkowe. Na podstawie tych obserwacji wysnuto wniosek, że wewnętrzna powierzchnia opony twardej jest pokryta fibroblastami, natomiast powierzchnia zewnętrzna pajęczynówki – międzybłonkiem.

Spostrzeżenia powyższe wykluczały podobieństwo przestrzeni podtwardówkowej do jam surowicznych ciała, jednak nie wykluczały istnienia przestrzeni podtwardówkowej w sensie anatomicznym. (10, 11)

Badania komórek międzybłonka przy użyciu mikroskopu elektronowego, mające być pomocne w diagnostyce histopatologicznej pierwotnych nowotworów złośliwych

wywodzących się z tej tkanki wykazały, że ich ultrastruktura jest inna od ultrastruktury komórek wyścielejających wewnętrzną powierzchnię opony twardej, charakterystycznej dla fibroblastów. Komórki międzybłonka na powierzchni wolnej posiadają długie mikrokosmki, w cytoplazmie w okolicy okołojądrowej niecharakterystyczne włókienka, natomiast w całej cytoplazmie gęste pęczki włókienek cytokeratyny i umiarkowaną ilość siateczki endoplazmatycznej, a w miejscu przylegania komórek do siebie liczne desmosomy. Cechy te odróżniają je od fibroblastów wyścielejających oponę twardą. (26)

Analiza podręczników i atlasów anatomii oraz histologii wykazała, że w 36 z 42 podręczników stwierdzono kategorię istnienia przestrzeni podtwardówkowej. Tylko w 6 z 42 podręczników autorzy wypowiedzieli się za prawdopodobnym istnieniem przestrzeni podtwardówkowej bądź wykluczyli jej istnienie. (10, 11)

Badania Fredericksona (6) polegające na starannym preparowaniu tkanek wykazały istnienie ciągłości warstw komórkowych i elementów pozakomórkowych od pajęczynówki po okostną kości czaszki, nie potwierdzając istnienia przestrzeni podtwardówkowej. Stwierdzono, że delikatne uniesienie opony twardej powoduje oddzielenie się jej od pajęczynówki w obrębie komórek stanowiących warstwę graniczną opony twardej (DBC), tworząc jamę krwiaka podtwardówkowego. Czynności takie uszkadzają błony komórkowe komórek warstwy granicznej opony twardej i istniejące w tej warstwie przestrzenie międzykomórkowe. Najprawdopodobniej taki mechanizm ma powodować powstanie przestrzeni podtwardówkowej w warunkach patologicznych, kiedy to pourazowe krwawienie ma rozdzielać przylegające do siebie komórki w obrębie warstwy granicznej opony twardej (DBC). Wykluczenie istnienia anatomicznej przestrzeni podtwardówkowej stoi w sprzeczności z wynikami badań pośmiertnych i zażyciowych badań obrazowych w przypadkach krwiaków podtwardówkowych. Badania doświadczalne na zwierzętach wykazały, że jest to sprzeczność pozorna.

W badaniach doświadczalnych na zwierzętach Orlin i wsp. (38) zlokalizowali warstwę komórek granicznych opony twardej jako warstwę komórek podobnych do płatków („flake-like cells”), a następnie wprowadzali do niej igłę do granicy opony twardej z pajęczynówką, przez którą podawali krew znakowaną peroksydazą lub krew z aorty brzusznej, po czym zwierzęta perfundowano płynem utrwalającym w celu zapobieżenia odczynom w miejscu zabiegu. Stwierdzono, że podana krew gromadziła się w przedziale podtwardówkowym odpowiadającym warstwie granicznej opony twardej utworzonej z komórek DBC, rozwarstwiając ją. Badania morfologiczne – mikroskopowe wykazały, że znakowana peroksydazą krew i zawarte w niej elementy morfotyczne były oddzielone od pajęczynówki i

kolagenu opony twardej przez komórki DBC. Tak więc podawana krew spowodowała rozwarstwienie opony twardej w miejscu warstwy komórek granicznych (DBC), tworząc obraz klasycznego krwiaka podtwardówkowego (6, 10, 11, 38)

I.4.4. Naczynia opony twardej mózgu a krwiaki wewnątrzczaszkowe

I.4.4.1. Tętnice oponowe

Opona twarda mózgu w odróżnieniu od nieunaczynionej pajęczynówki jest dobrze unaczyniona. Wyróżniamy w niej trzy rodzaje naczyń krwionośnych: tętnice zwane tętnicami oponowymi, stanowiące obwodowe, dalsze odgałęzienia tętnic szyjnych zewnętrznych, kręgowych i wewnętrznych, zlokalizowane w zewnętrznej warstwie opony. Tętnice te w związku z ich lokalizacją i przyleganiem do wewnętrznej powierzchni kości czaszki, w których częściowo przebiegają w obrębie rowków naczyniowych, są źródłem krwiaków nadtwardówkowych, zlokalizowanych na granicy wewnętrznej powierzchni kości czaszki i zewnętrznej powierzchni opony twardej mózgu. Tętnice oponowe i ich gałęzie w związku z ich lokalizacją anatomiczną bardzo łatwo ulegają uszkodzeniu zarówno wskutek urazu głowy, który spowodował złamanie kości czaszki w ich bezpośrednim sąsiedztwie, jak i urazu głowy, który spowodował jedynie krótkotrwałe odkształcenie kości czaszki bez ich złamania. Dlatego w części krwiaków nadtwardówkowych nie obserwuje się złamania kości czaszki (10-20% przypadków). (3, 4, 9, 47, 48, 52)

I.4.4.2. Zatoki żyłne opony twardej

Zatoki opony twardej, zlokalizowane na wewnętrznej powierzchni czaszki, są przestrzeniami naczyniowymi zawartymi między obiema blaszkami opony twardej, których powierzchnia jest wysłana śródbłonkiem i odprowadzają one krew z mózgowia, głównie do układu żyły szyjnej wewnętrznej. Uszkodzenie ściany zatok żylnych opony twardej najczęściej jest źródłem krwiaka podtwardówkowego, bardzo rzadko – nadtwardówkowego. (3)

I.4.4.3. Żyły mostowe

Układ żylny opony twardej stanowią najczęściej podwójne naczynia żyłne, towarzyszące odpowiednim tętnicom. Z naczyń żylnych szczególne znaczenie w neurotraumatologii jako źródło krwiaka podtwardówkowego mają żyły mostowe. Żyły mostowe to bardzo krótkie naczynia żyłne łączące układ naczyń żylnych powierzchni wypukłej półkul mózgu z zatokami żylnymi opony twardej i przebiegające w związku z tym przez przestrzeń podpajęczynówkową, pajęczynówkę, „przestrzeń podtwardówkową” i ścianę

zatok (8, 10, 11, 19, 22, 29, 30, 32, 58). Przerwanie ciągłości co najmniej jednej z nich jest źródłem krwaka podtwardówkowego.

Zazwyczaj między wyjściem z przestrzeni podpajęczynówkowej a ścianą zatoki strzałkowej wolna część żył ma długość ok. 10-20 mm. Żyły znajdujące się w okolicy czołowej przed wniknięciem do zatoki kierują się do tyłu, średnio pod kątem 110° , natomiast największe żyły mostowe, znajdujące się ku tyłowi od części czołowej mają kierunek ku przodowi, przy czym kąt, pod jakim wnikają do zatoki zmniejsza się od przodu ku tyłowi. (22)

Długość żył, właściwości mechaniczne ściany (ubogie we włókna mięśniowe) oraz topografia anatomiczna są przyczyną, że w przypadkach urazów głowy powodujących gwałtowne przyspieszenie (uderzenie w głowę) lub wyhamowanie (upadek i uderzenie głową o np. twarde podłoże) ruchu głowy w osi strzałkowej prowadzi do wzajemnego ruchu mózgowia względem czaszki, który w takich przypadkach jest przyczyną pęknięcia ściany tych naczyń, a tym samym źródłem krwaka podtwardówkowego. (8, 22) Oprócz wyżej wymienionych prostych mechanizmów powstawania krwaków podtwardówkowych mogą być także mechanizmy złożone.

I.5. Mechanizm powstawania krwaka podtwardówkowego

Krwaki podtwardówkowe u ludzi najczęściej są następstwem krwawienia z uszkodzonych w następstwie urazu głowy żył mostowych (3, 8, 10, 11, 29, 32). Jak opisano wyżej, są to naczynia żyłne zbierające krew z żył powierzchni półkul mózgu i odprowadzające ją do zatok żylnych opony twardej mózgu, przechodzące przez przestrzeń podpajęczynówkową, pajęczynówkę i oponę twardą mózgu - ścianę zatok żylnych opony twardej.

Opona pajęczna i pokrywająca jej powierzchnię komórki warstwy granicznej opony pajęcznej (ABC) są mocno zespolone z powierzchnią mózgu i pokrywającą ją oponą miękką, zarówno przez beleczki, które tworzą fibroblasty z wypustkami, jak i włókna kolagenowe, przebiegające w obrębie przestrzeni podtwardówkowej, w odróżnieniu od słabego zespolenia ze sobą komórek warstwy granicznej opony twardej (DBC) zarówno z powierzchnią pajęczynówki, jak i między sobą. Ściana żył mostowych na odcinku przechodzącym przez przestrzeń podpajęczynówkową oraz pajęczynówkę z pokrywającą jej powierzchnię warstwą komórek granicznych pajęczynówki (ABC) jest stosunkowo mocno zespolona z tymi

strukturami, zwłaszcza z pajęczynówką w odróżnieniu od słabego jej zespolenia z komórkami warstwy granicznej opony twardej (DBC).

Skutkiem urazu głowy powodującego gwałtowne przyspieszenie głowy (uraz zadany pięścią lub ręką obcą przy użyciu twardego narzędzia albo kopnięcie) lub gwałtowne opóźnienie – wyhamowanie ruchu głowy (upadek i uderzenie głową np. o twardą powierzchnię) jest ruch mózgowia względem wewnętrznej powierzchni czaszki. Największe naprężenia działają wówczas na ścianę żył mostowych w miejscu, gdzie przebijają leżącą na granicy z pajęczynówką wewnętrzną warstwę graniczną opony twardej (DBC), powodując przerwanie ciągłości ściany naczynia z następowym krwawieniem. Wynika to z faktu, że część zewnętrzna (włóknista) opony twardej jest mocno zespolona z wewnętrzną powierzchnią kości czaszki, a pajęczynówka jest mocno zespolona z powierzchnią mózgu. Krew wylewająca się z uszkodzonej żyły rozwarstwia szczególnie podatną warstwę graniczną opony twardej utworzoną z komórek warstwy granicznej (DBC), tworząc krwiniak o wyglądzie krwiniaka podtwardówkowego. Jest to uwarunkowane wyżej omówioną ultrastrukturą opony twardej i pajęczynówki.

Czynnikiem predysponującym do powstania przewlekłego krwiniaka podtwardówkowego u ludzi starych wskutek doznanego niewielkiego urazu głowy jest zmniejszenie objętości mózgu w następstwie zmian zanikowych o różnej etiologii, powodujące dodatkowe stałe, większe niż zwykle napięcie ściany żył mostowych, związane z oddaleniem się zanikowego mózgu od wewnętrznej powierzchni kości czaszki. Nawet niewielki uraz głowy powodujący przemieszczenie mózgu względem kości czaszki może spowodować pęknięcie napiętej ściany żyły mostowej i krwawienie. (5, 8, 10, 22, 46, 57)

I.5.1. Inne źródła krwiniaków podtwardówkowych

Źródłem krwawienia w przypadku krwiniaków podtwardówkowych, mogących występować samoistnie bądź współistnieć z uszkodzeniem żył mostowych mogą być także urazowe pęknięcia małych gałązek tętnic korowych mózgu, co może mieć miejsce w przypadkach rozerwania (laceratio) mózgu i opon miękkich mózgu. Tego typu źródła krwiniaków podtwardówkowych mogą stanowić przyczynę wznowy krwiniaka podtwardówkowego mimo wcześniejszej prawidłowej diagnostyki i interwencji chirurgicznej. W przypadkach stłuczenia lub rozerwania mózgu z uszkodzeniem opon miękkich krwiniak podtwardówkowy może mieć mieszany, tętniczo-żylny charakter. (2, 3, 9, 28, 32, 52, 57)

I.6. Organizacja krwiaka podtwardówkowego

W przypadkach krwiaków podtwardówkowych, zwłaszcza narastających powoli i nie osiagających dużej objętości, w których śmierć nie następuje bezpośrednio lub w krótkim czasie po urazie, wokół wynaczynionej krwi wytwarza się torebka zwana torebką krwiaka podtwardówkowego (6, 19, 20, 21, 44, 45, 50, 51, 57, 59, 60, 61). Składa się ona z grubszej części zewnętrznej przylegającej do opony twardej oraz cieńszej części wewnętrznej, przylegającej do warstwy komórek granicznych pajęczynówki (ABC). W części zewnętrznej torebki pojawiają się liczne drobne naczynia krwionośne, wrastające od strony opony twardej, a także fibroblasty, miofibroblasty, komórki tuczne, eozynofile. W części wewnętrznej torebki krwiaka, przylegającej do pajęczynówki pojawiają się fibroblasty oraz długie, spłaszczone komórki z rozgałęzionymi wypustkami, nieco później elementy włókienkowe tkanki łącznej: włókna kolagenowe i elastyczne. Badania torebki wykazały, że podczas jej tworzenia w warstwie komórek warstwy granicznej opony twardej (DBC) pojawiają się fibroblasty, potem włókna tkanki łącznej kolagenowe i elastyczne, nie występujące w tej warstwie w warunkach fizjologicznych, a także naczynia krwionośne, inne komórki tkanki łącznej oraz komórki, które dostały się tu drogą krwiopochodną.

I.7. Krwiaki podtwardówkowe jako problem opiniodawczy w orzecznictwie sądowo-lekarskim

Zarówno krwiaki podtwardówkowe izolowane, stanowiące jedyne wewnątrzczaszkowe następstwo doznanego urazu głowy, jak i współistniejące z innymi uszkodzeniami wewnątrzczaszkowymi (krwiaki nadtwardówkowe, podpajęczynówkowe, wewnątrzkomorowe oraz stłuczenia i/lub rozerwania mózgu) są często spotykane w praktyce medyka sądowego, w orzecznictwie sądowo-lekarskim dotyczącym urazów głowy. Dotyczy to orzecznictwa sądowo-lekarskiego w przypadkach urazów głowy zarówno u osób zmarłych, jak i osób które dzięki udzielonej pomocy medycznej przeżyły. Szczególne trudności opiniodawcze często stwarzają przypadki osób, u których następstwa krwiaka stały się przyczyną śmierci. Stanowią one ważny, często bardzo trudny problem opiniodawczy, bardzo istotny dla organów ścigania i wymiaru sprawiedliwości. Dotyczy to przede wszystkim ustalenia warunków i okoliczności doznania urazu głowy, który spowodował powstanie krwiaka podtwardówkowego. Ustalenie „wieku” krwiaka podtwardówkowego umożliwia medykowi sądowemu potwierdzenie bądź wykluczenie, że uraz głowy, którego następstwem jest krwiak podtwardówkowy miał miejsce w czasie, warunkach i okolicznościach ustalonych

podczas dochodzenia, co w dalszym etapie procesu karnego ma istotne znaczenie dla ustalenia winy oskarżonego, bądź uniewinnienia go od zarzutu, zawartego w akcie oskarżenia.

Pod pojęciem „wieku” krwiaka podtwardówkowego należy rozumieć czas, jaki upłynął od doznania urazu głowy, będącego przyczyną krwiaka podtwardówkowego do czasu, w którym jest badany. W opiniowaniu sądowo-lekarskim dotyczącym osób zmarłych w następstwie doznanego urazu głowy to czas, jaki upłynął od chwili doznania urazu głowy, który spowodował powstanie krwiaka podtwardówkowego do śmierci pokrzywdzonego. W przypadkach osób, które przeżyły taki uraz głowy będzie to czas, jaki upłynął od chwili doznania urazu głowy do momentu ewentualnego pobrania wycinka z opony twardej z przylegającym krwiakiem w czasie zabiegu neurochirurgicznego do badania histopatologicznego.

Ocena makroskopowa „wieku” krwiaka podtwardówkowego jest bardzo niedokładna, bowiem umożliwia jedynie rozpoznanie krwiaka wczesnego lub przewlekłego, nie pozwalając na dokładniejsze ustalenie czasu jego trwania (dni, tygodnie, miesiące). (11, 16 ,31 ,33 ,36)

W dostępnym piśmiennictwie Lindberg w 1971 roku w opracowanym przez siebie rozdziale dotyczącym urazów mózgu i opon mózgowych zestawiał zmiany makroskopowe w obrębie krwiaka podtwardówkowego w miarę upływu czasu od powodującego go urazu głowy do śmierci. Według tego autora krwiak podtwardówkowy w 1- 3 doby po urazie jest utworzony z ciemnopurpurowych skrzepów, które łatwo są spłukiwane z powierzchni opony twardej przez strumień wody. w 4 – 6 doby w czasie spłukiwania tworzących krwiak skrzepów strumieniem wody niewielkie ilość skrzepów przylegają do powierzchni opony twardej. Od 6 do 10 doby krwiak podtwardówkowy jest po części utworzony z kruchych, ciemnobrązowych skrzepów z widoczną zewnętrzną torebką krwiaka, łatwo dająca się oddzielić od opony twardej. W okresie od 2 do 3 tygodnia po urazie zachowane skrzepy krwi mają barwę czekolady mlecznej lub brudnego oleju silnikowego i są otoczone przez wewnętrzną torebkę, a torebka zewnętrzna jest grubsza i bardziej odporna na rozerwanie. W 4 tygodniu skrzep jest zwykle „upłyniony”, a w 8 tygodniu większe krwiaki są całkowicie otoczone przez torebkę, mając zabarwienie od szarobrązowego do rdzawobrązowego. Po 2-3 latach o krwiaku podtwardówkowym może świadczyć jedynie zmatowienie i żółtobrązowe zabarwienie wewnętrznej powierzchni opony twardej z widocznymi małymi ogniskami ponownego krwawienia o purpurowym, czarnym, brązowym, rdzawym lub żółtym kolorze.

(25)

Powyższy opis wyglądu makroskopowego krwiaka podtwardówkowego w miarę upływu czasu od urazu głowy wskazuje, że ocena wieku krwiaka jest obarczona dużym błędem.

W orzecznictwie sądowo-lekarskim praktycznie nieprzydatny jest stosowany w klinice i odnoszący się do osób żywych podział krwiaków podtwardówkowych na ostre, podostre i przewlekłe. Podstawowe kryterium ich rozpoznania stanowi czas, jaki upłynął od chwili znanego z wywiadu czasu doznania urazu głowy (w przypadkach śmiertelnych najczęściej nieznanym) do chwili wystąpienia objawów klinicznych świadczących o istnieniu krwiaka podtwardówkowego. Czas wystąpienia objawów klinicznych krwiaka podtwardówkowego nie daje podstaw do wnioskowania odnośnie czasu urazu głowy, który spowodował jego powstanie, bowiem uraz głowy i wystąpienie pierwszych objawów krwiaka podtwardówkowego najczęściej jest poprzedzone okresem bezobjawowym, którego czas trwania zależy od dynamiki narastania krwiaka podtwardówkowego. (3, 5, 19, 29, 33, 48)

Krwiaki podtwardówkowe urazowe występują u osób, które doznały urazu głowy wskutek pobicia, rozboju, w wypadkach komunikacyjnych, zwłaszcza drogowych, w wypadkach w pracy, podczas upadku z wysokości bądź upadku osoby nietrzeźwej z pozycji stojącej, a także w tzw. zespole dziecka maltretowanego. Powyższe wskazuje, że uraz głowy i będący jego następstwem krwiak podtwardówkowy często są wynikiem przestępstw tj. czynów zabronionych pod groźbą kary przez ustawę obowiązującą w czasie ich popełnienia. Z tego powodu przypadki te stanowią przedmiot zainteresowania organów ścigania i wymiaru sprawiedliwości, a tym samym medyka sądowego, powołanego w charakterze biegłego.

W przypadku krwiaków pourazowych, oprócz ustalenia czasu, warunków i okoliczności ich powstania, co jest pomocne w ustaleniu sprawcy przestępstwa, którego skutkiem jest krwiak podtwardówkowy, także może zachodzić konieczność rozważenia popełnienia błędu medycznego, najczęściej diagnostycznego, jeśli pokrzywdzony w okresie bezpośrednio poprzedzającym zgon miał kontakt z różnymi lekarzami bądź różnymi jednostkami służby zdrowia.

W takich przypadkach sąd, najczęściej posługując się opinią biegłego medyka sądowego musi ustalić, czy za śmierć człowieka ponosi odpowiedzialność sprawca przestępstwa (pobicie, rozbój, wypadek drogowy, wypadek w pracy), czy personel medyczny – najczęściej lekarz, którego postępowanie diagnostyczne i/lub terapeutyczne uznaje się za nieprawidłowe. (39, 41) Od czasu wprowadzenia tomografii komputerowej do klinicznej praktyki lekarskiej w związku z dostępnością takiej aparatury w większości szpitali w Polsce diagnostyka zażyciowa krwiaków podtwardówkowych i innych uszkodzeń

wewnątrzczaszkowych nie powinna sprawiać trudności. Obecnie nierozpoznanie krwiaka podtwardówkowego przez lekarzy w jednostkach służby zdrowia dysponujących możliwością wykonania badania tomokomputerowego u pacjenta z urazem głowy w wywiadzie jest skutkiem lekkomyślności lub zaniedbania.

Ustalenie czasu powstania krwiaka podtwardówkowego ma istotne znaczenie praktyczne w przypadkach, w których dochodzenie lub śledztwo wykazało, że pokrzywdzony doznał w różnym czasie i w różnych okolicznościach dwóch, a czasem nawet więcej urazów głowy, z których każdy mógł spowodować powstanie krwiaka podtwardówkowego, zwłaszcza jeśli każdy z tych urazów był spowodowany przez inną osobę.

Nieurazowe krwiaki podtwardówkowe są najczęściej powikłaniem procesów chorobowych, którym towarzyszą zaburzenia krzepnięcia krwi z tendencją do nadmiernego krwawienia, zwanego skazą krwotoczną. Krwiaki te mogą także być następstwem nieprawidłowego leczenia zaburzeń krzepnięcia krwi lub zapobiegania ich wystąpieniu (leczenie środkami przeciwkrzepliwymi). Część przypadków nieurazowych, izolowanych krwiaków podtwardówkowych może także stanowić przedmiot zainteresowania organów ścigania, wymiaru sprawiedliwości i medyka sądowego w związku z podejrzeniem popełnienia błędu medycznego przez personel medyczny w przypadkach, które zakończyły się śmiercią chorego lub spowodowały u niego ciężki uszczerbek na zdrowiu.

Czynnikami predysponującymi do wystąpienia izolowanego krwiaka podtwardówkowego mogą także być podeszły wiek i alkoholizm.

