



Praca poglądowa
Review paper

Mariusz Kobek¹, Rafał Skowronek¹, Zbigniew Jankowski², Artur Pałasz³

Neurofilamenty a urazowe uszkodzenie mózgu Neurofilaments and traumatic brain injury

¹ Katedra i Zakład Medycyny Sądowej i Toksykologii Sądowo-Lekarskiej, Wydział Lekarski w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Polska

² Katedra i Zakład Medycyny Sądowej, Gdański Uniwersytet Medyczny, Polska

³ Zakład Histologii, Katedra Histologii i Embriologii, Wydział Lekarski w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Polska

¹ Chair and Department of Forensic Medicine and Medicolegal Toxicology, School of Medicine in Katowice, Medical University of Silesia in Katowice, Poland

² Chair and Department of Forensic Medicine, Medical University of Gdańsk, Poland

³ Department of Histology, Chair of Histology and Embryology, School of Medicine in Katowice, Medical University of Silesia in Katowice, Poland

Streszczenie

W neurotraumatologii medyczo-sądowej praktyczne znaczenie ma obiektywne ustalenie wieku – czasu powstania stłuczenia mózgu. Obecnie postęp immunohistochemii umożliwia badania elementów strukturalnych komórek, w tym także białek cytoszkieletu neuronu – neurofilamentów, które ze względu na swoje właściwości mogłyby zostać wykorzystane do określania wieku obrażeń mózgu w medycynie sądowej.

Celem niniejszej pracy jest przegląd aktualnego piśmiennictwa pod kątem badań dotyczących zmian zachodzących w neurofilamentach po urazie mózgu, zarówno w modelach zwierzęcych, jak i w ludzkim materiale biologicznym. Przegląd wykazał brak danych dotyczących czasowych zmian struktury neurofilamentów po urazie mózgu u ludzi, które mogłyby zostać wykorzystane do określania wieku obrażeń w medycynie sądowej.

Słowa kluczowe: neurostruktura, neurofilamenty, urazowe uszkodzenie mózgu, medycyna sądowa, immunohistochemia.

Abstract

Objective determination of the time of brain contusion is of key importance in medicolegal neurotraumatology. Currently, the progress of immunohistochemistry allows the study of structural elements of cells including neurofilaments, i.e. neuronal cytoskeletal proteins possessing properties that could be used for determining the age of brain injury in forensic medicine.

The purpose of this study was to review recently published literature with a focus on studies investigating changes which occur in neurofilaments after brain trauma, both in animal models and in human biological material. The review has shown a lack of data on temporal changes in neurofilament expression after human brain trauma which could be used for determining the age of injuries in forensic medicine.

Key words: neurostructure, neurofilaments, traumatic brain injury, forensic medicine, immunohistochemistry.

Urazowe uszkodzenie mózgu (*traumatic brain injury* – TBI) wg danych Światowej Organizacji Zdrowia jest jedną z głównych przyczyn śmierci oraz niepełnosprawności na świecie, szczególnie wśród dzieci i młodzieży [1]. Do najczęstszych przyczyn TBI należą: wypadki komunikacyjne, upadki i przemoc fizyczna.

W traumatologii sądowo-lekarskiej ważne, praktyczne znaczenie ma ustalenie wieku – czasu powstania stwierdzonych uszkodzeń ciała, ponieważ umożliwia to obiektywne określenie czasu urazu, który je spowodował, a tym samym i czasu ewentualnego przestępstwa. Dotyczy to także zmian urazowych wewnątrzczaszkowych, w tym ogniska stłuczenia mózgu (*brain contusion* – BC).

Ustalanie wieku BC znajduje się w sferze zainteresowań medyków sądowych i neuropatologów od początku ubiegłego stulecia. Jego podstawę stanowią zmiany morfologiczne w obrębie stłuczenia mózgu, będące skutkiem procesów resorpcji i organizacji.

W tym celu w praktyce analizuje się pourazowe zmiany w tkance nerwowej oraz towarzyszący im odczyn komórkowy (w tym reakcję gleju) i zmiany naczyniowe, stosując oprócz klasycznych metod histologicznych, także metody immunohistochemiczne – obiektywizujące i umożliwiające jednoznaczny identyfikację zmian i komórek pojawiających się w ognisku stłuczenia w miarę upływu czasu od urazu [2, 3].