Powyższe wskazuje, że umiejętność ustalenia „wieku” krwiaka podtwardówkowego ma istotne znaczenie praktyczne dla medyka sądowego, a tym samym jest bardzo przydatne dla organów ścigania i wymiaru sprawiedliwości.

II. CEL I ZAŁOŻENIA PRACY

Od dawna i obecnie „wiek” krwiaka podtwardówkowego usiłuje się ustalić na podstawie badania histopatologicznego wycinka opony twardej z krwiakiem, jednakże problem ten rzadko stanowił przedmiot zainteresowania najbardziej predysponowanych do tego patomorfologów zajmujących się patologią układu nerwowego – neuropatologów – czego wyrazem jest skąpe piśmiennictwo zagraniczne, dotyczące tego problemu badawczego.

Mimo skąpego piśmiennictwa dotyczącego tego zagadnienia opracowano tabelarycznie zestawienia zależności między odpowiadającym czasowi urazu głowy wiekiem krwiaka podtwardówkowego, a charakterem zmian morfologicznych w obrębie krwiaka, zwłaszcza na jego granicy z oponą twardą.(tab. VI i VII)

Tabele te zawierają niewielkie różnice między sobą i są umieszczone w podręcznikach neuropatologii sądowej (16, 24, 36) oraz w rozdziałach dotyczących traumatologii ośrodkowego układu nerwowego zawartych w części podręczników neuropatologii (12, 31)

Jako kryteria histopatologiczne w ustalaniu wieku krwiaka podtwardówkowego stosuje się zmiany zachodzące w obrębie tworzących krwiak erytrocytów („świeże”, shemolizowane) oraz pojawianie się nacieków z neutrofilów, a także proliferacja naczyń, natomiast ze zmian na granicy krwiaka i opony twardej zwraca się uwagę w głównej mierze na występowanie złogów włókniaka, makrofagów, a zwłaszcza na grubość warstw fibroblastów. To ostatnie kryterium uwzględniając omówioną na wstępie budowę mikroskopową „przestrzeni podtwardówkowej” wydaje się budzić pewne uzasadnione wątpliwości. Ponadto należy zaznaczyć, że zawarte w tabelach spostrzeżenia opierają się na ocenie preparatów histologicznych barwionych H+E z identyfikacją makrofagów na podstawie obecności w ich cytoplazmie produktu rozpadu krwi – hemosyderyny, której obecność potwierdzano w preparatach z wykonanym odczynem barwnym na żelazo.

Podczas wykonanych w Katedrze i Zakładzie Akademii Medycznej w Gdańsku sądowo-lekarskich sekcji zwłok osób zmarłych w następstwie urazu głowy z krwiakiem podtwardówkowym od około 20 lat starano się określić „wiek” krwiaka podtwardówkowego wykorzystując informacje zawarte w tych tabelach. Okazało się, że w części przypadków „wiek” krwiaka ustalony w czasie badania histopatologicznego, po jego porównaniu z wynikami przeprowadzonego śledztwa okazał się obarczony dość dużym błędem.

Spostrzeżenia te zostały także potwierdzone w przeprowadzonych badaniach pilotażowych przed podjęciem decyzji o wykonaniu badań, mających stanowić przedmiot niniejszej rozprawy.

Stąd wydawało się zasadne podjęcie badań mających na celu próbę ustalenia zmian morfologicznych zachodzących w obrębie krwiaka podtwardówkowego w zależności od czasu, jaki upłynął od momentu doznania urazu głowy do śmierci pokrzywdzonego, z wykorzystaniem stosowanych obecnie w patomorfologii metod badania immunohistochemicznego, dostosowanych do badanego zagadnienia.

Z powyższych względów celem podjętych badań była próba obiektywizacji kryteriów morfologicznych – histopatologicznych, umożliwiających ustalenie wieku krwiaka podtwardówkowego.

Dla osiągnięcia zamierzonego celu postanowiono:

1. wybrać z materiału archiwalnego Zakładu przypadki zgonów osób po doznaniu urazu głowy ze stwierdzonym krwiakiem podtwardówkowym, w których analiza akt śledztwa i/lub historii choroby umożliwiła pewne ustalenie czasu doznania urazu głowy;
2. dokonać oceny przydatności obecnie stosowanych kryteriów histologicznych w ustalaniu czasu powstania krwiaka podtwardówkowego na podstawie retrospektywnej analizy zmian w wycinkach z opony twardej z przylegającym krwiakiem;
3. dokonać oceny przydatności badania immunohistochemicznego znaczników (markerów) komórek zaangażowanych w procesie resorpcji i organizacji krwiaków podtwardówkowych, co – jak się wydaje – powinno umożliwić dokładniejszą i bardziej obiektywną ocenę czasu powstania krwiaka.

III. MATERIAŁ

Badania postanowiono wykonać wykorzystując materiał archiwalny Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Akademii Medycznej w Gdańsku w postaci bloków parafinowych wykonanych z pobranych w czasie sekcji zwłok wycinków z opony twardej mózgu, z przylegającym do niej krwakiem podtwardówkowym oraz sporządzonych z nich preparatów histologicznych barwionych hematoksyliną i eozyną (H+E), a w części przypadków także metodą Massona i Azan.

Materiał ten zabezpieczono do badania histopatologicznego wraz z wycinkami z innych narządów wewnętrznych zgodnie z obowiązującymi w medycynie sądowej zasadami postępowania w czasie sądowo-lekarskich sekcji zwłok osób zmarłych w następstwie doznanego urazu głowy, u których stwierdzono krwiak podtwardówkowy. W jedenastu przypadkach był to izolowany krwiak podtwardówkowy, w pozostałych przypadkach towarzyszyły mu inne uszkodzenia wewnątrzczaszkowe, jak stłuczenie mózgu i/lub krwiak nadtwardówkowy. We wszystkich analizowanych przypadkach sekcje zwłok wykonano na zlecenie miejscowych prokuratur w okresie od 2000 r. do 2007 r. W znacznej większości przypadków krwiak podtwardówkowy rozpoznano za życia pokrzywdzonego w czasie jego pobytu w szpitalu lub w klinice po doznaniu urazu głowy w okresie bezpośrednio poprzedzającym zgon.

Z badania wyłączono te przypadki, w których w czasie sekcji zwłok i/lub badania histopatologicznego stwierdzono zaznaczone cechy autolizy lub gnicia.

W każdym przypadku sądowo-lekarskiej sekcji zwłok wykonanej w prosektorium Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej AM w Gdańsku zabezpieczone do badania histopatologicznego wycinki z narządów są utrwalone w 8% roztworze zbuforowanej formaliny, a do wykonania z nich bloków parafinowych jest stosowana tzw. niskotopliwa parafina, która topi się w temperaturze 56°C. Procedura ta umożliwia w razie konieczności wykorzystanie zabezpieczonego materiału do badań immunohistochemicznych, z wyjątkiem badań, które wymagają zamrożonej, nieutrwalonej tkanki.

Po analizie protokołów z oględzin i otwarcia zwłok wraz z zawartą w nich opinią sądowo-lekarską wybrano 91 przypadków osób zmarłych w następstwie pourazowego krwiaka podtwardówkowego. W czasie badania histopatologicznego sporządzonych do pracy preparatów barwionych H+E zrezygnowano z 7 przypadków, ponieważ wycinki zawierały

tylko strzępy opony twardej, co uniemożliwiało ocenę histopatologiczną jej struktury, a tym samym realizację celu badania.

W wyodrębnionej grupie badawczej było 62 mężczyzn, 18 kobiet i 4 dzieci.

W **tabeli I** przedstawiono podział badanych przypadków na grupy wiekowe.

Wiek	Liczba przypadków
0-10	4
11-20	1
21-30	6
31-40	3
41-50	21
51-60	26
61-70	13
71-80	7
81-90	3

Tab. I. Grupy wiekowe badanych zmarłych z krwiakiem podtwardówkowym.

W **tabeli II** zestawiono okoliczności, w jakich doszło do urazu głowy, który spowodował powstanie krwiaka podtwardówkowego.

Okoliczności doznania urazu głowy	Wypadek		Upadek z/ze					lub inne ^{***} Bójka* lub pobicie**	Nieznane
	drogowy	kolejowy	pozycji stojącej	wysokości	schodów	łóżka w szpitalu	krzesła		
Liczba przypadków	17	1	14	8	10	2	1	7	24

Tab. II. Okoliczności urazu głowy u badanych zmarłych z krwiakiem podtwardówkowym.

- *bójka – czynny zatarg między co najmniej trzema osobami, z których każda jest równocześnie atakującym i broniącym się
- **pobicie – czynny zamach co najmniej dwóch osób na jedną lub więcej osób, gdy role są tak podzielone, że jedna strona atakuje (ewentualnie również broni się), druga zaś tylko się broni.
- ***inne – uraz głowy spowodowany przez napastnika (nie bójka lub pobicie)

W **tabeli III** zestawiono liczbę badanych przypadków z krwiakiem podtwardówkowym, w których zgon nastąpił w poszczególnych dniach w ciągu pierwszych trzech tygodni po doznaniu urazu głowy.

Czas po urazie	Tydzień																				
	I							II							III						
	Dzień							Dzień							Dzień						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Liczba przypadków	9	9	4	10	2	4	2	–	4	2	–	1	1	2	3	2	3	–	3	2	2

Tab. III. Czas zgonu po urazie głowy u badanych zmarłych z krwiakiem podtwardówkowym.

Ponadto w badanym materiale są pojedyncze bądź nieliczne przypadki zgonów w okresie późniejszym, od 23 doby (4 tydzień) do 144 doby (21 tydzień) po urazie głowy. Z tych osób dwie zmarły w czwartym tygodniu (23 i 28 doba), cztery zmarły w piątym tygodniu: jedna w 29, dwie w 32 i jedna w 31 dobie; trzy w siódmym tygodniu, a dwie w 11 tygodniu po urazie głowy. Ponadto pojedyncze osoby zmarły w 8, 9, 12, 13, 14, 16, 19 i 20 tygodniu po urazie.

W **tabeli IV** zestawiono współistniejące z krwiakiem podtwardówkowym inne uszkodzenia w obrębie głowy.

Złamanie kości czaszki		Mózg		Krwiak nadtwardówkowy
mózgoczaszka	twarzoczaszka	stłuczenie i/lub rozerwanie półkul	wylewy w pniu	
54	1	71	40	14

Tab. IV. Inne uszkodzenia wewnątrzczaszkowe współistniejące u badanych zmarłych z krwakiem podtwardówkowym, poza 11 przypadkami izolowanych krwiałków podtwardówkowych.

Analiza protokołów oględzin i otwarcia zwłok oraz wyników badania histopatologicznego, a w przypadkach zgonów w szpitalu lub klinice oryginałów historii choroby wykazała, że 49 osób zmarło tzw. śmiercią mózgową w następstwie urazu czaszki i mózgu, który spowodował powstanie krwiała podtwardówkowego, w części przypadków współistniejącego ze stłuczeniem mózgu i uszkodzeniem pnia mózgu oraz obrzękiem mózgu. Wśród tych osób w jednym przypadku czynnikiem dodatkowym mającym istotny wpływ na zgon był krwotok zewnętrzny z uszkodzonej ściany zatoki strzałkowej jako powikłanie otwartego złamania kości czaszki, a w jednym masywne krwiogłowie wewnętrzne.

Przyczyną śmierci 20 osób była niewydolność oddechowo-krażeniowa w następstwie zapalenia płuc, w tym w jednym przypadku - współistniejącego z zespołem ostrej niewydolności oddechowej typu dorosłych (klinicznie ARDS; zmiany patomorfologiczne DAD – diffuse alveolar damage), a w jednym przypadku przyczyną niewydolności oddechowej był ARDS.

Ponadto wśród późnych zgonów po doznanym urazie głowy przyczyną śmierci siedmiu osób były powikłania zakrzepowo-zatorowe w postaci zatorowości płucnej; trzech – ropne zapalenie opon miękkich mózgu, a jednego – zawał mięśnia serca. W dwóch przypadkach śmierć była następstwem ostrej niewydolności wielonarządowej (w tym w jednym – współistniejącej z posocznicą) oraz w jednym – odmy jamy opłucnej, stanowiącej powikłanie tracheotomii.

IV. METODY

IV.1. Procedura histopatologiczna

Zgodnie z postanowieniem prokuratur, które zleciły wykonanie badań histopatologicznych w przypadkach stanowiących materiał badawczy, w czasie sekcji zwłok wraz z wycinkami z narządów wewnętrznych do badania histopatologicznego zabezpieczono fragment opony twardej z krwiakiem i utrwalono je w oznakowanym pojemniku z wodnym roztworem 8% zbuforowanej formaliny. Po krótkotrwałym utrwaleniu z zabezpieczonych wycinków, w tym także z opony twardej z przylegającym krwiakiem pobrano wycinek grubości ok. 0,4 do 0,5 cm, mieszczący się na szkiełku podstawowym i krótko utrwalono w zmienionym, czystym roztworze wodnym 8% zbuforowanej formaliny. Następnie wycinki, zgodnie z procedurami obowiązującymi w Pracowni Histopatologicznej po wypłukaniu w wodzie bieżącej przeprowadzono w autotechnikonie „Thermoshandon” przez szeregi alkoholu etylowego, acetonu i ksyleny oraz parafinę I i II, po czym zatopiono w bloczki parafinowe i skrojono na mikrotomie saneczkowym „Leica” na skrawki grubości 4 μm , z których część zabarwiono hematoksyliną i eozyną.

IV.2. Procedura immunohistochemiczna dotycząca przeciwciał CD68 i CD34

Do badań immunohistochemicznych wykorzystano wycinki z opony twardej z przylegającym krwiakiem podtwardówkowym, uzyskane z bloczków parafinowych według procedury opisanej w pkt. IV.1. (procedura histopatologiczna). Bloczki parafinowe krojono na mikrotomie saneczkowym firmy „Leica” na skrawki grubości 4 μm , które nanoszono na silanizowane szkiełka podstawowe. Są to szkiełka podstawowe pokryte amorficznym dwutlenkiem krzemu w celu zwiększenia przywieralności skrawka.

Odczyny immunohistochemiczne wykonano we wszystkich badanych przypadkach oraz w materiale kontrolnym.

W celu potwierdzenia prawidłowości wykonania barwienia immunohistochemicznego wykonano barwienia kontrolne na materiale pochodzącym z pracowni biopsyjnej Katedry i Zakładu Patomorfologii AMG. Marker makrofagów – antygen CD68 sprawdzono na odczynowym węźle chłonny z histiocytozą zatok; marker komórek śródbłonna – antygen CD34 sprawdzono na wycinku ze ściany jelita cienkiego.

Aktywność markerów makrofagów i komórek śródbłónka badano metodą immunohistochemiczną przy wykorzystaniu przeciwciał:

1. Monoclonal Mouse Anti-Human **CD68** Clone PG-M1 – firma DAKO; nr kat. M0876 rozcieńczony w stosunku 1:50 (marker makrofagów);
2. Monoclonal Mouse Anti-Human **CD34** Class II Clone QBEud10 – firma DAKO; nr kat. M7165 rozcieńczony w stosunku 1:50 (marker komórek śródbłónka).

Po odparafinowaniu i przeprowadzeniu do wody destylowanej skrawki poddano procedurze odmaskowania w łaźni wodnej, umieszczając je w buforze cytrynianowym (pH-6) i podgrzewając w temperaturze 99°C przez 40 minut. Endogenną peroksydazę blokowano inkubując skrawki w 3% roztworze H₂O₂ w temp. pokojowej przez 10 minut. Inkubację preparatów przeciwciałami pierwotnymi przeprowadzono w temp. pokojowej przez 30 minut. Reakcję barwną uzyskano inkubując skrawki z roztworem czterochlorowodoru 3,3-dwuaminobenzydyny (DAB) w temp. pokojowej przez 5 min. Następnie skrawki podbarwiono hematoksyliną Meyera i zamykano w balsamie kanadyjskim. Między poszczególnymi etapami procedury preparaty płukano dwukrotnie przez 5 minut w roztworze PBS-u (roztwór zbuforowanej soli fizjologicznej).

W celu obiektywizacji oceny zmian ilościowych liczby badanych struktur morfologicznych w krwiaku podtwardówkowym (makrofagi, naczynia i pęczki naczyniowe) w miarę upływu czasu od chwili doznania urazu głowy do śmierci, zastosowano prostą metodę morfometryczną adekwatną do właściwości badanego materiału. Struktury te badano w krwiaku, wewnętrznej części opony twardej oraz torebce krwiaka. W każdym badanym przypadku oglądając w mikroskopie optycznym „Olympus” wycinek z opony twardej mózgu z krwiakiem wyszukano i wybrano pole widzenia, w którym badane elementy morfologiczne były najliczniejsze. Następnie liczono je w wystandaryzowanym polu widzenia o znanej powierzchni i ich liczbę przeliczano na 1 mm² powierzchni. W tym celu posługiwano się komputerem sprzężonym z mikroskopem i programem „Soft Imaging System analySIS Five. Digital Imaging Solutions”.

V. WYNIKI I OMÓWIENIE

W celu ustalenia wieku krwaka podtwardówkowego zbadano zmiany morfologiczne zachodzące w skrzepach krwi, tworzących krwiak podtwardówkowy oraz na jego granicy z powierzchnią wewnętrzną opony twardej mózgu we wczesnej jego fazie oraz w wewnętrznej części opony twardej przylegającej do krwaka, później w miarę upływu czasu także w tworzącej się torebce krwaka podtwardówkowego. W obrębie skrzepów krwi stanowiących krwiak podtwardówkowy (dalej: skrzepów) zwrócono uwagę na zachodzące z czasem zmiany morfologiczne w erytrocytach tworzących krwiak oraz występowanie odczynu z leukocytów, głównie neutrofilów w jego obrębie. Badając zmiany zachodzące w obrębie krwaka i na jego granicy z oponą twardą oceniano makrofagi oraz angiogenezę – proliferację drobnych cienkościennych naczyń, w tym wczesną fazę angiogenezy, w której w naczyniach nie było jeszcze światła. Takie naczynia określano terminem pączki naczyniowe.

V.1. Zmiany w skrzepie krwi, tworzącym krwiak podtwardówkowy, w wewnętrznej części opony twardej i w torebce krwaka podtwardówkowego a czas przeżycia po urazie głowy

V.1.1. Erytrocyty i leukocyty-neutrofile

W **tabeli V** zestawiono charakter i lokalizację zmian morfologicznych dotyczących erytrocytów i odczynu leukocytnego, głównie z neutrofilów w obrębie skrzepu krwi tworzącego krwiak podtwardówkowy, w zależności od czasu jaki upłynął od doznania urazu głowy do śmierci.

Dzień	L. przypadków	Erytrocyty												Leukocyty				
		Lokalizacja w krwiaku												Lokalizacja w krwiaku				
		„Świeże”				Ulegające hemolizie				Uległe hemolizie								
		c	zcz	s	wcz	c	zcz	s	wcz	c	zcz	s	wcz	c	zcz	s	wcz	
1	9	9					1								1	1	1	
2	9	6		2			4	2		1					1	3	1	2
3	5	2		2		1	3										2	
4	10	4		1	3	4	4			1	1				2		2	5
5	2	2		1		2											1	1
6	4	1		1	2	2	2	1	1								1	1
7	2	1		1		2												1
9	4			1		3				1	1							
10	2					2				1								
12	1				1	1												
13	1			1	1	1												
14	2			1		2												
15	3				1					2								
16	2				1	1				1						1		
17	3				1	3				3						1		
19	3				2					2								
20	2				1	1				1								
21	2				2	1				1					1	*		
23	1				1	1				1								
28	1				1	1												
29	1				1	1												
31	1					1												
32	2				1	1												
44	1					1												
48	1				1	1												
49	1				1	1												
50	1																	
57	1					1												

Tab.V. Charakter i lokalizacja zmian morfologicznych w krwiaku podtwardówkowym – erytrocyty i leukocyty – neutrofile a czas przeżycia po urazie

Oznaczenie skrótów:

- * – mikroropnie
- c – cały krwiak
- zcz – zewnętrzna część krwiaka (od pajęczynówki)
- s – środkowa część krwiaka
- wcz – wewnętrzna część krwiaka (od opony twardej)

Badanie zmian morfologicznych zachodzących w obrębie skrzepów krwi, tworzących krwiak podtwardówkowy było możliwe u zmarłych w okresie od 1 do 49 doby oraz w 57

dobie po urazie głowy, ponieważ preparaty histologiczne osób zmarłych w 50 dobie oraz w okresie od 72 do 144 doby po urazie głowy nie zawierały skrzepów krwi. Jedynym elementem strukturalnym świadczącym o istnieniu krwiaka była w nich torebka krwiaka podtwardówkowego, wskazująca na przewlekły jego charakter.

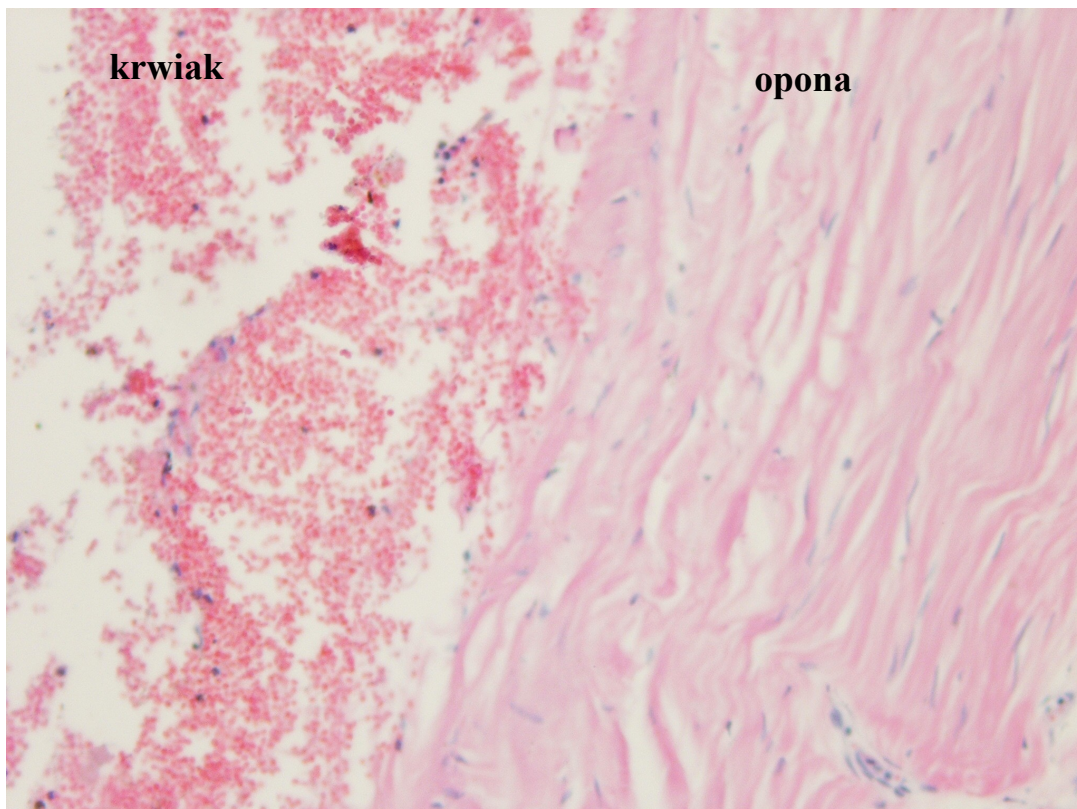
Analizując zmiany morfologiczne w krwiaku, zachodzące w miarę upływu czasu od urazu głowy oceniono zmiany morfologiczne w erytrocytach i obecność odczynu z leukocytów, głównie z neutrofilów oraz ich lokalizację w obrębie krwiaka w stosunku do powierzchni opony twardej.