Przykładem immunohistochemicznego markera uogólnionych zmian w tkance nerwowej jest odczyn z antygenem APP (*amyloid- β precursor protein*). Umożliwia on rozpoznanie tzw. rozlanego uszkodzenia aksonów (*diffuse axonal injury* – DAI; *traumatic axonal injury* – TAI), obarczonego poważnym rokowaniem, urazowego, wielogniskowego, makroskopowo niewidocznego uszkodzenia mózgu, zanim pojawią się klasyczne zmiany neuropatologiczne, tj. retrakcyjne kule aksonalne. Wzmószona ekspresja APP pojawia się już po 2–3 godzinach [2, 4]. Należy jednak pamiętać, że nie jest to zmiana specyficzna dla urazu.

W piśmiennictwie specjalistycznym dostępne są tabelaryczne zestawienia zależności charakteru stwierdzanych zmian morfologicznych od wieku stłuczenia mózgu, tj. czasu, jaki upłynął od urazu [4, 5]. Podsumowanie najważniejszych zależności w barwieniu standardowym i immunohistochemicznym przedstawiono w tabeli I. Ich stosowanie w pośmiertnej diagnostyce sądowo-lekarskiej wy-

According to World Health Organization data, traumatic brain injury (TBI) is one of the main causes of death and disability worldwide, particularly among children and adolescents [1]. The most common causes of TBI are traffic accidents, falls and physical violence.

The determination of age (i.e. time of occurrence) of bodily injuries plays an important practical role in medicolegal neurotraumatology because it helps to objectively determine when a victim sustained a trauma resulting in the injuries, and hence ascertain the time frame within which a crime, if any, was committed. This also applies to intracranial traumatic lesions, including the focus of brain contusion (BC).

Determining the age of BC has been in the focus of interest of forensic medicine specialists and neuropathologists since the beginning of the 20th century. The procedure of BC age determination is based on morphological changes within the brain contusion which arise from resorption and organization processes.

To this aim, the forensic practice analyzes post-traumatic lesions in the nervous tissue, and their accompanying cellular reaction (including the glial reaction) and vascular lesions, by applying conventional histological methods and immunohistochemical techniques – to objectivize and achieve an unambiguous identification of lesions and cells developing in the contusion focus along with the progression of time from the trauma [2, 3].

One of the immunohistochemical markers of generalized lesions in the nervous tissue is the APP (amyloid- β precursor protein) antigen reaction. It allows the identification of the so-called diffuse axonal injury (DAI) (traumatic axonal injury – TAI) – a traumatic multifocal and macroscopically undetectable brain injury associated with a very severe prognosis – prior to the emergence of classical neuropathological lesions, i.e. axonal retraction balls. Elevated APP expression is observed already after two or three hours [2, 4]. However, it needs to be noted that the change is not trauma-specific.

Specialist literature on the topic contains tabular statements listing correlations between the nature of identified morphological lesions and the age of brain contusion, i.e. the time elapsed from the trauma [4, 5]. A summary of the most important correlations in standard and immunohistochemical staining is listed in Table I. Their application in *post mortem*

Tabela I. Zmiany morfologiczne w zależności od wieku stłuczenia mózgu [2, 4, 5, 28, 37, 38]
Table I. Morphological changes depending on the age of brain contusion [2, 4, 5, 28, 37, 38]

Najkrótszy czas od urazu, po jakim stwierdzono zmianę Shortest time period from trauma to lesion identification	Zmiany mikroskopowe w barwieniu standardowym hematoksyliną i eozyną (H&E) Microscopic lesions determined by standard hematoxylin and eosin (H&E) staining	Zmiany mikroskopowe w barwieniu immunohistochemicznym Microscopic lesions determined by immunohistochemical staining	Piśmiennictwo Literature
natychmiast immediately	obecność erytrocytów presence of erythrocytes		[2]
natychmiast immediately	degeneracja neuronów (obkurczenie, wakuolizacja) degeneration of neurons (shrinkage, vacuolization)		[2, 5]
natychmiast immediately	obrzemiecie komórek glejowych glial cell swelling		[2]
> 10 min	zmniejszenie ogólnej barwliwości oligodendro- i astrogleju decrease in overall staining intensity of oligodendroglial and astroglial cells		[2]
10 min		obecność granulocytów CD15-pozytywnych (neutrofilów) presence of CD15-positive granulocytes (neutrophils)	[5]
> 45 min		apoptoza stwierdzona techniką TUNEL apoptosis detected by TUNEL assay	[5]
1 h	obecność inkrustacji w neuronach presence of neuronal incrustations		[2]
> 1 h	„czerwone neurony” (rezultat obkurczenia, silnej eozynofilii i pyknozy jąder) “red neurons” (effect of shrinkage, severe eosinophilia and nuclear pyknosis)		[37, 38]
2 h		rozlane uszkodzenie aksonalne (DAI) stwierdzone przeciwciałem anti-APP diffuse axonal injury (DAI) detected by anti-APP (amyloid precursor protein) antibody	[5]
> 3 h		obecność odczynu na apolipoproteinę E w półkuli ipsilateralnej presence of apolipoprotein E reaction in the ipsilateral hemisphere	[5]
3 h		obecność naczyń FVIII-pozytywnych presence of FVIII-positive vessels	[2]
3 h		spadek immunoreaktywności astrocytów GFAP-pozytywnych decrease in immunoreactivity of GFAP (glial fibrillary acidic protein)-positive astrocytes	[5]

Tabela I. Cd.
Table I. Cont.

Najkrótszy czas od urazu, po jakim stwierdzono zmianę Shortest time period from trauma to lesion identification	Zmiany mikroskopowe w barwieniu standardowym hematoksyliną i eozyną (H&E) Microscopic lesions determined by standard hematoxylin and eosin (H&E) staining	Zmiany mikroskopowe w barwieniu immunohistochemicznym Microscopic lesions determined by immunohistochemical staining	Piśmiennictwo Literature
3,1 h		obecność gleju α 1-ACT- -pozytywnego presence of α 1-ACT (α 1-antichymotrypsin)-positive glial cells	[2]
8 h	obecność erytrofagów presence of erythrophages		[5]
10 h	obrzemie aksonów axonal swelling		[2, 5]
11 h		obecność makrofagów CD68-pozytywnych presence of CD68-positive macrophages	[4, 5]
12 h	obrzemie jąder komórek glejowych swelling of glial cell nuclei		[2]
12 h	obrzemie komórek śródbłonka swelling of endothelial cells		[38]
12 h	neuronofagia (fagocytoza neuronów) neuronophagia (phagocytosis of neurons)		[2]
> 12 h	prolifracja naczyń krwionośnych vascular proliferation		[2, 5]
17 h	obecność lipidofagów (makrofagów obładowanych lipidami) presence of lipophages (lipid laden macrophages)		[4]
18 h	obecność limfocytów presence of lymphocytes		[2]
22 h		obecność gleju wimentyna- -pozytywnego presence of vimentin-positive glial cells	[2]
1 dzień 1 day	obecność sferoidów (na poprzecznym przekroju widocznych jako kule retrakcyjne presence of spheroids (seen on cross- section as axonal retraction balls)		[2, 38]
1 dzień 1 day		wzrost immunoreaktywności astrocytów GFAP-pozytywnych increase in immunoreactivity of GFAP-positive astrocytes	[2]
> 1 dnia > 1 day	obecność astrocytów protoplazmatycznych presence of protoplasmic astrocytes		[2]

Tabela I. Cd.

Table I. Cont.