Stwierdzono, że skrzepy tworzące krwiak były utworzone z mieszaniny erytrocytów „świeżych”, ulegających hemolizie i uległych hemolizie w różnych proporcjach.

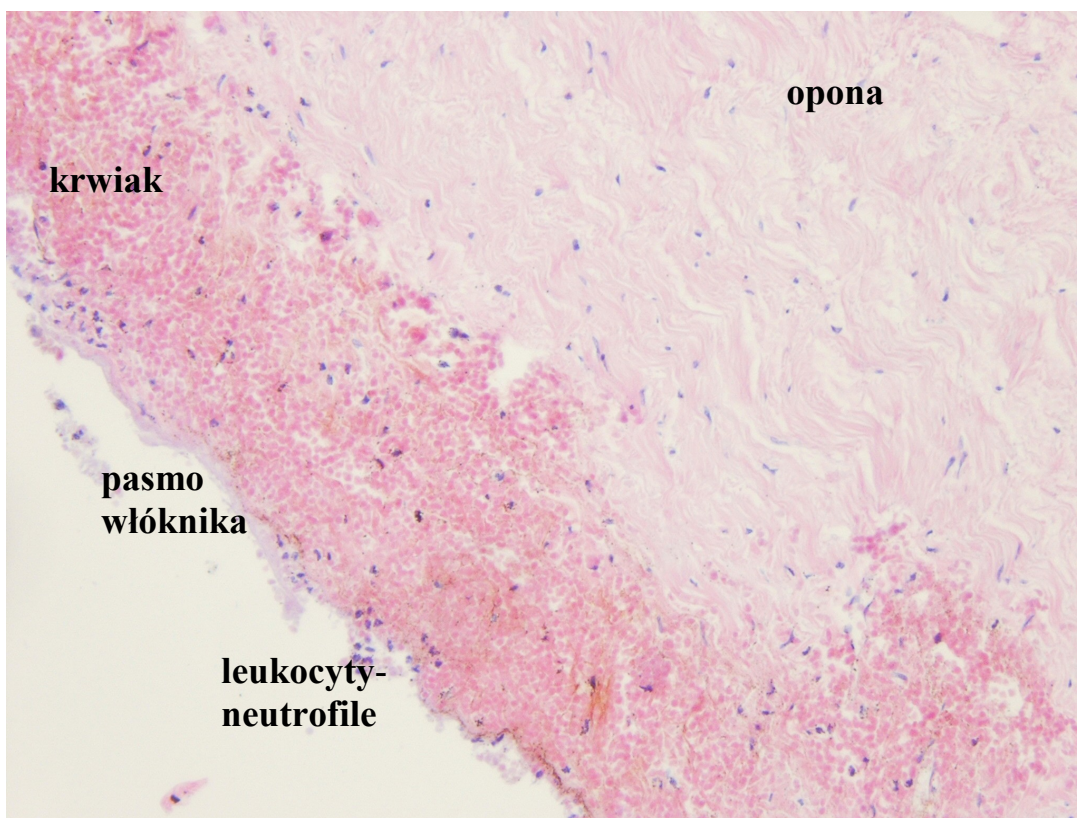
Erytrocyty „świeże” to dobrze zachowane, wyraźnie okonturowane, intensywnie czerwono zabarwione krwinki czerwone w związku z dużą zawartością w nich hemoglobiny. (fot. 1, 2, 3, 5)

Erytrocyty ulegające hemolizie to krwinki czerwone o jasnoczerwonym, brudnoczerwonym lub brudnoróżowym zabarwieniu i zatartych, niewidocznych konturach (granicach) błon komórkowych, z reguły nie dające się wyróżnić wśród czerwonego tła w związku z przejściem hemoglobiny do przestrzeni pozaerytrocytarnej. (fot. 3, 4, 5, 6, 7)

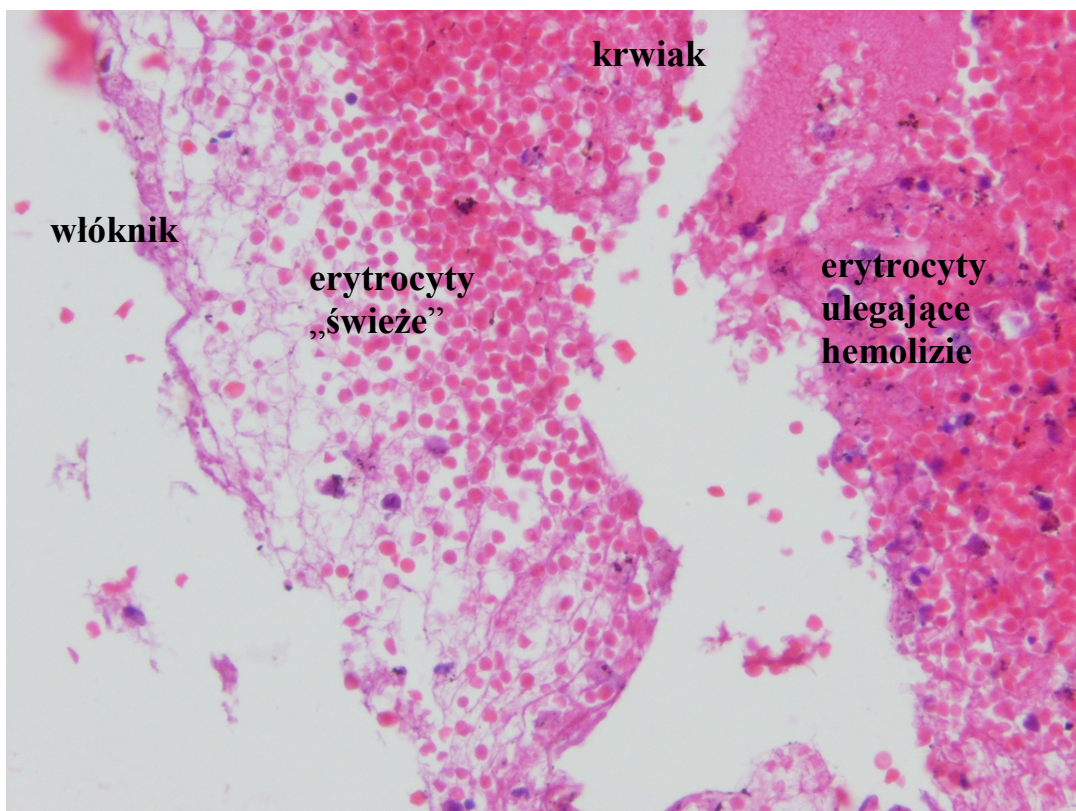
Natomiast erytrocyty uległe hemolizie to krwinki czerwone całkowicie pozbawione hemoglobiny, widoczne jako szaroblado-czerwone lub szare pierścienie wielkości erytrocyta tzw. cienie erytrocytów. (fot. 7, 8)



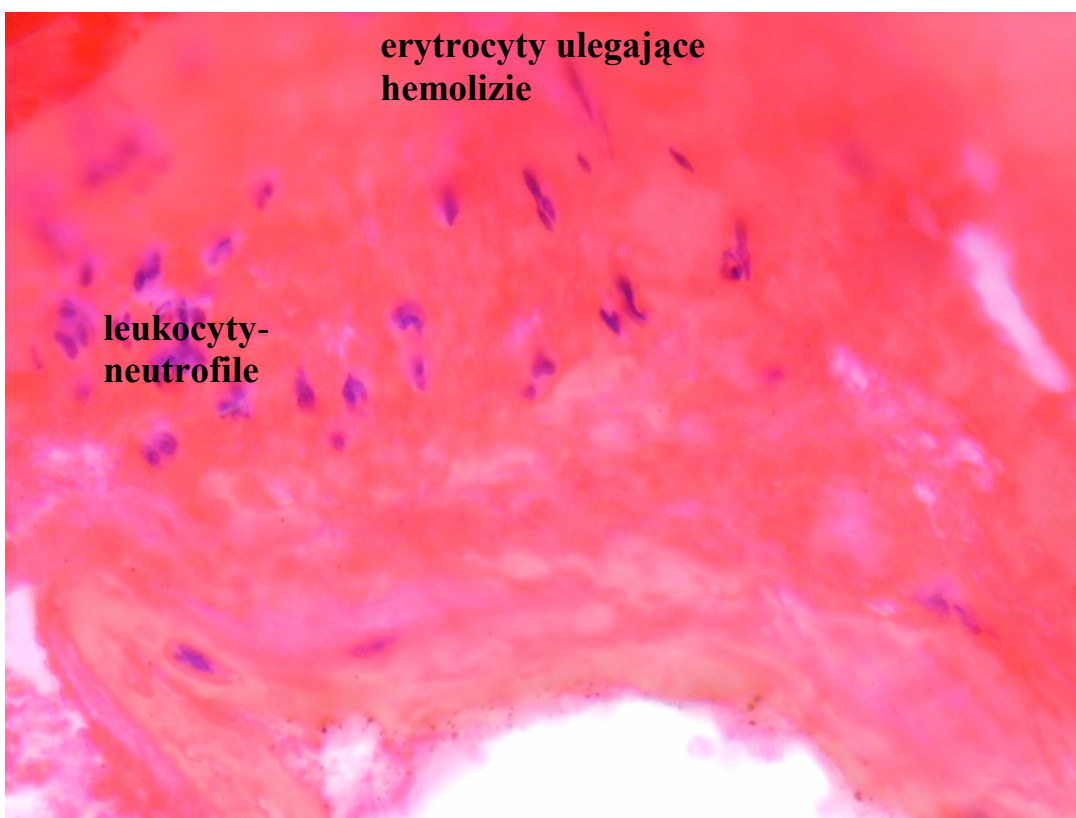
Fot.1. Erythrocyty „świeże” w krwiaku. K lat 43; upadek z pozycji stojącej; zgon w ciągu 1 doby. (H+E; 100x)



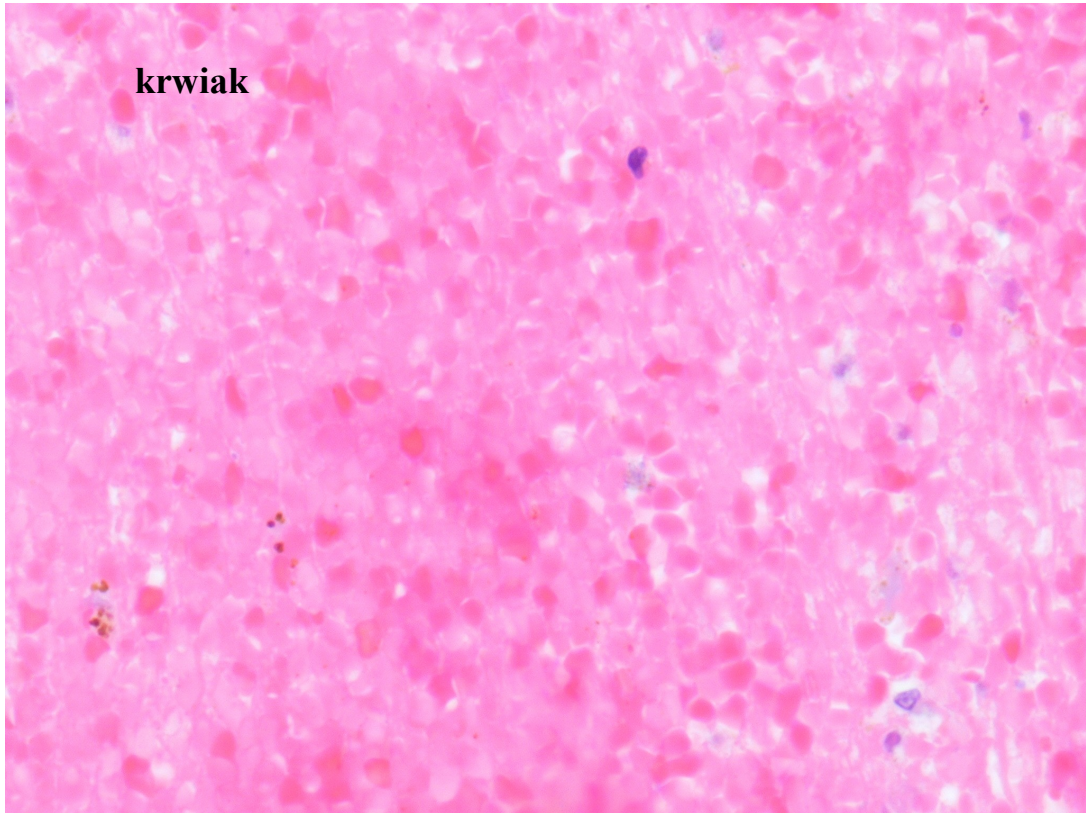
Fot.2. Erythrocyty „świeże” w krwiaku. Kobieta lat 45; upadek z pozycji stojącej; zgon w 1 dobie. (H+E; 40x)



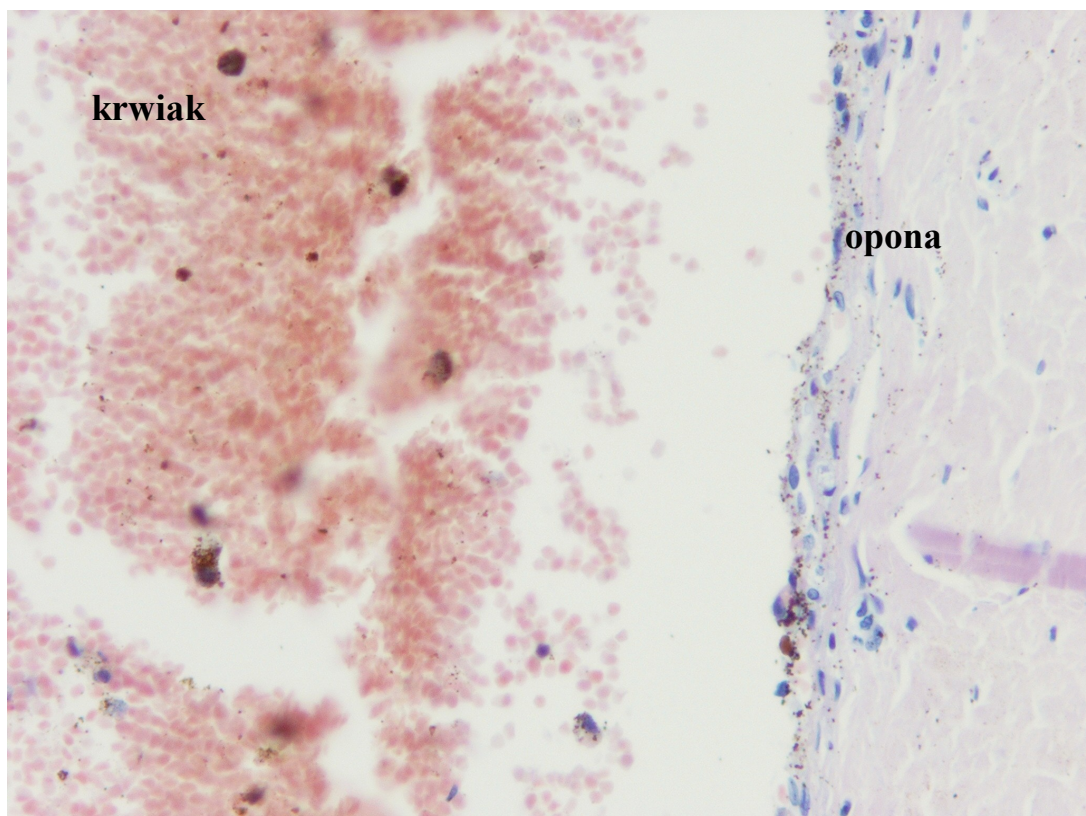
Fot.3. Erythrocyty „świeże” i ulegające hemolizje w krwiaku. M lat 29; wypadek drogowy; zgon w 4 dobie po urazie głowy. (H+E; 200x)



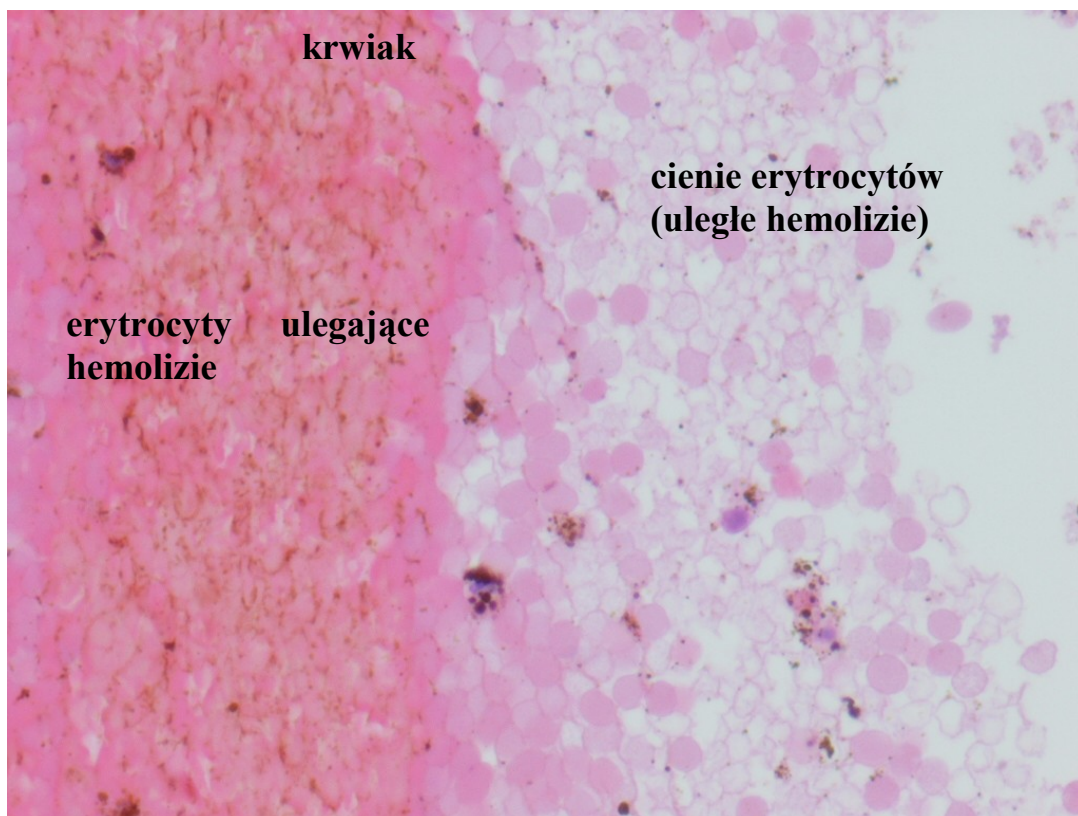
Fot.4. Erythrocyty ulegające hemolizje. Dziecko płci męskiej lat 6; upadek z krzesła; zgon w 6 dobie. (H+E; 400x)



Fot.5. Krwiak: erythrocyty ulegające hemolizacji i pojedyncze „świeże”. M lat 60; upadek z pozycji stojącej; zgon w 4 dobie po urazie głowy. (H+E;400x)



Fot.6. Erythrocyty ulegające hemolizacji. K lat 70; upadek z pozycji stojącej; zgon w 2 dobie. (H+E; 100x)



Fot.7. Erythrocyty ulegające i uległe hemolizacji (cienie). M lat 54; upadek z wysokości; zgon w 4 dobie. (H+E; 400x)



Fot.8. Erythrocyty uległe hemolizacji. K lat 69; upadek z pozycji stojącej; zgon w 2 dobie. (H+E; 400x)

U ośmiu z 9 osób zmarłych w pierwszej dobie po doznaniu urazu głowy krwiałki podtwardówkowe stanowiły skrzepy krwi w całości utworzone ze „świeżych” erytrocytów. Jedynie w jednym przypadku tej grupy w części zewnętrznej, zwróconej do powierzchni pajęczynówki, występowały ogniska erytrocytów ulegających hemolizie.

Od 2 doby po urazie głowy stwierdzono zmniejszanie się zawartości „świeżych” erytrocytów w skrzepach, które u zmarłych w okresie od 2 do 14 doby po urazie głowy (z wyjątkiem 10 i 12 doby) występowały głównie w części centralnej skrzepu tworzącego krwiałki podtwardówkowe. Natomiast w części wewnętrznej skrzepów zwróconej do powierzchni wewnętrznej opony twardej świeże erytrocyty obserwowano u osób, które żyły do 49 dnia po urazie głowy.

Obecności „świeżych” erytrocytów o takiej lokalizacji nie stwierdzano w pojedynczych przypadkach osób zmarłych w 31 i 44 dobie po urazie głowy.

Występowanie „świeżych” erytrocytów w części wewnętrznej krwiałki, zwróconej do powierzchni wewnętrznej opony twardej wykazuje korelację z przyleganiem krwiałki do tworzącej się od 9 doby po urazie części zewnętrznej torebki krwiałki podtwardówkowej, zawierającej liczne, cienkościenne, często zatokowato poszerzone, przekrwione naczynia krwionośne.

W badanym materiale w skrzepach krwi tworzących krwiałki podtwardówkowe oprócz „świeżych” erytrocytów często stwierdzano obecność erytrocytów ulegających hemolizie w różnym stopniu nasilenia, przejawiającej się różną barwliwością krwinek czerwonych w zależności od zawartości w nich hemoglobiny oraz różną wielkością i lokalizacją tak zmienionych erytrocytów w skrzepie.

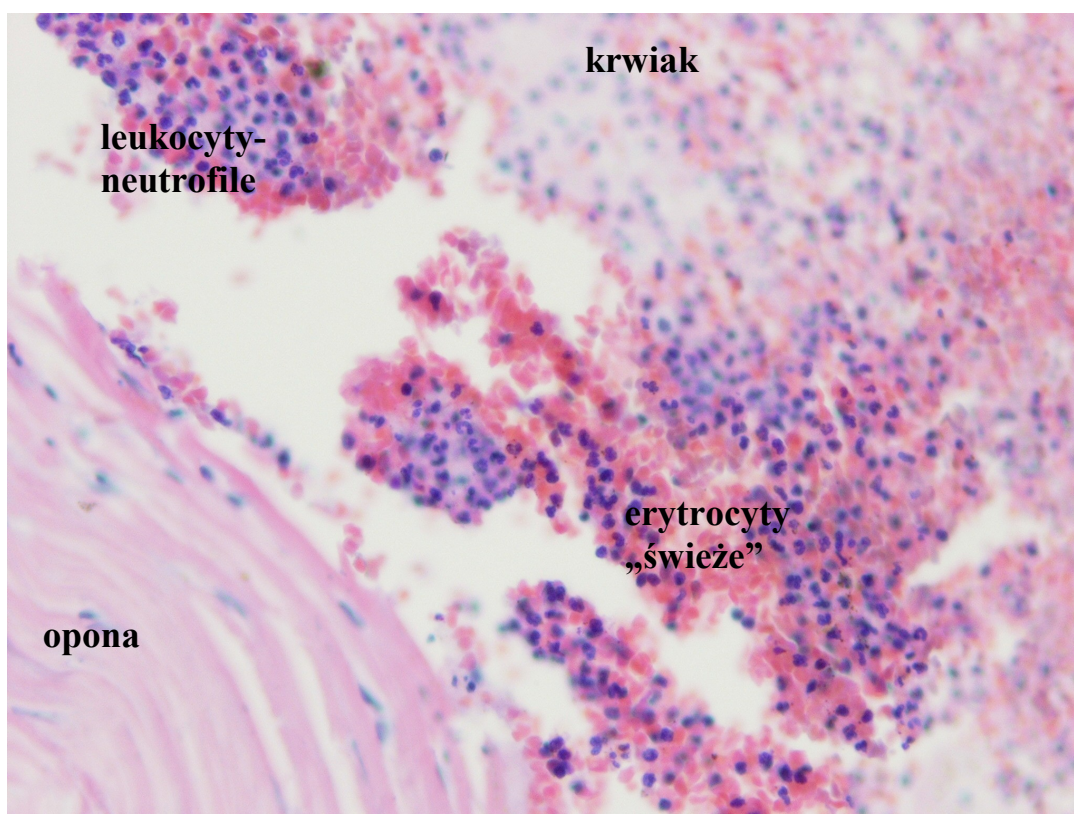
Począwszy od 7 doby po urazie głowy do 57 doby prawie we wszystkich przypadkach skrzepy krwi tworzące krwiałki podtwardówkowe niemal w całości były utworzone z ulegających hemolizie erytrocytów z wyjątkiem przypadków osób zmarłych w 15 i 19 dobie po urazie, a u części zmarłych w tym okresie skrzepy tworzyły wylugowane erytrocyty. Wylugowanych erytrocytów nie stwierdzono u osób zmarłych w 12, 13, 14, 28 dniu oraz w okresie od 29 do 57 dni po urazie głowy.

Na uwagę zasługuje stwierdzenie współistnienia krwiałek utworzonych z erytrocytów ulegających hemolizie i/lub erytrocytów uległych hemolizie z występującymi w warstwie wewnętrznej przyoponowej krwiałki erytrocytami „świeżymi”. Taką budowę skrzepów krwiałki obserwowano w badanym materiale w przypadkach od 12 do 49 dnia po urazie głowy z wyjątkiem zmarłych w 14, 31 i 44 dobie po urazie głowy, a więc w przypadkach z tworzącą się torebką krwiałki podtwardówkowej.

W skrzepach krwi u osób zmarłych w okresie od 2 do 6 doby po urazie głowy stwierdzono chaotyczną, nieuporządkowaną ich budowę. Było to spowodowane chaotycznym układem i różną wielkością ww. trzech typów erytrocytów („świeże”, ulegające i uległe hemolizie) w skrzepie.

Nacieki z leukocytów, z przewagą neutrofilów w skrzepie głównie stwierdzono w grupie osób zmarłych w ciągu pierwszego tygodnia po urazie głowy, przy czym najczęściej występowały one u zmarłych w ciągu 2 do 4 doby po urazie (fot. 9).

W okresie późniejszym obecność leukocytów głównie neutrofilów w skrzepie stwierdzono jedynie w pojedynczych przypadkach zmarłych w 16, 17 i 21 doby po urazie głowy, przy czym u osoby zmarłej w 21 doby nacieki te tworzyły mikroropnie.



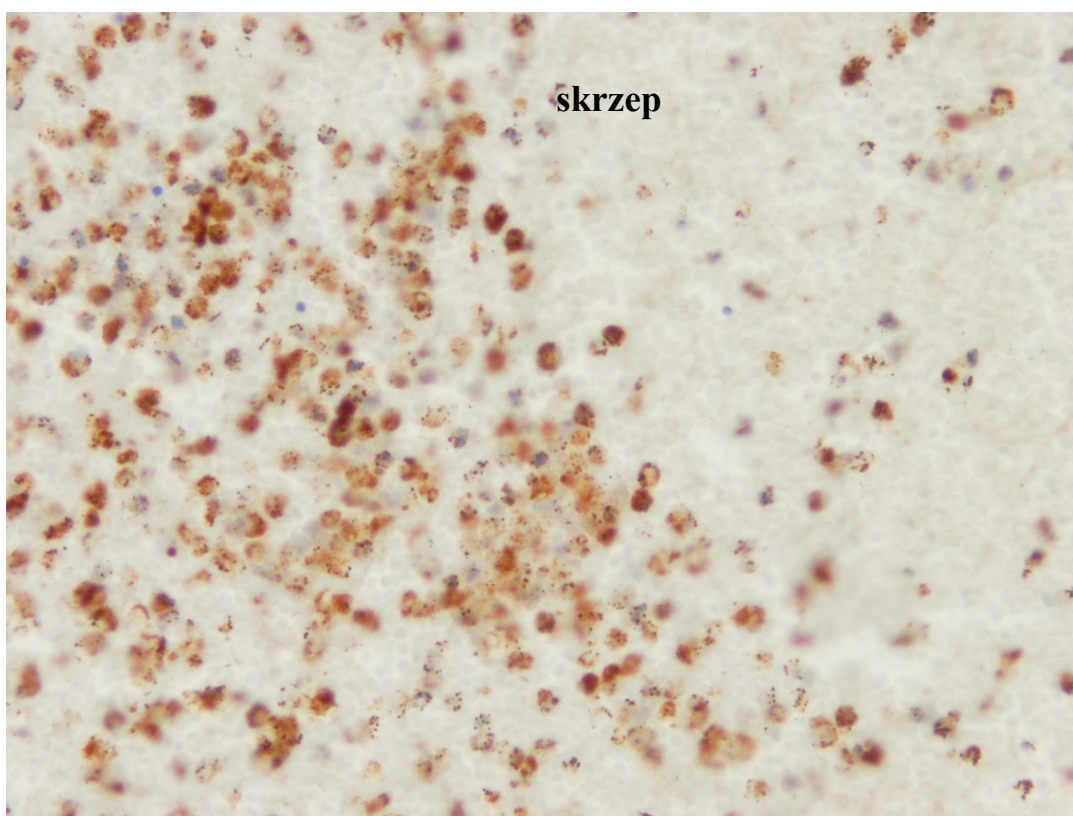
Fot.9. Naciek z leukocytów w krwiaku. M lat 53; upadek ze schodów; zgon w ciągu 1 doby. (H+E; 200x)

Odstąpiono od badania złogów włókniaka w krwiakach podtwardówkowych, bowiem włóknik w różnej ilości zawsze wchodzi w skład skrzepów krwi.

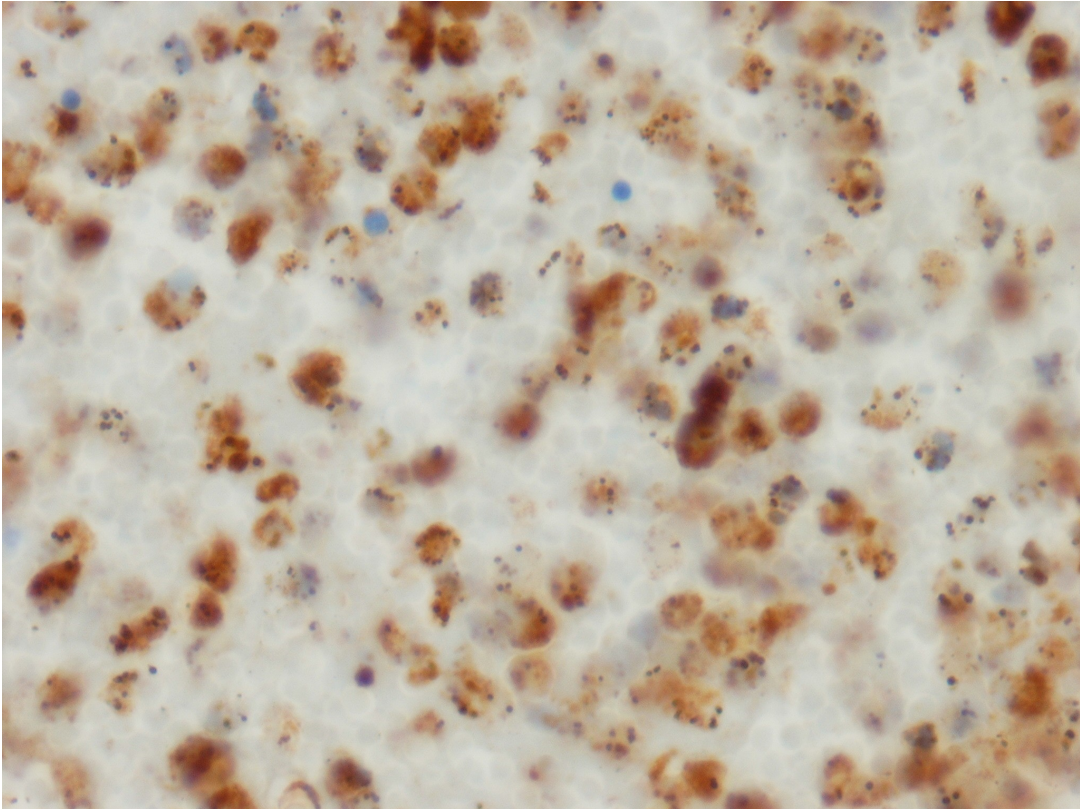
V.1.2. Makrofagi

W tabeli A zawartej w Aneksie do pracy zestawiono wyniki badania morfometrycznego liczby makrofagów przypadających na 1 mm² powierzchni krwiaka, wewnętrznej części opony twardej mózgu i/lub torebki krwiaka podtwardówkowego, w zależności od czasu przeżycia po urazie głowy, będącym przyczyną krwiaka podtwardówkowego.

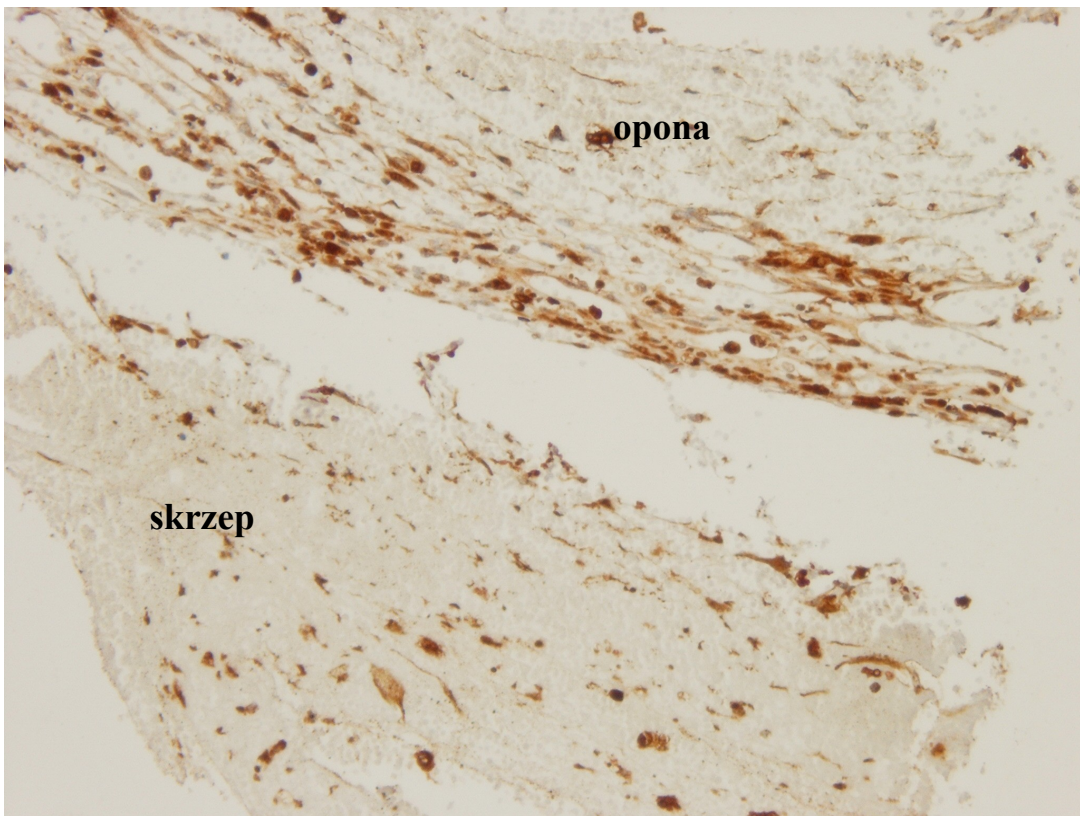
Fotografie 10, 11, 12 i 13 przedstawiają makrofagi w skrzepie, w części wewnętrznej opony twardej mózgu i w torebce krwiaka podtwardówkowego w barwieniu immunohistochemicznym markera CD68. Fotografie 14 i 15 przedstawiają erytrofagi tj. makrofagi zawierające w cytoplazmie sfagocytowane wynaczone erytrocyty.



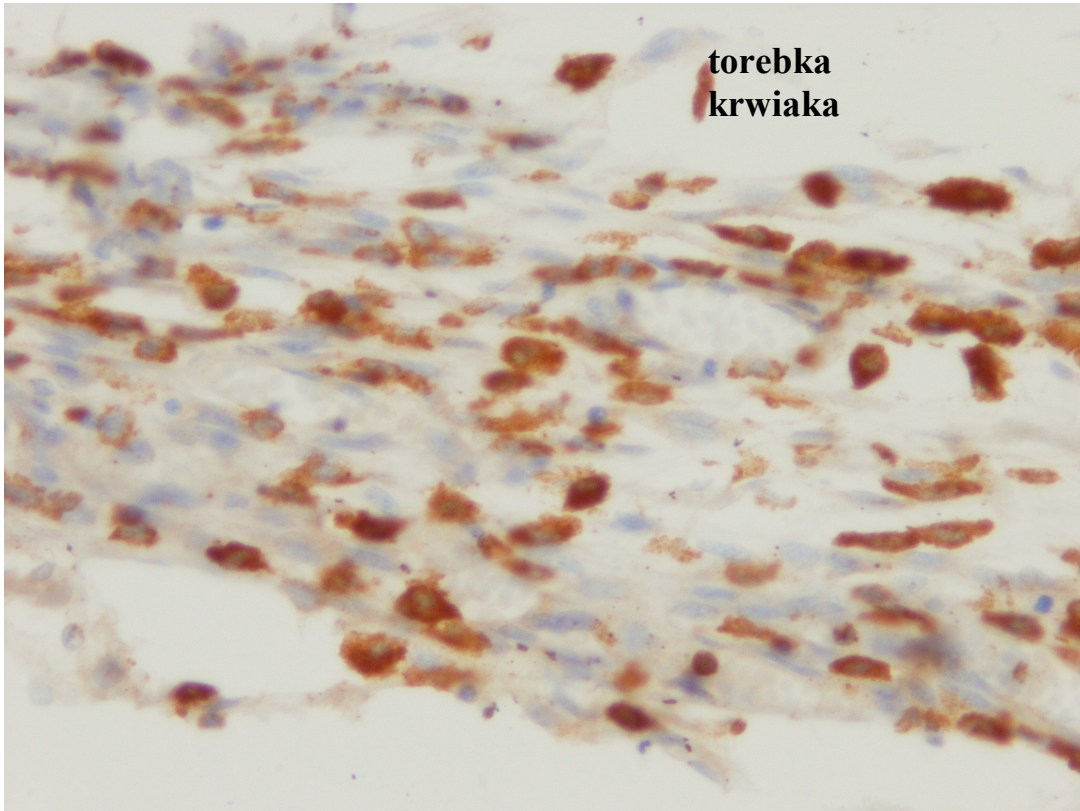
Fot.10. Makrofagi w skrzepie. M lat 48; upadek ze schodów; zgon w 13 dobie. (CD68+; 200x)



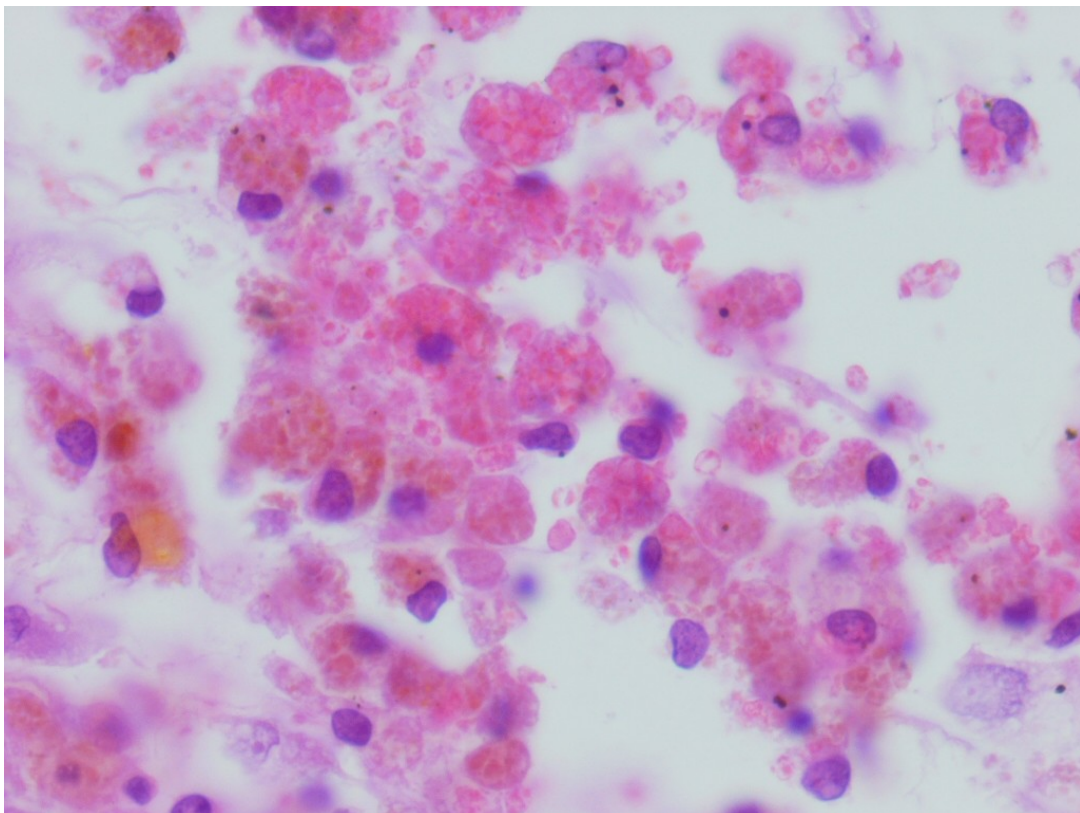
Fot.11. Jak fot.10. 400x.



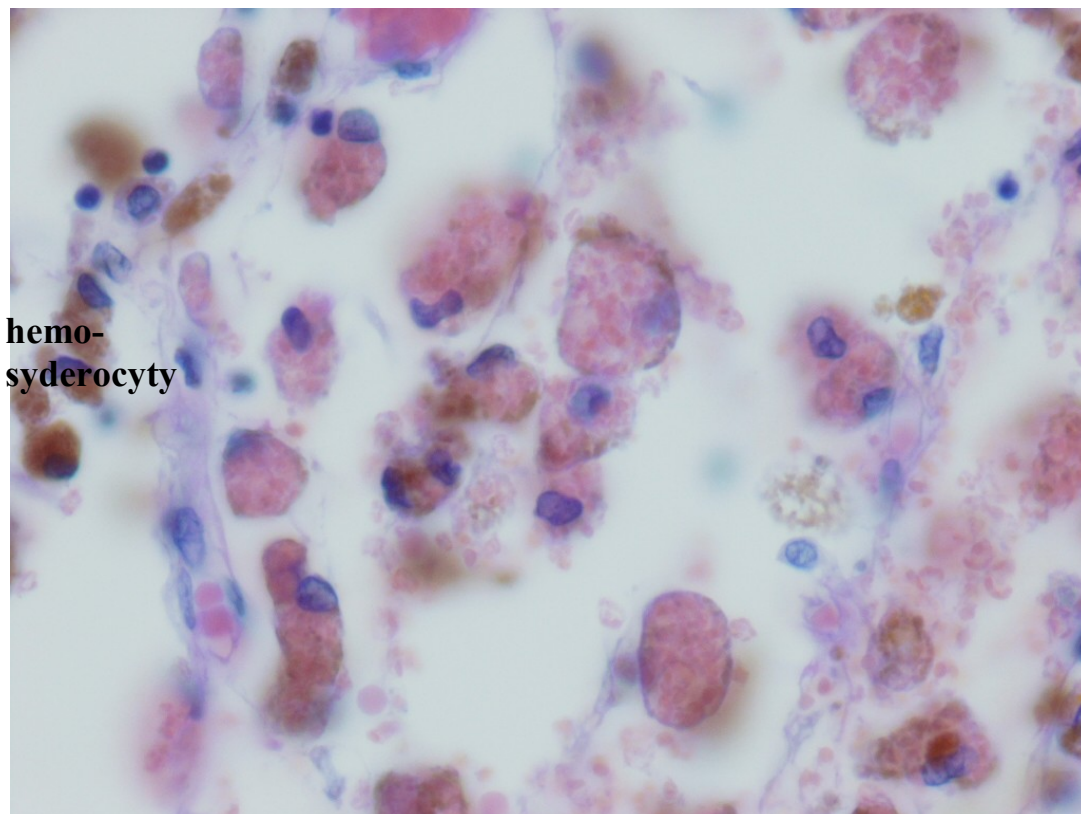
Fot.12. Makrofagi w skrzepie i oponie twardej. M lat 30; okoliczności urazu nieznane; zgon w 1 dobie. (CD68+; 100x)



Fot.13. Torebka krwiaka: ziarnina z dużą ilością makrofagów. M lat 60; upadek z wysokości; zgon w 9 dobie. (CD68+; 400x)



Fot.14. Erytrocyty wewnątrz makrofagów – erytrofagi. M lat 56; okoliczności nieznane; zgon w 20 dobie. (H+E; 400x)



Fot.15. Erytrocyty wewnątrz makrofagów – erytrofagi i hemosyderocyty. M lat 52; upadek ze schodów; zgon w 57 dobie. (H+E; 400x)

W grupie osób zmarłych w poszczególnych dobach w ciągu pierwszego tygodnia po urazie głowy wydzielono dwie podgrupy ze względu na wyniki badania morfometrycznego liczby makrofagów. Jedną podgrupę stanowiły osoby, u których dokonano interwencji neurochirurgicznej w postaci kraniotomii lub kraniektomii, w czasie których ewakuowano krwiak i zaopatrzone źródło krwawienia, drugą podgrupę stanowiły osoby, u których nie dokonywano interwencji neurochirurgicznej. Przyczyną wyróżnienia dwóch podgrup w badanym materiale z tego okresu były różnice w zawartości makrofagów, dotyczące przypadków o takim samym czasie przeżycia.

Wyniki badań morfometrycznych makrofagów w skrzepie i/lub torebce krwiaka oraz w wewnętrznej części opony twardej mózgu w poszczególnych dobach po urazie przedstawiono na wykresach umieszczonych w niniejszym podrozdziale pracy. (ryc. 2, 3, 4, 5)

W czasie badania morfometrycznego liczone komórki z dodatnim odczynem barwnym markera CD68 w cytoplazmie, w których można było wyróżnić jądro i cytoplazmę. Brano pod uwagę także komórki, w których cytoplazmie stwierdzano także obecność hemosyderyny

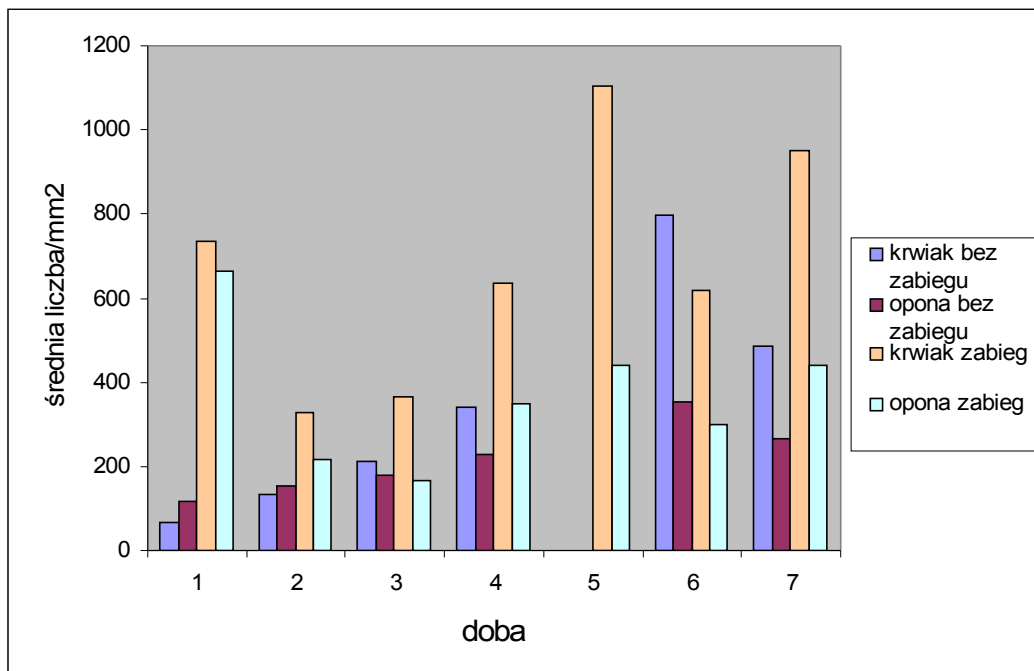
oprócz dodatniego odczynu markera CD68 oraz komórki z dużą zawartością hemosyderyny w cytoplazmie, uniemożliwiająca ocenę markera CD68.

Ryciny 2, 3 i 4 zawierają zestawienie średniej liczby makrofagów w skrzepie i/lub torebce krwaka podtwardówkowego oraz wewnętrznej części opony twardej mózgu u osób zmarłych w poszczególnych dobach w ciągu pierwszych trzech tygodni po doznanym urazie głowy.

Rycina 5 zawiera zestawienie liczby makrofagów w skrzepie i/lub torebce wewnętrznej krwaka oraz wewnętrznej części opony twardej mózgu w pojedynczych przypadkach osób zmarłych w 23 do 144 doby (do 5 miesiąca) po urazie.

Wśród zmarłych w ciągu pierwszego tygodnia po doznanym urazie głowy zwraca uwagę duża różnica między liczbą makrofagów w krwaku i w wewnętrznej części opony twardej mózgu u osób, u których miała miejsce interwencja neurochirurgiczna w porównaniu z osobami bez przebytego zabiegu. Makrofagi zarówno w skrzepie, jak i w wewnętrznej części opony twardej mózgu występowały u zmarłych w ciągu pierwszej doby po urazie, przy czym już wówczas występuje duża różnica między przypadkami z interwencją neurochirurgiczną a przypadkami bez takiej interwencji. W przypadkach bez zabiegu neurochirurgicznego do drugiej doby obserwowano większą zawartość makrofagów w wewnętrznej części opony twardej niż w krwaku, a od trzeciej do siódmej doby zawartość makrofagów w krwaku była znacznie większa niż w wewnętrznej części opony twardej mózgu.

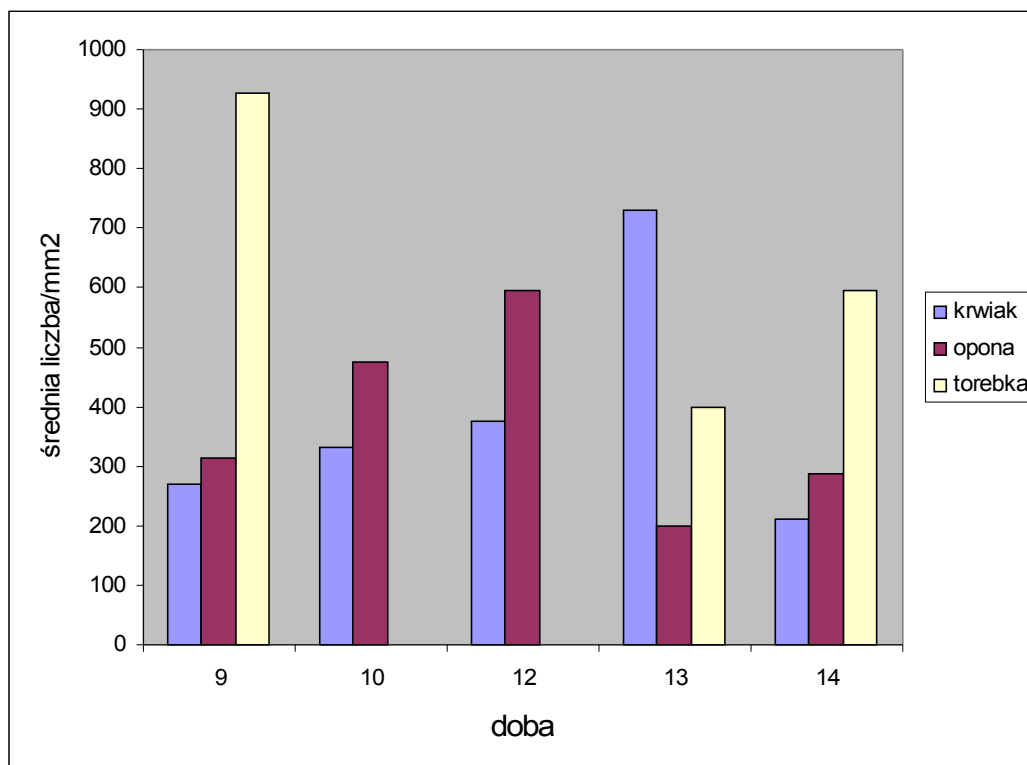
W podgrupie osób, u których wykonano zabieg neurochirurgiczny od pierwszej doby po urazie obserwowano obecność makrofagów zarówno w skrzepie, jak i wewnętrznej części opony twardej, przy czym przez cały czas ilość makrofagów w skrzepie była większa. Szczególnie dużą różnicę stwierdzono u zmarłych w ciągu piątej do siódmej doby po urazie. Zwraca uwagę wyraźna różnica zawartości makrofagów w krwaku i w wewnętrznej części opony twardej mózgu między osobami bez zabiegu i po zabiegu neurochirurgicznym, z przewagą u osób po zabiegu (ryc. 2).



Ryc.2. Średnia liczba makrofagów w krwaku i wewnętrznej części opony twardej mózgu u osób zmarłych w **pierwszym** tygodniu po urazie głowy przy uwzględnieniu interwencji neurochirurgicznej.

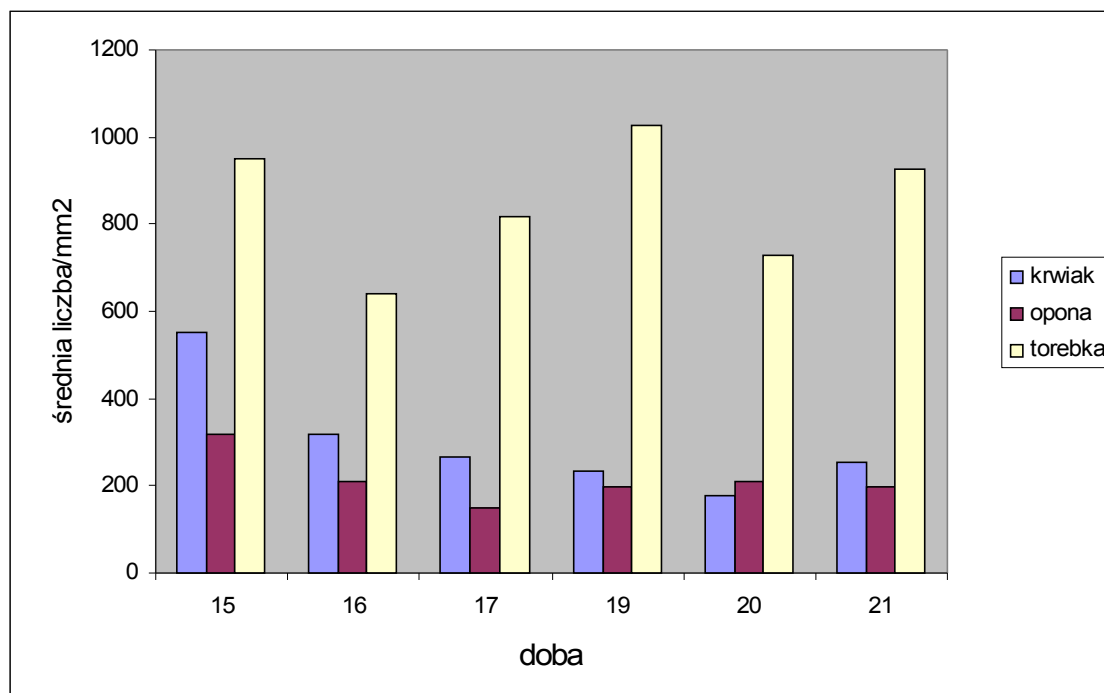
W grupie osób zmarłych w ciągu drugiego tygodnia po urazie głowy (ryc. 3) we wszystkich przypadkach poza jednym wykonano zabieg neurochirurgiczny. W grupie tej nie było ani jednego przypadku osoby zmarłej w 8 ani w 11 dobie. U wszystkich zmarłych z wyjątkiem osoby zmarłej w trzynastej dobie po urazie stwierdzano większą zawartość makrofagów w wewnętrznej części opony twardej niż w krwaku, podobnie jak w grupie zmarłych w pierwszym tygodniu wśród zmarłych w pierwszej do czwartej doby po urazie. Przyczyna odmiennej liczby makrofagów w krwaku i wewnętrznej części opony twardej mózgu u zmarłego w trzynastej dobie po urazie jest niejasna. W przypadku tym nie wykonano zabiegu neurochirurgicznego, jak również nie stwierdzono odczynu zapalnego w oponie twardej i oponach miękkich mózgu.

W części przypadków (wśród zmarłych w drugim tygodniu po urazie) stwierdzono obecność cienkiej torebki na granicy krwaka i wewnętrznej powierzchni opony twardej mózgu. Torebki nie stwierdzono w przypadkach osób zmarłych w 10 i 12 dobie po urazie. We wszystkich przypadkach w obrębie torebki krwaka stwierdzano obecność licznych makrofagów, która w 14 dobie znacznie przekraczała ich zawartość w krwaku i wewnętrznej części opony twardej mózgu.



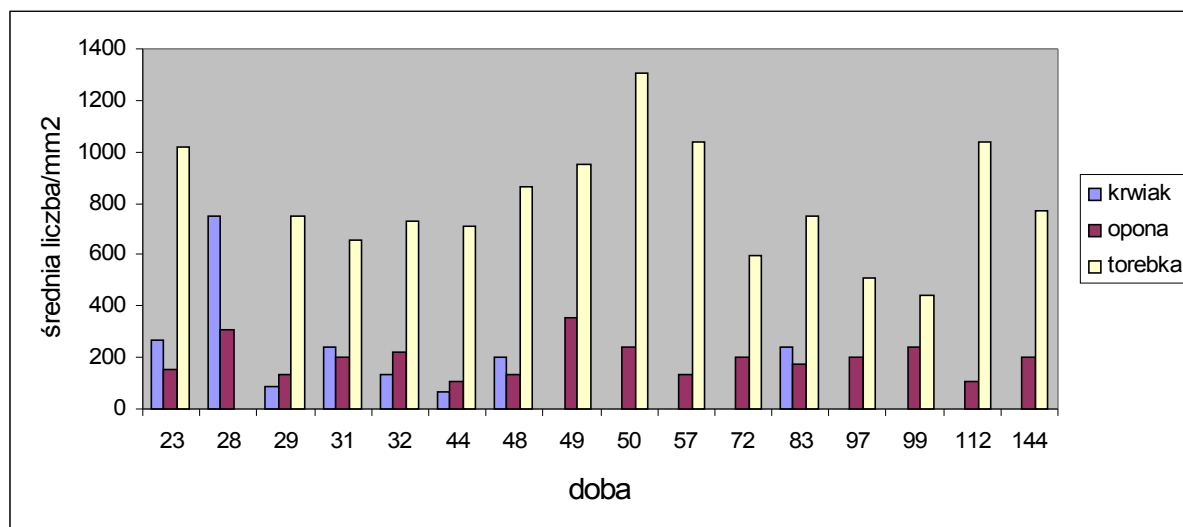
Ryc.3. Średnia liczba makrofagów w krwiaku, torebce krwiaka i wewnętrznej części opony twardej mózgu u osób zmarłych w **drugim** tygodniu po urazie głowy.

U wszystkich zmarłych w ciągu trzeciego tygodnia po urazie głowy (ryc. 4) stwierdzono obecność torebki na granicy krwiaka i opony twardej mózgu. Zawartość makrofagów była większa w krwiaku niż w wewnętrznej części opony twardej mózgu z wyjątkiem zmarłych w 20 dobie po urazie. U wszystkich zmarłych stwierdzono bardzo liczne makrofagi w torebce krwiaka, których ilość bardzo znacznie przewyższała ich liczbę w krwiaku i w wewnętrznej części opony twardej mózgu.



Ryc.4. Średnia liczba makrofagów w krwiaku, torebce krwiaka i wewnętrznej części opony twardej mózgu u osób zmarłych w **trzecim** tygodniu po urazie głowy.

Grupę osób zmarłych w okresie od 23 do 144 dnia po urazie głowy stanowią pojedyncze przypadki osób zmarłych w wymienionych na **rycinie 5** poszczególnych dniach. U wszystkich zmarłych stwierdzono obecność torebki krwiaka zawierającej bardzo dużą liczbę makrofagów, największą u zmarłego w 50 dobie po urazie. Krwiak stwierdzano jedynie u zmarłych do 48 doby po urazie, a resztki krwiaka stwierdzono u zmarłego w 83 dobie po urazie. W pozostałych przypadkach (zmarli w 49, 50, 57, 72, 97, 99, 112 i 144 dni po urazie) nie stwierdzono obecności krwiaka. W oponie twardej stwierdzano jedynie ogniskowo skąpe makrofagi.



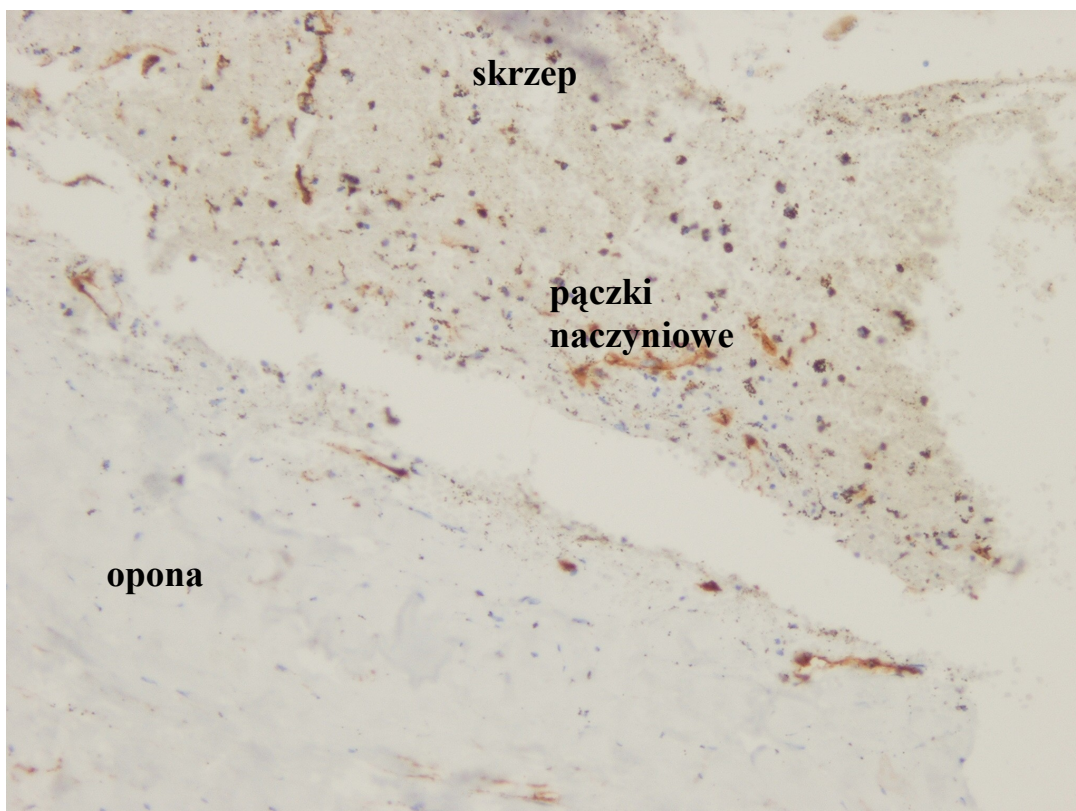
Ryc.5. Liczba makrofagów w krwiku, torebce krwiaka i wewnętrznej części opony twardej mózgu u osób zmarłych od 23 doby do 144 doby po urazie głowy.

Z analizy wyników badania makrofagów w poszczególnych elementach krwiaka podtwardówkowego wynika, że liczba makrofagów w skrzepie, w wewnętrznej części opony twardej mózgu oraz wytworzonej torebce krwiaka była różna w każdym z badanych przypadków i nie wykazywała związku z czasem, jaki upłynął od urazu głowy do śmierci.

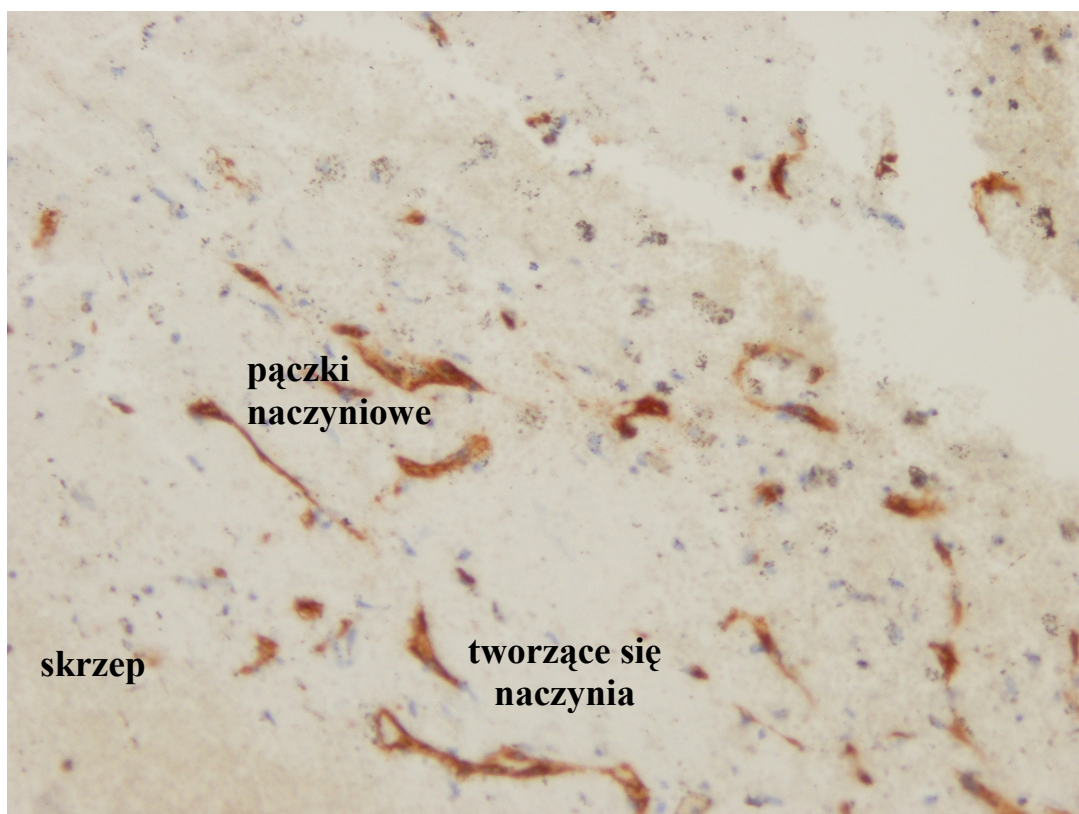
V.1.3. Angiogeneza

W tabeli B zawartej w aneksie do pracy zestawiono wyniki badania morfometrycznego proliferacji naczyń krwionośnych przypadającej na 1 mm² powierzchni krwiaka i/lub torebki krwiaka podtwardówkowego w zależności od czasu przeżycia po urazie głowy, którego następstwem był krwiatek podtwardówkowy. Ponadto tabela ta zawiera zestawienie wyników badania morfometrycznego liczby pączków naczyniowych w krwiku oraz torebce krwiaka.

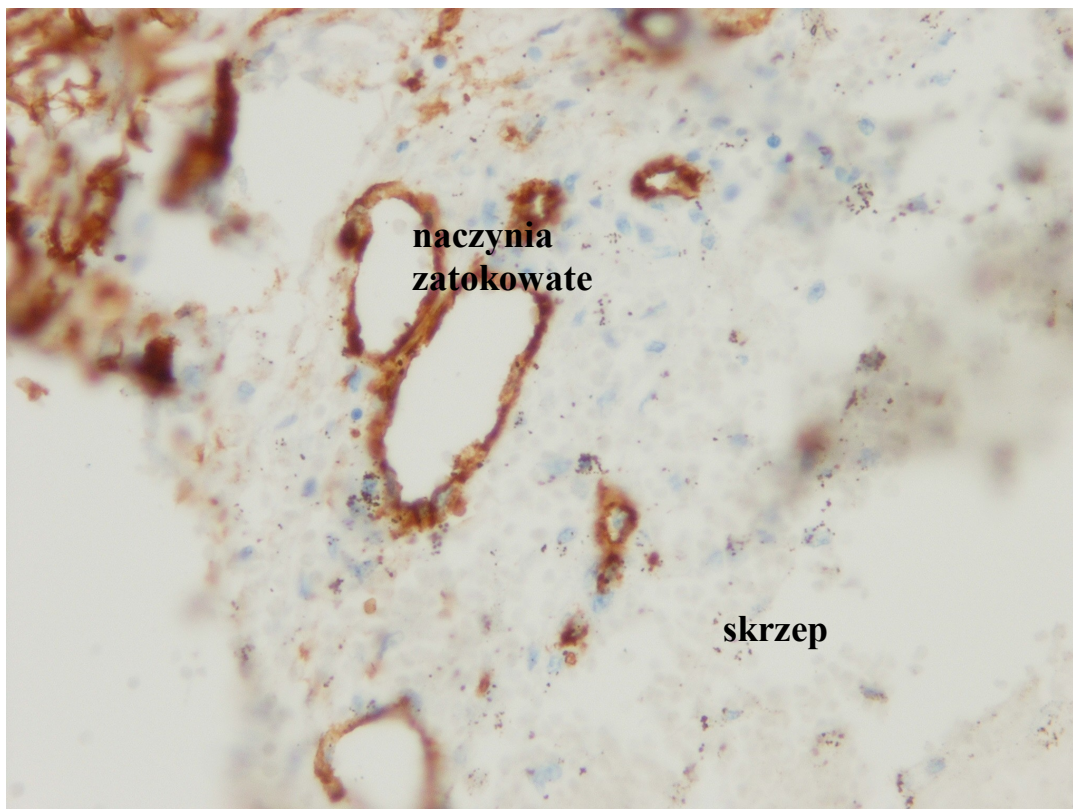
Komórki z dodatnim odczynem immunohistochemicznym na antygen CD34 interpretowano jako komórki śródbłonna. Pączki naczyniowe to różnej długości pasma komórek z dodatnim odczynem histochemicznym na antygen CD34 bez wyraźnych granic międzykomórkowych, które w odróżnieniu od naczyń nie posiadały światła. Na fotografiach 16 i 17 widoczne są pączki naczyniowe i tworzące się naczynia w skrzepie, natomiast na fot. 18 – naczynia zatokowate w skrzepie.



Fot.16. Pączki naczyniowe w skrzepie. M lat 53; upadek z wysokości; zgon w 5 dobie. (CD34+; 100x)



Fot.17. Pączki naczyniowe i tworzące się naczynia w skrzepie. M lat 67; upadek ze schodów; zgon w 12 dobie. (CD34+; 200x)



Fot.18. Skrzep: naczynia zatokowate. M lat 59; upadek z pozycji stojącej; zgon w 10 dobie po urazie. (CD34+; 200x)

Nie stwierdzono istotnej różnicy w liczbie naczyń w wewnętrznej części opony twardej mózgu w miarę upływu czasu od chwili doznania urazu głowy, który spowodował powstanie krwiaka podtwardówkowego do śmierci.

W ocenie histopatologicznej stopień unaczynienia wewnętrznej części opony twardej mózgu wydawał się być podobny w badanych przypadkach.

Z omawianej tabeli B wynika, że obecność naczyń i pączków naczyniowych obserwowano w badanych przypadkach osób zmarłych od 9 doby po urazie głowy. W okresie wcześniejszym obecność pączków naczyniowych i naczyń w skrzepie krwi stwierdzono jedynie u osoby zmarłej w 4 dobie po urazie oraz w torebce krwiaka u osoby zmarłej w 5 dobie po urazie. Oba te przypadki poddano dodatkowej analizie.

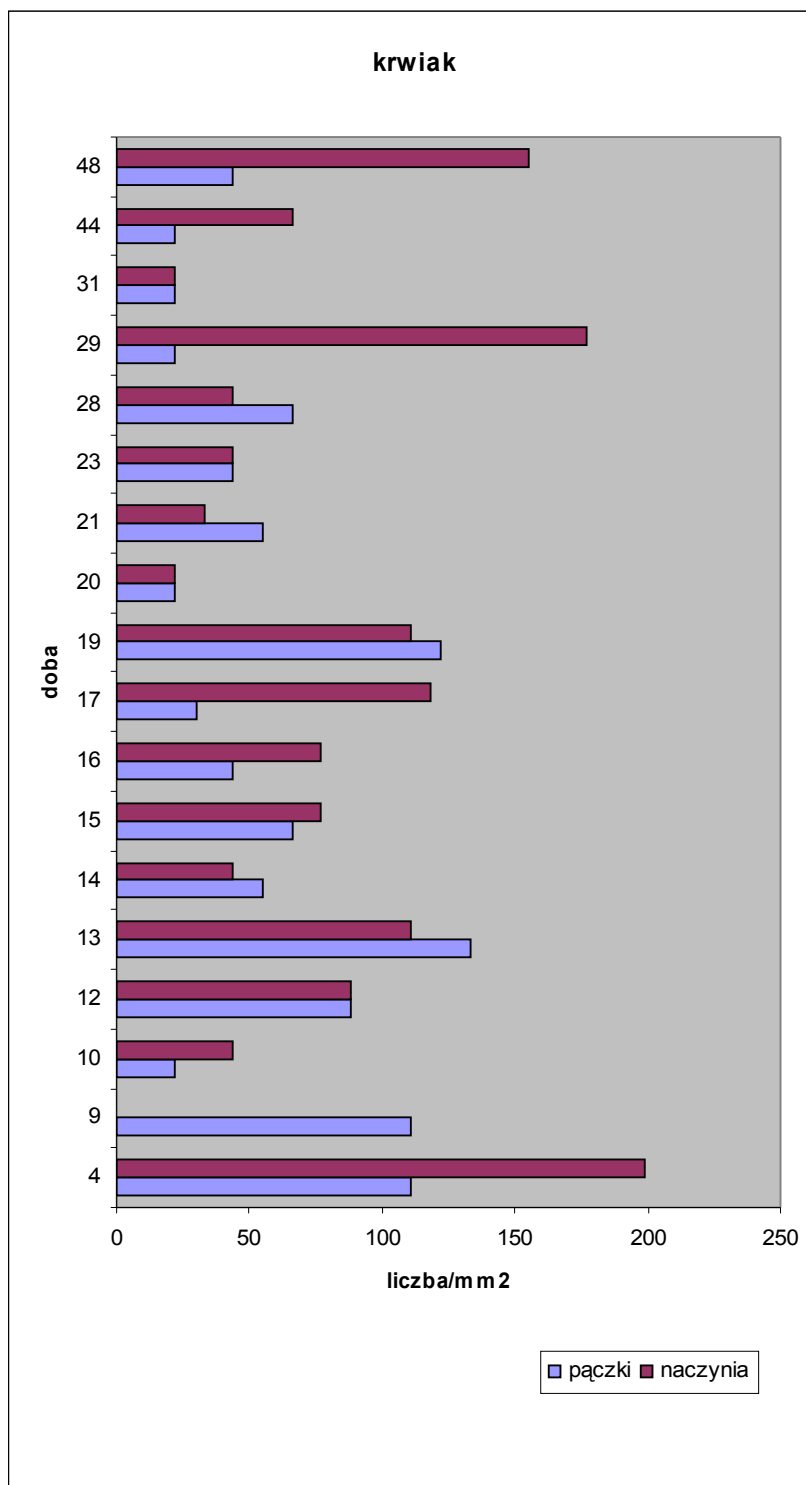
Retrospektywna analiza protokołu sekcyjnego i zawartych w nim informacji z dochodzenia wykazała, że osoba z cechami angiogenezy w krwiaku, która według historii choroby zmarła w 4 dobie po zabiegu to nieprzytomny, bezdomny mężczyzna znaleziony na ulicy, który najprawdopodobniej doznał urazu głowy wcześniej niż ustalono na podstawie analizy dokumentacji lekarskiej tj. na kilka dni przed przyjęciem go do szpitala. Natomiast osoba zmarła w 5 dobie po urazie to kobieta, która doznała urazu głowy w szpitalu wskutek

upadku z wózka, u której ostry krwiał podtwardówkowy nałożył się na istniejący krwiał przewlekły, którego pozostałością była torebka krwiaka. Oba te przypadki nakazują zweryfikowanie zestawienia podanego w tabeli B.

Wykładniki morfologiczne angiogenezy w postaci pączków naczyń i naczyń obserwowano w skrzepie krwi u osób zmarłych w okresie od 9 do 48 doby po urazie głowy, bowiem nie było skrzepów krwi w preparatach wykonanych z opony twardej z krwiałem podtwardówkowym w przypadkach u zmarłych w okresie między 49 a 144 dniem po urazie głowy.

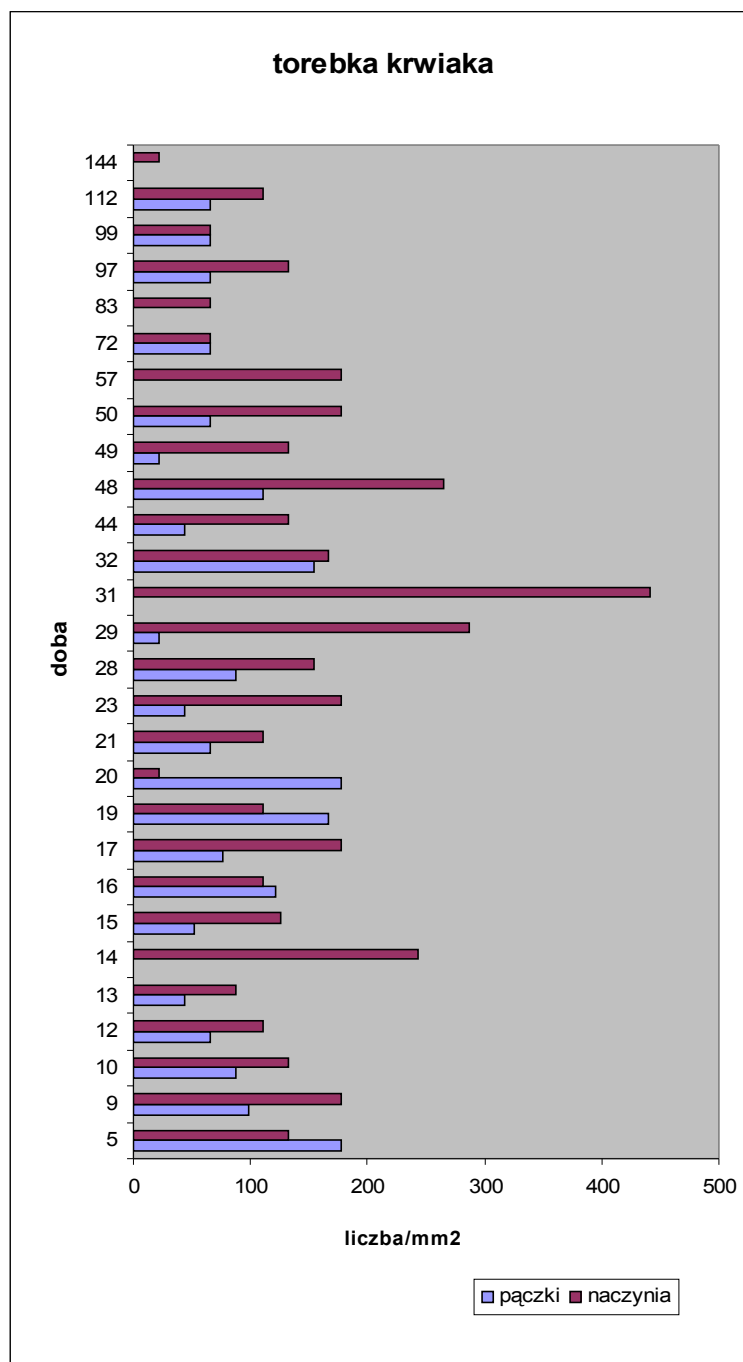
Wykładniki morfologiczne angiogenezy w torebce krwiaka stwierdzono we wszystkich badanych przypadkach osób zmarłych w okresie od 9 do 144 doby po urazie. Dotyczyło to naczyń krwionośnych, bowiem pączków naczyń nie stwierdzono w pojedynczych przypadkach osób zmarłych w 31, 57, 83 i 144 dobie po urazie głowy.

Badanie angiogenezy w krwiału nie wykazało charakterystycznych zmian stosunku ilości proliferujących naczyń do pączków naczyń w zależności od czasu, jaki upłynął od urazu głowy do śmierci (ryc. 6).



Ryc.6. Angiogeneza w krwiaku w zależności od czasu, jaki upłynął od urazu głowy do śmierci.

Podobnie badanie angiogenezy w torebce krwiaka nie wykazało charakterystycznych zmian stosunku ilości proliferujących naczyń do pęczków naczyniowych w zależności od czasu, jaki upłynął od urazu głowy do śmierci (ryc. 7).



Ryc.7. Angiogeneza w torebce krwiaka w zależności od czasu, jaki upłynął od urazu głowy do śmierci.

Z powyższego wynika, że ocena jakościowa bądź ilościowa pączków naczyń i naczyń nie może być przydatna do oceny wieku krwiaka podtwardówkowego, bowiem jest ona różna w każdym z badanych przypadków i nie zmienia się w sposób istotny w zależności od czasu, jaki upłynął od urazu głowy do śmierci. Po wyeliminowaniu z powyższego zestawienia dwóch przypadków, a mianowicie osób zmarłych w 4 i 5 dobie (z przyczyn wyżej podanych), można jednak przyjąć, że w pierwszym tygodniu po doznaniu urazu głowy nie występuje angiogeneza w krwiaku.

VI. DYSKUSJA

Umiejętność ustalania wieku krwiaka podtwardówkowego tj. czasu, jaki upłynął od chwili urazu głowy będącego jego przyczyną do śmierci ma bardzo duże praktyczne znaczenie dla medycyny sądowej, a tym samym dla organów ścigania i wymiaru sprawiedliwości, co omówiono i uzasadniono we wstępie do niniejszej rozprawy.

Ustalenie wieku krwiaka podtwardówkowego w oparciu o ocenę jego cech makroskopowych, nawet gdyby zastosowano kryteria podane przez Lindberga opisane we wstępie zmiany barwy i konsystencji skrzepów krwi, jest obarczone dużym błędem, co wynika między innymi z różnej wrażliwości i oceny barw przez różnych badaczy.(25, 16)

Z tego powodu niektórzy medycy sądowi i neuropatolodzy wykorzystali do ustalenia wieku krwiaka podtwardówkowego ewolucję zmian morfologicznych stwierdzanych w czasie badania histopatologicznego w tworzącym krwiak skrzepie i w bezpośrednim jego otoczeniu na granicy z oponą twardą mózgu. Zmiany te noszą cechy resorpcji i organizacji krwiaka.

W zajmujących się neurotraumatologią rozdziałach zawartych w podręcznikach neuropatologii ogólnej i neuropatologii sądowej sześciu autorów zajmujących się tym zagadnieniem zestawilo mikroskopowe zmiany morfologiczne stwierdzane w skrzepie krwi oraz w bezpośrednim jego otoczeniu na granicy z oponą twardą mózgu i pajęczynówką w zależności od czasu, jaki upłynął od urazu głowy, który spowodował powstanie krwiaka podtwardówkowego do chwili śmierci pokrzywdzonego. Podstawę do opracowania przez nich kryteriów morfologicznych wieku krwiaka podtwardówkowego stanowiła praca Hardmana z 1979 r. (13) Pozostali autorzy to Rosenberg, Leestma, Davis i Robertson, Oehmichen oraz Itabashi. (12, 16, 24, 31, 36) Rosenberg w swojej pracy z 1983 r. cytuje podane przez Hardmana zestawienie kryteriów ustalania wieku krwiaka podtwardówkowego, natomiast Davis przyznaje się do modyfikacji kryteriów Hardmana. Pozostali autorzy podają zestawienia tych kryteriów, stanowiące w niewielkim stopniu zmodyfikowane kryteria Hardmana, powołując się między innymi na swoje doświadczenie.

W **tabeli VI** i **VII** zestawiono podane przez różnych autorów kryteria ustalania wieku krwiaka podtwardówkowego na podstawie mikroskopowych zmian morfologicznych w tworzącym krwiak skrzepie i w bezpośrednim jego sąsiedztwie z wewnętrzną powierzchnią opony twardej mózgu.

Czas po urazie	Zmiany morfologiczne	Rosenberg [1983] [wg Hardman 1979]	Davis [1997] [modyfikacja Hardman 1979]	Leestma [1988]	Oehmichen [2006]	Itabashi [2008]
1 doba	„świeże” erytrocyty	+	+	+	+	+
2 doba	„świeże” erytrocyty włóknik neutrofile	+	+	+	+	+
3-5 doba	hemoliza makrofagi neutrofile	+	+	+	+	+
1 tydzień	hemoliza inwazja angiofibroblastów fibroblasty	+	+	+	+	+
2 tydzień	hemoliza i rozpad skrzepu kapilary proliferaacja angiofibroblastów fibroblasty	+	+	+	+	+
3 tydzień	sinusoidy	+	+	+	-	+
4 tydzień	upłynniony skrzep duże naczynia „świeże” erytrocyty	+	+	+	+	+
						+ ogniskowo

Tab.VI. Zmiany w skrzepie (krwiaku) a czas po urazie głowy

Czas po urazie	Zmiany morfologiczne	Rosenberg [1983] [wg Hardman 1979]	Davis [1997] [modyfikacja Hardman 1979]	Leestma [1988]	Oehmichen [2006]	Itabashi [2008]
1 doba	włóknik migracja leukocytów	+	+	+	+	
2 doba	fibroblasty włóknik makrofagi	pojedyncze	+	wczesna aktywność	+	aktywacja
3-5 doba	fibroblasty hemosyderocyty-makrofagi	2-5 warstw	+	3-5 warstw	2-4 warstwy +	3-4 warstwy +
1 tydzień	fibroblasty hemosyderocyty-makrofagi	12 warstw	12 warstw	12-14 warstw	12-14 warstw	12-15 warstw +
2 tydzień	fibroblasty hemosyderocyty-makrofagi	1/4-1/2 grubości opony	1/2 grubości opony	1/2 grubości opony	-	1/3-1/2 grub. opony ++
3 tydzień	fibroblasty; torebka włóknienie – kolagen hemosyderocyty - makrofagi	-	-	1/2 grubości opony + torebka 1/2	torebka 1/2 gr. opony	+
4 tydzień	torebka (fibroblastyczna tkanka) hemosyderocyty-makrofagi	grubości opony	grubości opony	grubości opony	grubości opony	torebka włóknista
1-3 m-c	zwłókniała torebka kapilary hemosyderocyty wtórne krwotoki	+	+	+	+	+
3-12 m-cy	zwłókniała torebka hemosyderocyty-makrofagi	+	+	+	-	+

Tab.VII. Zmiany na granicy krwiaka z wewnętrzną powierzchnią opony twardej mózgu a czas po urazie głowy

Według wyżej wymienionych autorów w pierwszych dwóch dobach po urazie krwiak podtwardówkowy jest utworzony ze „świeżych” erytrocytów, a na jego granicy z wewnętrzną powierzchnią opony twardej mózgu ma występować warstwa włókniaka.

Począwszy od czwartej doby po urazie tworzące krwiak erytrocyty wykazują cechy nasilającej się hemolizy, a w czwartym tygodniu skrzep krwi ulega upłynnieniu, co według różnych autorów ma mieć miejsce od 20 do 26 dnia po urazie.

W zbadanym przez autorkę materiale krwiak był utworzony z dobrze zachowanych tzw. „świeżych” erytrocytów jedynie u osób zmarłych w ciągu pierwszej doby po urazie z wyjątkiem jednego przypadku, w którym w jego części zewnętrznej obserwowano erytrocyty ulegające hemolizie. W pozostałych badanych przypadkach osób zmarłych w drugiej dobie po urazie i w okresie późniejszym krwiak był utworzony z przemieszanych ze sobą w różnym stopniu i o różnej lokalizacji erytrocytów „świeżych”, ulegających i uległych hemolizie.

Z badań własnych wynika, że nieprzydatna do oceny wieku krwiaka wydaje się być topografia poszczególnych ww. trzech rodzajów erytrocytów w krwiaku, bowiem w krwiakach podtwardówkowych zwłaszcza do chwili zainicjowania tworzenia się torebki krwiaka skrzepu nie są związane i luźno przylegają do wewnętrznej powierzchni opony twardej. Może to być przyczyną fragmentacji i przemieszczania się poszczególnych fragmentów skrzepów w stosunku do opony twardej w czasie przygotowywania preparatów histologicznych. Na hemolizę może również wpływać i najprawdopodobniej wpływa utrwalanie wycinków w wodnym roztworze formaliny, co zniekształca pierwotny obraz skrzepu.

Zasługuje na uwagę występowanie „świeżych” erytrocytów o charakterze wczesnych wylewów krwawych na granicy krwiaka i tworzącej się torebki krwiaka, zawierającej bardzo liczne, cienkościenne, często zatokowato poszerzone i przekrwione naczynia w zbadanych przypadkach od 12 do 49 doby po urazie głowy. Zmiany te także mają być przyczyną zwiększania objętości przewlekłego krwiaka podtwardówkowego, mogącego nawet prowadzić do ciasnoty śródczaszkowej. (33,36,60)

Z tabeli VI zawierającej zestawienie kryteriów morfologicznych stosowanych przy ustalaniu wieku krwiaka podtwardówkowego jedynie Davis i Robertson, Oehmichen i Itabashi zwracają uwagę na obecność granulocytów w krwiaku. Według Davisa i Robertsona oraz Itabashi mają one występować w 2 dobie po urazie, a według Oehmichena w 3 do 4 dobie po urazie.

W badanym materiale u zmarłych w pierwszym tygodniu po urazie głowy, począwszy od zmarłych w pierwszej dobie często obserwowano obecność leukocytów w krwiaku o

różnej lokalizacji w odniesieniu do powierzchni wewnętrznej opony twardej mózgu. W badanym materiale u osób zmarłych od początku drugiego tygodnia i w okresie późniejszym obecność leukocytów, w tym neutrofilów w krwiaku stwierdzono jedynie w trzech przypadkach.

Występowanie leukocytów, w tym neutrofilów w krwiaku podtwardówkowym w ciągu pierwszego tygodnia po urazie może wykazywać związek przyczynowy z wykonanym zabiegiem neurochirurgicznym, co ogranicza ich przydatność do określania wieku krwiaka.

Wszyscy wymienieni na wstępie autorzy zajmujący się określaniem wieku krwiaka podtwardówkowego jako charakterystyczną zmianą na powierzchni krwiaka od strony opony twardej wymieniali obecność warstwy włóknika, stwierdzanej w pierwszej, a według części z nich także drugiej dobie po urazie. W niniejszej pracy nie badano obecności włóknika w krwiaku, bowiem w skrzepie krwi jest on zawsze obecny w różnej ilości i o różnym ułożeniu.

Analiza piśmiennictwa wskazuje, że pojawianie się makrofagów w krwiaku podtwardówkowym obserwowano już w pierwszym tygodniu po doznaniu urazu głowy. Makrofagi w skrzepie według Hardmana, Davisa, Oehmichena i Itabashi pojawiają się w 3-5 dobie po urazie głowy. Jedynie Leestma nie wspomina o obecności makrofagów w skrzepie. Makrofagi na granicy skrzepu i opony twardej mózgu także występują w pierwszym tygodniu po urazie głowy. Po raz pierwszy pojawiają się w drugiej dobie po urazie głowy, co opisali Oehmichen i Itabashi. Opisanie przez Hardmana i Davisa makrofagi odpowiadają hemosyderocytom tj. makrofagom zawierającym w cytoplazmie hemosyderynę powstałą wskutek wewnątrzkomórkowej przemiany hemoglobiny sfagocytowanych erytrocytów. O obecności makrofagów na granicy krwiaka i opony twardej wspominają Oehmichen i Itabashi. Według tych autorów makrofagi pojawiają się po raz pierwszy w drugiej lub trzeciej dobie po urazie głowy i mają cechy hemosyderocytów. Podstawą identyfikacji makrofagów było stwierdzenie w ich cytoplazmie hemosyderyny, identyfikowanej na podstawie dodatniego wyniku barwienia preparatów histologicznych błękitem pruskim.(42)

W swoich badaniach Al-Sarraj i wsp. (1) badali makrofagi w oponie twardej mózgu i w krwiaku podtwardówkowym stosując metody immunohistochemiczne dla uwidocznienia markerów (znaczników) tych komórek – antygeny CD68 oraz antygenów zgodności tkankowej klasy II (MHC class II). Badając krwaki podtwardówkowe u osób zmarłych w ciągu 31 dni po urazie głowy i posługując się morfometrią stwierdzili, że makrofagi są obecne stale w oponie twardej mózgu i stanowią stały jej komponent, a także wykazali ich obecność w krwiaku podtwardówkowym. Makrofagi w krwiaku mają wiele funkcji. Oprócz usuwania wynaczynionych erytrocytów przez ich fagocytozę i przemianę hemoglobiny w

hemosyderynę wydzielają cytokiny i czynniki wzrostu, pobudzające inne komórki biorące udział w procesie resorpcji i organizacji krwaka podtwardówkowego.

Wyżej wymienieni autorzy stwierdzili, że w krwaku makrofagi pojawiały się w drugiej dobie po urazie głowy w związku z aktywacją osiadłych w tkankach makrofagów zwanych makrofagami tkankowymi. Im dłuższy czas upłynął od urazu głowy do śmierci, tym liczniejsze były makrofagi zarówno w wewnętrznej części opony twardej mózgu, jak i w samym krwaku. Na podstawie wykonanych badań immunohistochemicznych w pierwszej dobie po urazie nie stwierdzili obecności makrofagów ani hemosyderocytów w krwaku, nie stwierdzając zwiększenia ich liczby w oponie twardej mózgu. W drugiej dobie po urazie stwierdzili obecność osiadłych makrofagów w oponie twardej mózgu zarówno w jej części wewnętrznej, jak i zewnętrznej, a w okresie między 2 a 5 dobą po urazie stwierdzali obecność licznych aktywnych osiadłych makrofagów w wewnętrznej części opony twardej mózgu oraz w samym krwaku. Liczba makrofagów w wewnętrznej części opony twardej mózgu zwiększała się w okresie między 5 a 10 dobą po urazie. W tym czasie były one także rozproszone w krwaku. Bardzo liczne, szeroko rozprzestrzenione aktywne makrofagi stwierdzano wzdłuż brzegów wewnętrznej części opony twardej mózgu oraz w krwaku między 18 a 31 dobą po urazie, przy czym w tym okresie ich liczba w krwaku była znacznie większa niż w wewnętrznej części opony twardej mózgu. Wyniki badań immunohistochemicznych makrofagów różniły się od wyników badania hemosyderocytów. Według tych autorów hemosyderocyty pojawiały się u zmarłych od 2 do 5 doby oraz w 5 do 10 dobie po urazie i były zlokalizowane głównie w wewnętrznej części opony twardej oraz w krwaku. Zmniejszanie się ich liczby obserwowano od 18 do 31 doby po urazie. Autorzy uważają, że nie stwierdzenie obecności hemosyderocytów w preparatach barwionych przez nich metodą Pearl'a wskazuje na wczesny krwaki, którego wiek należy ocenić od 0-48 godzin, natomiast obfity naciek z makrofagów w krwaku i umiarkowany w wewnętrznej części opony twardej mózgu ma wskazywać na czas przeżycia wynoszący 18-31 dni po urazie głowy. Ponadto w krwaku u osób zmarłych w okresie od 18 do 31 doby po urazie stwierdzano różne fazy martwicy makrofagów. (1)

W czasie badań stanowiących przedmiot niniejszej pracy, wykorzystując barwienie immunohistochemiczne markera makrofagów – CD68 – stwierdzono ich obecność zarówno w skrzepie, jak i wewnętrznej części opony twardej mózgu u osób zmarłych już w pierwszej dobie po doznaniu urazu głowy, przy czym liczba makrofagów w wewnętrznej części opony twardej była znacznie większa niż w krwaku. Dotyczyło to zwłaszcza przypadków, w których miała miejsce interwencja neurochirurgiczna, podczas której ewakuowano krwaki i

zaopatrzone miejsce krwawienia. Obecność makrofagów stwierdzono także w tworzącej się torebce krwiaka podtwardówkowego, co miało miejsce już w drugim tygodniu po urazie głowy. Od 49 doby po urazie w preparatach histologicznych nie było skrzepów krwi, a makrofagi występowały jedynie w torebce krwiaka i wewnętrznej części opony twardej mózgu, przy czym były szczególnie liczne w torebce krwiaka.

Przeprowadzone badania nie dają podstaw do wnioskowania o czasie trwania krwiaka podtwardówkowego na podstawie zmian ilościowych makrofagów w skrzepie, w wewnętrznej części opony twardej mózgu i/lub torebce krwiaka w zależności od czasu, jaki upłynął od urazu głowy do śmierci. Nieprzydatność oceny zmian ilościowych makrofagów w wyżej wymienionych strukturach do oceny wieku krwiaka podtwardówkowego, nawet po zastosowaniu metod morfometrycznych, przy wykorzystaniu badań immunohistochemicznych wynika także z ogniskowego charakteru nacieku z makrofagów w tych strukturach. Ogniskowy charakter zmian polega na miejscowym występowaniu zagęszczenia dużej liczby makrofagów, przemieszanym z obszarami zawierającymi niewielką liczbę makrofagów.

U osób z krwakiem podtwardówkowym, które nie zmarły z jego powodu we wczesnym okresie po urazie głowy (był małych rozmiarów i nie powodował ciasnoty śródczaszkowej) w miarę upływu czasu wytwarza się torebka krwiaka podtwardówkowego. Otacza ona wynaczynioną krew, nagromadzoną pod oponą twardą z reguły w postaci skrzepów. Torebka krwiaka jest strukturą oddzielającą skrzepy krwi od powierzchni wewnętrznej opony twardej mózgu oraz od powierzchni zewnętrznej pajęczynówki, w związku z czym wyróżnia się w jej obrębie dwie części: zewnętrzną, przylegającą do opony twardej mózgu oraz wewnętrzną, sąsiadującą z pajęczynówką. W czasie badania histopatologicznego tworząca się torebka krwiaka w najwcześniejszej fazie jej powstawania ma postać skupień wrzecionowatych komórek, które równolegle ułożonych względem siebie i względem powierzchni opon. Komórki te tworzą warstwy, których grubość zwiększa się w miarę upływu czasu trwania krwiaka. Grubość tych warstw jest wykorzystywana do ustalania wieku krwiaka podtwardówkowego. Badania przy zastosowaniu mikroskopu elektronowego wykazały, że komórki te to komórki tworzące warstwę graniczną opony twardej mózgu, rozwarstwione przez krew z domieszką – w miarę upływu czasu – fibroblastów, myofibroblastów, rzadziej także komórek mięśni gładkich. W miarę upływu czasu tworząca się torebka krwiaka ma mikroskopowe cechy młodej tkanki łącznej zwanej ziarniną. Oprócz wyżej wymienionych komórek zawiera ona liczne naczynia krwionośne oraz komórki przyniesione z prądem krwi. W miarę dalszego upływu czasu od urazu głowy fibroblasty

wytwarzają i wydzielają do podścieliska substancję podstawową tkanki łącznej oraz elementy włókniste tkanki łącznej: włókna kolagenowe, elastyczne i sprężyste. (21, 49) Po upływie paru miesięcy torebka krwiaka włóknienie i jest zbudowana z szkliwiającej, kolagenowej tkanki łącznej z rozproszonymi w niej naczyniami oraz licznymi makrofagami o cechach morfologicznych hemosyderocytów, wskazującymi, że jest ona zejściem podoponowego wylewu krwi.

Mikroskopowa budowa morfologiczna części wewnętrznej i zewnętrznej torebki krwiaka zmienna w czasie jest również wykorzystywana do ustalania wieku krwiaka podtwardówkowego. W opracowaniu Hardmana, najwcześniejszym dostępnym opracowaniu na ten temat stwierdza się, że pojedyncze fibroblasty na granicy krwiaka i opony twardej mózgu pojawiają się w 2 dobie, między 3 a 5 dobą fibroblasty tworzą warstwę grubości 2-5 komórek, pod koniec pierwszego tygodniu grubości 12 komórek, w drugim tygodniu ich grubość odpowiada $\frac{1}{4}$ do $\frac{1}{2}$ grubości opony twardej, a w czwartym tygodniu grubość zewnętrznej części torebki jest równa grubości opony twardej mózgu. Po upływie 1 do 3 miesięcy po urazie torebka krwiaka ulega szkliwieniu, zawiera olbrzymie („zatokowate”) naczynia włosowate, często z wtórnymi wylewami, po upływie 3 do 12 miesięcy jest ona zbudowana z dojrzałej, włóknistej tkanki łącznej z rozproszonymi licznymi hemosyderocytami, a powyżej 1 roku budowa mikroskopowa torebki krwiaka jest bardzo podobna do budowy opony twardej mózgu. Po upływie trzech lat w torebce mogą występować ogniskowe zwapnienia lub ogniska metaplastji kostnej.

Podobne zmiany w torebce krwiaka w zależności od czasu, jaki upłynął od urazu głowy do śmierci opisują także Leestma, Oehmichen i Itabashi. Dokładny opis omawianych zmian w zewnętrznej części torebki krwiaka zawiera tabela VII, umożliwiająca porównanie różnic oceny wieku krwiaka między wyżej wymienionymi autorami. (12, 13, 16, 31, 36)

W niniejszej pracy oglądając badany materiał pod mikroskopem nie dostrzeżono wyżej opisanych zmian w postaci zależności między wiekiem krwiaka a warstwową budową wczesnej fazy torebki krwiaka, jak wyżej omówiona, poza ogniskowymi zmianami w pojedynczych przypadkach.

Stałą strukturą w tworzącej się torebce krwiaka są naczynia krwionośne, których nie znajduje się w warunkach normalnych na granicy opony twardej i pajęczynówki. Wielkość, liczba i lokalizacja naczyń są zmienne nie tylko w każdym badanym przypadku, ale także zależą od badanego pola widzenia. Naczynia te mają budowę naczyń włosowatych, często o krętym świetle, zwężonym przez wpuklanie się obrzmiałych komórek śródbłonna. Część z nich to cienkościenne naczynia o szerokim świetle podobne do naczyń zatokowatych –

sinusoidów. W czasie badania spostrzega się wiele pośrednich, przejściowych form naczyń między wyżej opisanymi. Naczynia te często mają średnicę erythrocyta i są utworzone z pojedynczej warstwy spłaszczonego śródbłonka, spoczywającego na błonie podstawnej, w części z nich są obecne pericyty. (7)

W części przypadków badanych torebek krwiaków podtwardówkowych w powiększonych przestrzeniach pozakomórkowych w torebce gromadzą się pojedyncze erythrocyty lub ich skupienia. W badaniach w mikroskopie elektronowym stwierdzano przyleganie erythrocytów do powierzchni makrofagów, a także cechy ich wnikania do wnętrza makrofagów. W bardziej zaawansowanych fazach fagocytozy sfagocytowane erythrocyty tworzyły w komórkach nieregularnego kształtu fagosomy.

Al-Sarraj w swoich badaniach stwierdził, nie określając dokładnej, że w ciągu pierwszego tygodnia do krwiaka wrastały naczynia włosowate.

Według Hardmana, Rosenberga i Davisa pod koniec pierwszego tygodnia po urazie głowy do skrzepu krwi mają wrastać angiofibroblasty – komórki, których charakteru dokładnie nie opisują. Natomiast w drugim i trzecim tygodniu po urazie głowy stwierdzano w skrzepie obecność naczyń włosowatych zwanych naczyniami zatokowatymi – sinusoidami lub olbrzymimi kapilarami. Oehmichen stwierdził u zmarłych po upływie 10 do 15 dni po urazie głowy proliferację naczyń włosowatych w skrzepie, nie opisując dokładnie ich charakteru. W zestawieniu Hardmana, Rosenberga i Davisa histologicznych cech w części zewnętrznej torebki krwiaka podtwardówkowego autorzy opisują duże naczynia włosowate określane jako „olbrzymie” jedynie u osób zmarłych po upływie 1 do 3 miesięcy po urazie głowy. Natomiast o obecności naczyń w torebce zewnętrznej krwiaka podtwardówkowego nie wspomina Leestma ani Oehmichen. Z kolei Itabashi stwierdza cechy proliferacji przerośniętych komórek śródbłonka w skrzepie u zmarłych w 2-3 dobie po urazie, a w zaczynającej się tworzyć torebce krwiaka w 3-4 dobie po urazie. U zmarłych w okresie od 5 do 10 doby po urazie stwierdza wnikanie pierwszych naczyń włosowatych do skrzepu krwi, a w 7 dobie inwazję „angiofibroblastów” do skrzepu. W okresie od 20 do 25 dnia opisuje przybytek w następstwie proliferacji większej ilości kapilarów w skrzepie, w tym kapilarów o charakterze sinusoidów z ogniskami świeżego ponownego krwawienia. Olbrzymie kapilary w torebce krwiaka mogą przetrwać do około 90 dnia po urazie głowy.

W czasie badania materiału własnego stwierdzono stałe występowanie pączków naczyniowych i naczyń włosowatych w tworzącym krwiak skrzepie u osób zmarłych od 9 do 48 doby po urazie głowy. 48 doba po urazie to ostatnia doba, w której stwierdzano obecność skrzepu krwi w preparacie histologicznym. Wśród osób zmarłych w okresie od 1 do 9 doby

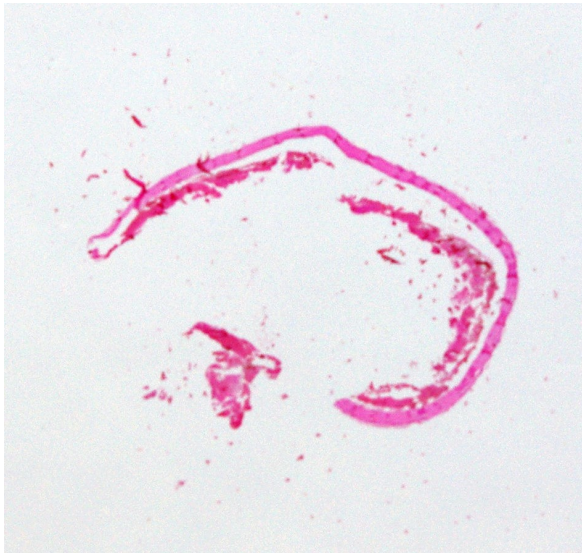
po urazie głowy obecność naczyń i pączków naczyniowych w skrzepie krwi stwierdzono jedynie u jednej osoby zmarłej w 4 dobie po urazie oraz w torebce krwiaka osoby zmarłej w 5 dobie po urazie. Prawdopodobne przyczyny tego wyjaśniono przy omówieniu wyników badania. Po ponownej weryfikacji obu tych przypadków uznano, że krwiaki te są starsze niż wynikało to ze wstępnych ustaleń przed przystąpieniem do badań.

Natomiast zarówno naczynia, jak i pączki naczyniowe w tworzącej się torebce krwiaka podtwardówkowego stwierdzano we wszystkich przypadkach począwszy od 9 doby po urazie głowy tj. doby, w której po raz pierwszy w badanych przypadkach stwierdzono obecność torebki krwiaka.

Reasumując stwierdza się, że w przedstawionym materiale wszystkie badane zmiany strukturalne w krwiaku – w erytrocytach, nacieki z leukocytów i makrofagów oraz proliferacja naczyń włosowatych i pączków naczyniowych – miały charakter zmian wieloogniskowych o zmiennym nasileniu.

Badając zmiany morfologiczne w krwiaku, w wewnętrznej części opony twardej mózgu i w torebce krwiaka stwierdzono, że zmiany te – hemoliza erytrocytów, nacieki z leukocytów-neutrofilów, makrofagów oraz angiogeneza – są zmianami ogniskowymi występującymi w różnym stopniu nasilenia w różnych częściach wyżej wymienionych struktur. Badanie wycinka z opony twardej z krwiakiem może być w związku z tym obarczone błędem. Skrzepy krwi tworzące krwiak w czasie pobierania wycinka do badania histopatologicznego i w czasie opracowywania materiału po jego utwaleniu w formalinie mogą wykruszyć się, a w czasie przygotowywania preparatu (krojenie na mikrotomie) mogą zmieniać swoją orientację przestrzenną, co może spowodować, że topografia stwierdzonych w krwiaku zmian w stosunku do np. wewnętrznej powierzchni opony twardej mózgu może ulec zmianie. W związku z powyższym zasadna byłaby zmiana techniki pobierania materiału do badania histopatologicznego. Zamiast pobierać jeden lub więcej wycinków z opony twardej z krwiakiem należałoby wyciąć z opony wraz z przylegającym krwiakiem nożyczkami pas szerokości do 2 cm począwszy od brzegu cięcia opony twardej mózgu do ściany zatoki strzałkowej górnej, a następnie po jego zrolowaniu przewiązać tak powstały rulon w środku nitką, utrwalić w formalinie i przekazać do obróbki histologicznej. W bloku parafinowym należy rulon zatopić tak, aby skrawać go na mikrotomie w płaszczyźnie prostopadłej do długiej osi. Uzyskane w ten sposób skrawki zawierają dużą powierzchnię opony twardej z przylegającym krwiakiem, co ułatwia ocenę stwierdzanych zmian, zwłaszcza ich topografii i rozległości. Na poniższych fotografiach pokazano preparaty histologiczne

wykonane z opony twardej mózgu: fot. 19 przedstawia preparat wykonany z wycinka pobranego w sposób typowy, a fot. 20 – z „rulonu” powstałego ze zwinięcia wyciętego paska opony twardej mózgu z przylegającym krwiakiem (sposób postępowania jak w przygotowywaniu do badania histopatologicznego błon płodowych pozałożyskowych).



Fot. 19. Wycinek z opony twardej mózgu pobrany w sposób typowy (H+E).



Fot. 20. Wycinek z opony twardej mózgu w postaci „rulonu” (H+E).

VII. WNIOSKI

1. Wyniki wykonanych badań morfologicznych – histopatologicznych i immunohistochemicznych – krwiaka podtwardówkowego wraz z przylegającą oponą twardą mózgu są rozbieżne z częścią stosowanych dotychczas, podanych w piśmiennictwie kryteriów określania wieku krwiaka.

Rozbieżność ta dotyczy:

- a. makrofagów – pojawianie się nacieków z makrofagów w skrzepie i w oponie twardej mózgu w badaniach własnych stwierdzono już u zmarłych w pierwszej dobie po doznaniu urazu głowy, a w podanych w piśmiennictwie kryteriach pierwsze makrofagi identyfikowane jako hemosyderocyty spostrzegano w drugiej, a przeważnie w 3- 5 dobie po urazie; badania własne wykazały także bardziej obfite nacieki z makrofagów w wymienionych strukturach w przypadkach, w których miała miejsce interwencja neurochirurgiczna;
- b. erytrocytów – erytrocyty tzw. „świeże” tworzyły krwiak jedynie u zmarłych w pierwszej dobie, a według podanych w piśmiennictwie kryteriów w pierwszej i drugiej dobie po urazie;
- c. leukocytów-neutrofilów w krwiaku – stwierdzano je u zmarłych w ciągu pierwszego tygodnia, począwszy od pierwszej doby po urazie głowy, a według podanych w piśmiennictwie kryteriów część badaczy stwierdzała je dopiero w 3-5 dobie, a jeden w drugiej dobie.

Zgodność wyników niniejszych badań dotyczy:

angiogenezy – ślady angiogenezy w postaci proliferacji naczyń włosowatych i ich prekursorów – pączków naczyńniowych – stwierdzono w drugim tygodniu, co jest zgodne z podanymi w piśmiennictwie kryteriami.

2. Torebkę krwiaka podtwardówkowego o cechach nieswoistej ziarniny obserwowano u zmarłych w drugim tygodniu po doznaniu urazu głowy (od 9 doby), czego nie można porównać z podawanymi w piśmiennictwie kryteriami ze względu na odmienny opis struktury o wyglądzie torebki na granicy krwiaka z oponą twardą.

3. Wyniki badań morfometrycznych odczynu z makrofagów i angiogenezy (naczynia i pączki naczyniowe) w skrzepie, wewnętrznej części opony twardej mózgu i w torebce krwiaka dostosowanych do charakteru badanego materiału wykazały, że nasilenie odczynu z makrofagów i angiogenezy są zjawiskami osobniczo zmiennymi, nie wykazującymi ewidentnej zależności od czasu, jaki upłynął od urazu głowy do śmierci. Nie mogą więc być wykorzystane do dokładnej oceny wieku krwiaka.

4. Ogniskowy, nie rozlany charakter zmian w krwiaku podtwardówkowym oraz na jego granicy z oponą twardą mózgu wskazuje, że optymalną metodą zabezpieczenia i przygotowania do badania histopatologicznego w czasie sekcji zwłok byłoby wycięcie paska opony twardej z przylegającym krwiakiem szerokości ok. 2 cm od miejsca przecięcia opony twardej do zatoki strzałkowej górnej, a następnie ściśle zwinięcie go, zawiązanie w części środkowej nicią i utrwalenie. Taka metoda zabezpieczenia materiału umożliwiłaby ocenę dużej powierzchni wewnętrznej opony twardej mózgu i przylegającego do niej krwiaka, co ułatwiłoby ocenę zmian świadczących o wieku krwiaka.

VIII. STRESZCZENIE (ABSTRACT)

Ustalenie wieku krwaka podtwardówkowego (subdural hematoma – SDH) – czasu, jaki upłynął od doznania urazu głowy, który spowodował powstanie krwaka podtwardówkowego do śmierci ma ważne praktyczne znaczenie dla medyka sądowego oraz wymiaru sprawiedliwości i organów ścigania. Ustalenie wieku SDH w czasie sekcji na podstawie jego cech makroskopowych, zwłaszcza zmiany zabarwienia i konsystencji w miarę upływu czasu od urazu głowy jest metodą niedokładną i może być obarczone dużym błędem. Część neuropatologów oraz neuropatologów sądowych zajmujących się tym zagadnieniem (Hardman, Davis i Robertson, Leestma, Itabashi, Oehmichen, Rosenberg) opracowała kryteria ustalenia wieku krwaka podtwardówkowego na podstawie mikroskopowych zmian morfologicznych w skrzepie krwi oraz na granicy skrzepu z oponą twardą i pajęczynówką mózgu, które zestawili w odpowiednich tabelach. W okresie około 20 ostatnich lat w Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej Akademii Medycznej w Gdańsku określano wiek krwaka podtwardówkowego wykorzystując kryteria histopatologiczne podane przez wyżej wymienionych autorów. Okazało się, że w części przypadków ustalony w ten sposób wiek krwaka podtwardówkowego był obarczony dość dużym błędem. W związku z powyższym postanowiono podjąć próbę obiektywizacji i opracowania kryteriów morfologicznych – histopatologicznych umożliwiających ustalenie wieku krwaka podtwardówkowego, wykorzystujących metody immunohistochemiczne. Badania przeprowadzono na materiale archiwalnym Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej AMG w postaci bloków parafinowych wykonanych z pobranych w czasie sekcji zwłok wycinków z opony twardej mózgu z przylegającym skrzepem oraz wykonanych z nich preparatów histologicznych, barwionych hematoksyliną i eozyną. Z bloków tych wykonano także preparaty histologiczne barwione immunohistochemicznie na makrofagi (marker CD68) oraz komórki śródbłonka (marker CD34). Czas urazu głowy ustalono na podstawie informacji zawartej w protokole sekcyjnym, historii choroby oraz w materiałach z dochodzenia.

Badany materiał stanowiły 84 przypadki osób w wieku od 4 do 90 lat, zmarłych w okresie od 1 do 144 doby po urazie głowy, u których stwierdzono krwiak podtwardówkowy. W badanej grupie było 62 mężczyzn, 18 kobiet i 4 dzieci. Były to ofiary wypadków drogowych, kolejowych, upadków z pozycji stojącej, z wysokości, schodów, łóżka w szpitalu i krzesła oraz ofiary bójki lub pobicia. W części przypadków krwiak podtwardówkowy

współistniał ze złamaniem kości czaszki, stłuczeniem i/lub rozerwaniem mózgu oraz krwakiem nadwardówkowym.

Preparaty histologiczne oglądano w mikroskopie optycznym. Dla oceny dynamiki stwierdzonych zmian w miarę upływu czasu posłużono się prostą metodą morfometryczną. Liczono liczbę badanych struktur morfologicznych (makrofagi, naczynia i pączki naczyniowe) w miejscu ich największego zagęszczenia w wystandaryzowanej jednostce powierzchni, a następnie ich ilość przeliczano na 1 mm² powierzchni używając programu „Soft Imaging System analySIS Five. Digital Imaging Solutions”

Ponadto oceniano charakter i stopień nasilenia hemolizy erytrocytów w skrzepie krwiaka podwardówkowego oraz nacieki z leukocytów, w tym neutrofilów.

Makrofagi w skrzepie i w części wewnętrznej opony twardej mózgu występowały już u osób zmarłych w ciągu 1 doby po urazie głowy, przy czym u osób zmarłych w ciągu 1 tygodnia po urazie głowy u osób po interwencji neurochirurgicznej ich ilość zarówno w skrzepie, jaki wewnętrznej części opony twardej mózgu była większa niż u osób bez interwencji neurochirurgicznej. Obecność makrofagów w skrzepie stwierdzano do 48 doby po urazie głowy. 48 doba po urazie głowy to ostatnia doba, w której w preparacie histologicznym były skrzepy krwi. Makrofagi były obecne także w torebce krwiaka od 9 doby, w której po raz pierwszy ją stwierdzono, do 144 doby po urazie głowy. Zawartość makrofagów w skrzepie, części wewnętrznej opony twardej mózgu i w torebce krwiaka była osobniczo zmienna i nie wykazywała związku z czasem, jaki upłynął od urazu głowy do śmierci.

Angiogenezę w postaci proliferacji naczyń włosowatych i pączków naczyniowych w skrzepie obserwowano u osób zmarłych od 9 do 48 doby po urazie głowy, natomiast w torebce krwiaka u zmarłych od 9 do 144 doby po urazie. Liczba naczyń włosowatych w wewnętrznej części opony twardej mózgu we wszystkich badanych przypadkach nie ulegała istotnym zmianom.

W badanym materiale skrzep krwi był utworzony ze „świeżych” erytrocytów jedynie u osób zmarłych w pierwszej dobie po urazie, w pozostałych przypadkach stwierdzono cechy hemolizy o różnym stopniu nasilenia. Natomiast leukocyty-neutrofile w skrzepie obserwowano jedynie u osób zmarłych w ciągu pierwszego tygodnia po urazie głowy począwszy od pierwszego dnia. W okresie późniejszym stwierdzono je tylko w trzech przypadkach.

Słowa kluczowe: krwiak podwardówkowy, wiek krwiaka podwardówkowego, makrofagi, angiogeneza, erytrocyty hemoliza.

Determination of the age of the subdural hematoma (SDH) – time elapsing from the head injury which caused subdural hemorrhage to death – is very important in practice for forensic pathologists and administration of justice, public prosecutor and police. Determination of the age of subdural hematoma during autopsy is possible on gross appearance of the blood clot. The most important evidence are changes in colour and consistency during the time of survival from head injury. It is inaccurate method and the results are given with big error. Some of the neuropathologists and forensic neuropathologists who were interested in this problem (Hardman, Davis i Robertson, Leestma, Itabashi, Oehmichen, Rosenberg) elaborated criterions for determination of the age of subdural hematoma using microscopic morfological changes in the blood clot and in the boundary of the blood clot, dura and arachnoidea. They set this morfological changes together in the tables.

For last 20 years in the Department of Forensic Medicine Medical University of Gdansk this microscopic criterions were used to determine the age of subdural hematoma. It was found during retrospective analysis that in part of these cases the age of subdural hematoma was determined with significant error. So, there were tries to elaborate useful histopathological criterions for timing of the subdural hematoma with immunohistochemical methods. The subdural hematoma samples from archival material of the Department of Forensic Medicine Medical University of Gdansk were examined using paraffin-embedded specimens from dura with blood clot and histological slides stained with Hematoxylin and Eosin. Immunohistochemical procedure was used for CD68 – marker of macrophages and CD34 – marker of endothelial cells and vessels. The time of head injury was established from autopsy protocol, history of disease and data from police investigation. Selected material consisted of 84 cases of traumatic SDH, from 4 to 90 years old, including: 62 males, 18 females and 4 children. Period from head injury to death ranged from 1 to 144 days. There were victims of road traffic and railway accidents, falls from a standing position, falls from: height, stairs, bed in hospital or chair and assault. In part of cases the coincidence of subdural hematoma and skull fractures, epidural hematoma, contusion and/or laceration of a brain was noticed. Histological slides were examined in a light microscope. Macrophages, vessels and bud vessels, leukocytes – polymorphic nuclear leukocytes and erythrocytes hemolysis were investigated. Simple morphometric method was used for estimation of the dynamics of the changes of these morphological structures during the period from head injury to death. Macrophages, vessels and bud vessels were counted in areas of their highest condensation.

They were counted in standardized surface area, then the obtained number was converted to the number corresponding to the area of 1 mm² using computerized imaging setup “Soft Imaging System analySIS Five”.

Macrophages in the blood clot and in the internal part of the dura were present in specimens from people died during 1st day after head trauma. Among deceased after neurosurgical intervention who died during first week after head trauma macrophages were more numerous in the blood clot and in the internal part of the dura than in specimens from those who died without neurosurgical intervention. Macrophages in the blood clot were present up to 48 days after head trauma, because after this time the clots in the histological slides were no longer present. Macrophages were present in the neomembrane of subdural hematoma from 9th till 144th day after head trauma. The 9th day after trauma was the first day when the neomembrane of subdural hematoma was encountered. The number of macrophages in the blood clot, internal part of the dura and neomembrane was different in each case and didn't change significantly during the time from head injury to death. Angiogenesis – proliferation of capillaries and bud vessels could be observed started in deceased between 9th and 48th day after head trauma and in neomembrane in deceased between 9th and 144th day after head trauma. The number of capillary vessels in the internal part of the dura was similar in all investigated cases. In the investigated cases „fresh” erythrocytes were present in the blood clot only in cases of deceased on the first day after trauma. In the rest of the cases different stages of the hemolysis was observed. Polymorphic nuclear leucocytes were present only in cases died during the first week after head injury. Afterwards, they were present only in three cases.

Key words: subdural hematoma, age of subdural hematoma, macrophages, angiogenesis, erythrocytes hemolysis.

IX. PIŚMIENICTWO

1. Al-Sarraj S., Mohamed S., Kibble M., Rezaie P.: Subdural hematoma (SDH): assessment of macrophage reactivity within the dura mater and underlying hematoma. *Clin Neuropathol* 2004; 23(2): 62-75
2. Avis S.P.: Nontraumatic acute subdural hematoma. A case report and review of the literature. *Am J Forensic Med Pathol* 1993; 14(2): 130-134
3. Bidziński J.: *Neurochirurgia*. PZWL 1981; 271-363
4. Bochenek A., Reicher M.: *Anatomia człowieka. Tom V*. PZWL 1989
5. Fogelholm R., Heiskanen O., Waltimo O.: Chronic subdural hematoma in adults. Influence of patients' age on symptoms signs, and thickness of hematoma. *J Neurosurg* 1975; 42: 43-46
6. Frederickson R.G.: The subdural space interpreted as a cellular layer of meninges. *Anat Rec* 1991; 230: 38-51
7. Friede R.L., Schachenmayr W.: The origin of subdural neomembranes. II. Fine structure of neomembranes. *Am J Pathol* 1978; 92: 69-78
8. Gennarelli T.A., Thibault L.E.: Biomechanics of acute subdural hematoma. *J Trauma* 1982; 22(8): 680-686
9. Głowacki J., Marek Z.: *Urazy czaszki i mózgu. Rozpoznawanie i opiniowanie*. Krakowskie Wydawnictwo Medyczne; Kraków 2000
10. Haines D.E.: On the question of a subdural space. *Anat Rec* 1991; 230: 2-21
11. Haines D.E., Harkey H. L., Al-Mefty O.: The „subdural” space: a new look at an outdated concept. *Neurosurg* 1993; 32(1): 111-120
12. Hardman J.M.: Cerebrospinal trauma. in Davis R.L., Robertson D.M.: *Textbook of neuropathology*. 1997; 1179-1232
13. Hardman J.M.: The pathology of traumatic brain injuries. *Adv Neurol* 1979; 22: 15
14. Hirasima Y., Endo S., Kato R., Ohmori T., Nagahori T., Nishijima M., Karasawa K., Nojima S., Takaku A.: Platelet-activating factor (PAF) and the development of chronic subdural haematoma *Acta Neurochir (Wien)*. 1994; 129(1-2): 20-5
15. Hymel K.P., Jenny C., Block R.W.: Intracranial hemorrhage and rebleeding in suspected victims of abusive head trauma: addressing the forensic controversies. *Child Maltreat* 2002; 7; 329-348
16. Itabashi H.H., Andrews J.M., Tomiyasu U., Erlich S.S., Sathyavagiswaran L.: *Forensic Neuropathology*. Elsevier 2007

17. Jackiewicz A., Lipiński J.(promot.): Epidemiologia, następstwa kliniczne i wyniki leczenia chorych z obrażeniami czaszkowo-mózgowym: praca doktorska. Katedra i Klinika Chirurgii Urazowej AM w Gdańsku. Gdańsk 2003.
18. Jennett B., Teasdale G., Galbraith S. i wsp.: Severe head injuries in three countries. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1977; 139; 291-298
19. Karwacka M., Siemiński M., Nyka W.M.: Krwiak nad- i podtwardówkowy. *Forum Medycyny Rodzinnej* 2007; 1(3); 236-241
20. Kawano N, Endo M, Saito M, Yada K: Origin of the capsule of chronic subdural hematoma, An electron microscopic study [in Japanese, English abstr]. *No Shinkei Geka* 1988; 16: 747-752 (abstract)
21. Kawano N, Suzuki K: Presence of smooth-muscle cells in the subdural neomembrane. *J Neurosurg* 1981; 54: 646-651
22. Kleiven S.: Influence of impact direction on the human head in prediction of subdural hematoma. *J Neurotrauma* 2003; 20(4): 365-379
23. Krempien B.: Experimental histological and autoradiographical studies on the organization of subdural hematoma. *Virchows Arch A Pathol Pathol Anat* 1971; 352(1): 90-98
24. Leestma J.E.: *Forensic Neuropathology*. Raven Press New York 1988
25. Lindberg R.: Trauma of the menigs and brain. W Minckler J.: *Pathology of the nervous system*. New York: McGraw -Hill, 1971, 2, 1705-1765
26. Mackay B.: Electron microscopy in tumor diagnosis. in Fletcher Ch.D.M.: *Diagnostic histopathology of tumors*. Churchill Livingstone 2000; 1785-1824
27. Markwalder T-M: Chronic subdural hematomas: A Review. *J Neurosurg* 1981; 54: 637-648
28. Matsuyama T., Shimomura T., Okumura Y., Sakaki T.: Acute subdural hematoma due to rupture of cortical arteries: a study of the points of rupture in 19 cases. *Surg Neurol* 1997; 47: 423-427
29. Maxeiner H.: Detection of ruptured cerebral bridging veins at autopsy. *Forensic Sci Int* 1997; 89(1-2): 103-110
30. Maxeiner H., Wolff M.: Pure subdural hematomas. A postmortem analysis of their form and bleeding points. *Neurosurg* 2002; 50(3): 503-508
31. McCormick W.F.: Trauma w Rosenberg R.N., Grossman R.G., Schochet S.S., Jr; Heinz E.R., Willis W.D., Jr, *The Clinical Neurosciences. Neuropathology*. Churchill Livingstone 1983; 241-283
32. Meagher R. J., Young W.F.: Subdural hematoma; www.emedicine.com; 02.11.2006
33. Mossakowski M., Dymecki J., Wender M.: *Podstawy neuropatologii*. PZWL 1981

34. Murakami H., Hirose Y., Sagoh M., Shimizu K., Kojima M., Gotoh K., Mine Y., Hayashi T., Kawase T.: Why do chronic subdural hematomas continue to grow slowly and not coagulate? Role of thrombomodulin in the mechanism. *J Neurosurg* 2002; 96(5): 877-84
35. Nabeshima S., Reese T.S., Landis D.M.D., Brightman M.W.: Junctions in the meninges and marginal glia. *J Comp Neur* 1975; 164: 127-170
36. Oemichen M., Auer R.N., Konig H.G.: Forensic neuropathology and associated neurology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2006
37. Olbrycht J.S., Kowalczykowska J.: Diagnostyka sekcyjna anatomopatologiczna i sądowo-lekarska. PZWL 1968
38. Orlin J.R., Osen K., Hovig T.: Subdural compartment in pig: A morphologic study with blood and horseradish peroxidase infused subdurally. *Anat Rec* 1991; 230: 22-37
39. Pieśniak D., Jankowski Z., Raszeja S.: Ocena prawidłowości postępowania lekarskiego w świetle opinii wydanych na zlecenie wymiaru sprawiedliwości lub organów ścigania. *Pol Merk Lek* 2007; 23; 133; 47-51
40. Rascol M.M., Izard J.Y.: The subdural neurothelium of the cranial meninges in man. *Anat Rec* 1976; 186: 429-436
41. Raszeja S.: Błędy i niepowodzenia w postępowaniu lekarskim w przypadkach obrażeń czaszkowo-mózgowych w świetle opinii sądowo-lekarskich. *Arch Med Sad Krym* 1987; 36; 4; 240-246
42. Raszeja S.: Zweitzeitige Aortenruptur als gerichtsmmedizinisches Problem. *Dtsch Z Gesamte Gerichtl Med.* 1966; 58; 228-230
43. Reina M.A., De Leon Casasola O., Lopez A., De Andres J., Mora M., Fernandez A.: The origin of the spinal subdural space: ultrastructure findings. *Anesth Analg* 2002; 94; 991-995
44. Sarkar C., Lakhtakia R., Gill S.S., Sharma M.C., Mahapatra A.K., Mehta V.S.: Chronic subdural haematoma and the enigmatic eosinophil. *Acta Neurochir (Wien)* 2002; 144(10): 983-988
45. Sato S, Suzuki J: Ultrastructural observations of the capsule of chronic subdural hematoma in various clinical stages. *J Neurosurg* 1975; 43: 569-578
46. Saukko P., Knight B.: Knight's Forensic Pathology; Arnold London 2004
47. Sawicki W.: Histologia. PZWL 2005
48. Scaletta T.: Subdural hematoma; www.emedicine.com; 29.07.2008
49. Schachenmayr W., Friede R.L.: The origin of subdural neomembranes. I. Fine structure of neomembranes. *Am J Pathol* 1978; 92: 53-62
50. Scotti G., Terbrugge K., Melanson D. et al.: Evaluation of the age of subdural hematomas by computerized tomography. *J Neurosurg* 1977; 47: 311-5 (abstract)

51. Shono T., Inamura T., Morioka T., Matsumoto K., Suzuki S.O., Ikezaki K., Iwaki T., Fukui M.: Vascular endothelial growth factor in chronic subdural haematomas. *J Clin Neurosci* 2001; 8(5): 411-5
52. Tokoro K., Nakajima F., Yamataki A.: Acute spontaneous subdural hematoma of arterial origin. *Surg Neurol* 1988; 29: 159-163
53. Ty H.: Acute subdural hematoma: a five year review. *Acta Med Philipp* 1994; 30, 2, 4; 208-213
54. Vandenaabeele F., Creemers J., Lambrechts I.: Ultrastructure of the human spinal arachnoid mater and dura mater. *J Anat* 1996; 189; 417-430
55. Wilberger J.E., Harris M., Diamand D.L.: Acute subdural hematoma: morbidity and mortality related to timing of operative intervention. *J Trauma* 1990; 30; 733-736
56. Wilberger J.E., Harris M., Diamand D.L.: Acute subdural hematoma: morbidity, mortality, and operative timing. *J Neurosurg* 1991; 74; 212-218
57. Wintzen A.R.: The clinical cause of subdural hematoma. *Brain* 1980; 103: 855-867
58. Yamashima T, Friede RL: Why do bridging veins rupture into the virtual subdural space?. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1984; 47: 121–127
59. Yamashima T, Kubota T, Yamamoto S: Eosinophil degranulation in the capsule of chronic subdural hematomas. *J Neurosurg* 1985; 62: 257–260
60. Yamashima T, Yamamoto S: How do vessels proliferate in the capsule of a chronic subdural hematoma?. *Neurosurg* 1984; 15: 672–678
61. Yamashima T, Yamamoto S: The origin of inner membranes in chronic subdural hematomas. *Acta Neuropathol* 1985; 67: 219–225

X. ANEKS

X. ANEKS

Tabela A. Wyniki badania morfometrycznego liczby makrofagów w skrzepie, torebce krwiaka i w wewnętrznej części opony twardej a czas przeżycia po urazie głowy będącym przyczyną krwiaka podtwardówkowego.

Doba po urazie głowy	Badany element	Średnia liczba makrofagów przypadających na 1 mm ²	Zabieg/bez zabiegu NCH
1	krwiak	66	bez zabiegu
	opona	118	
	krwiak	736	zabieg
	opona	663	
2	krwiak	133	bez zabiegu
	opona	155	
	krwiak	328	zabieg
	opona	217	
3	krwiak	210	bez zabiegu
	opona	177	
	krwiak	364	zabieg
	opona	166	
4	krwiak	340	bez zabiegu
	opona	230	
	krwiak	635	zabieg
	opona	348	
5	krwiak	1105	zabieg
	opona	442	
6	krwiak	795	bez zabiegu
	opona	353	
	krwiak	619	zabieg
	opona	298	
7	krwiak	486	bez zabiegu
	opona	265	
	krwiak	950	zabieg
	opona	442	
9	krwiak	271	
	opona	315	
	torebka	928	
10	krwiak	331	
	opona	475	
	torebka	0	
12	krwiak	376	
	opona	596	
	torebka	0	
13	krwiak	729	
	opona	199	
	torebka	398	
14	krwiak	210	

	opona	287
	torebka	596
15	krwiak	552
	opona	320
	torebka	950
16	krwiak	320
	opona	210
	torebka	641
17	krwiak	265
	opona	147
	torebka	817
19	krwiak	232
	opona	199
	torebka	1027
20	krwiak	177
	opona	210
	torebka	729
21	krwiak	254
	opona	199
	torebka	928
23	krwiak	265
	opona	155
	torebka	1016
28	krwiak	751
	opona	309
	torebka	0
29	krwiak	88
	opona	133
	torebka	751
31	krwiak	243
	opona	199
	torebka	685
32	krwiak	133
	opona	221
	torebka	729
44	krwiak	66
	opona	110
	torebka	707
48	krwiak	199
	opona	133
	torebka	862
49	krwiak	0
	opona	353
	torebka	950
50	krwiak	0
	opona	243
	torebka	1303
57	krwiak	0
	opona	133
	torebka	1038
72	krwiak	0

	opona	199
	torebka	596
83	krwiak	243
	opona	177
	torebka	751
97	krwiak	0
	opona	199
	torebka	508
99	krwiak	0
	opona	243
	torebka	442
112	krwiak	0
	opona	110
	torebka	1038
144	krwiak	0
	opona	199
	torebka	773

Tabela B. Wyniki badania morfometrycznego liczby naczyń i pączków naczyniowych w skrzepie i w torebce krwiaka a czas przeżycia po urazie głowy będącym przyczyną krwiaka podtwardówkowego.

Doba po urazie głowy	Średnia liczba naczyń i pączków naczyniowych przypadających na 1 mm ² powierzchni krwiaka i torebki krwiaka			
	krwiak		torebka krwiaka	
	pączki	naczynia	pączki	naczynia
1				
2				
3				
4	111	199		
5			177	133
9	111		99	177
10	22	44	88	133
12	88	88	66	111
13	133	111	44	88
14	55	44	0	243
15	66	77	52	125
16	44	77	122	111
17	30	118	77	177
19	122	111	166	111
20	22	22	177	22
21	55	33	66	111
23	44	44	44	177
28	66	44	88	155
29	22	177	22	287
31	22	22	0	441
32			155	166
44	22	66	44	133
48	44	155	111	265
49			22	133
50			66	177
57			0	177
72			66	66
83			0	66
97			66	133
99			66	66
112			66	111
144			0	22