Najkrótszy czas od urazu, po jakim stwierdzono zmianę Shortest time period from trauma to lesion identification	Zmiany mikroskopowe w barwieniu standardowym hematoksyliną i eozyną (H&E) Microscopic lesions determined by standard hematoxylin and eosin (H&E) staining	Zmiany mikroskopowe w barwieniu immunohistochemicznym Microscopic lesions determined by immunohistochemical staining	Piśmiennictwo Literature
1,1 dnia 1.1 day		obecność komórek LCA-pozytywnych presence of LCA-positive cells	[2, 5]
1,6 dnia 1.6 day		obecność naczyń tenascyna-pozytywnych presence of tenascin-positive vessels	[2]
> 2 dni > 2 days		obecność limfocytów T CD3-pozytywnych presence of CD3-positive T cells	[2, 5]
> 2 dni > 2 days	obecność syderofagów (makrofagów zawierających hemosyderynę) presence of siderophages (hemosiderin-containing macrophages)		[2]
3 dni 3 days	prolifracja gleju (glejoza reaktywna) glial proliferation (reactive gliosis)		[2]
3,1 dnia 3.1 days		obecność gleju MIB-1-pozytywnego presence of MIB-1-positive glial cells	[2]
3,7 dnia 3.7 days		obecność komórek UCHL-1-pozytywnych presence of UCHL-1-positive cells	[2]
4,2 dnia 4.2 days		obecność ceroidu (lipopigmentu) presence of ceroid (lipopigment)	[2, 5]
4,4 dnia 4.4 days	obecność fibroblastów presence of fibroblasts		[2]
4 dni 4 days	obecność włókien kolagenowych presence of collagen fibres		[2]
> 5 dni > 5 days	obecność astrocytów zawierających hemosyderynę presence of hemosiderin-containing astrocytes		[2]
6 dni 6 days	glejoza włóknista fibrous gliosis		[2, 4]
6 dni 6 days	mineralizacja neuronów <i>in situ</i> ferrugination of neurons <i>in situ</i>		[4]
> 6 dni > 6 days	obecność hematoidyny (skrytalizowanej bilirubiny) presence of hematoidin (crystallized bilirubin)		[2, 5]
6,8 dnia 6.8 days		obecność naczyń trombomodulina-pozytywnych presence of thrombomodulin-positive vessels	[2]

Najkrótszy czas od urazu, po jakim stwierdzono zmianę Shortest time period from trauma to lesion identification	Zmiany mikroskopowe w barwieniu standardowym hematoksyliną i eozyną (H&E) Microscopic lesions determined by standard hematoxylin and eosin (H&E) staining	Zmiany mikroskopowe w barwieniu immunohistochemicznym Microscopic lesions determined by immunohistochemical staining	Piśmiennictwo Literature
7 dni 7 days		obecność naczyń MIB-1-pozytywnych presence of MIB-1-positive vessels	[2]
7 dni 7 days		obecność gleju tenascyna-pozytywnego presence of tenascin-positive glial cells	[2]
10 dni 10 days	obecność astrocytów gemistocytarnych (tuczno komórkowych) presence of gemistocytic astrocytes		[28]

FVIII – czynnik VIII; $\alpha 1$ -ACT – $\alpha 1$ -antychymotrypsyna; *GFAP* – kwaśne białko włókienkowe; *LCA* – wspólny antygen leukocytarny; *UCHL-1* – C-końcowa hydrolaza L1 ubikwityny; *MIB-1* – ligaza ubikwityny E3

FVIII – factor VIII; $\alpha 1$ -ACT – $\alpha 1$ -antichymotrypsin; *GFAP* – glial fibrillary acidic protein; *LCA* – leukocyte common antigen; *UCHL-1* – ubiquitin C-terminal hydrolase 1; *MIB-1* – mindbomb E3 ubiquitin protein ligase 1

kazało, że są one stosunkowo mało dokładne i obarczone ryzykiem popełnienia błędu diagnostycznego. Ocena różnych elementów morfologicznych w ognisku stłuczenia mózgu zwiększa dokładność analizy, a tym samym zmniejsza zakres popełnianego błędu. Obecnie postęp immunohistochemii umożliwia badanie elementów strukturalnych komórek, w tym także białek cytoszkieletu neuronu – neurofilamentów, które ze względu na swoje właściwości (to struktury anatomiczne stosunkowo odporne na działanie endogennych proteaz i pośmiertne procesy autolizy w porównaniu z innymi białkami, np. enzymami) mogłyby zostać wykorzystane do określania wieku obrażeń mózgu w medycynie sądowej.

Celem niniejszej pracy jest przegląd aktualnego piśmiennictwa pod kątem badań dotyczących zmian zachodzących w neurofilamentach po urazie mózgu, zarówno w modelach zwierzęcych, jak i w ludzkim materiale biologicznym.

Neurofilamenty

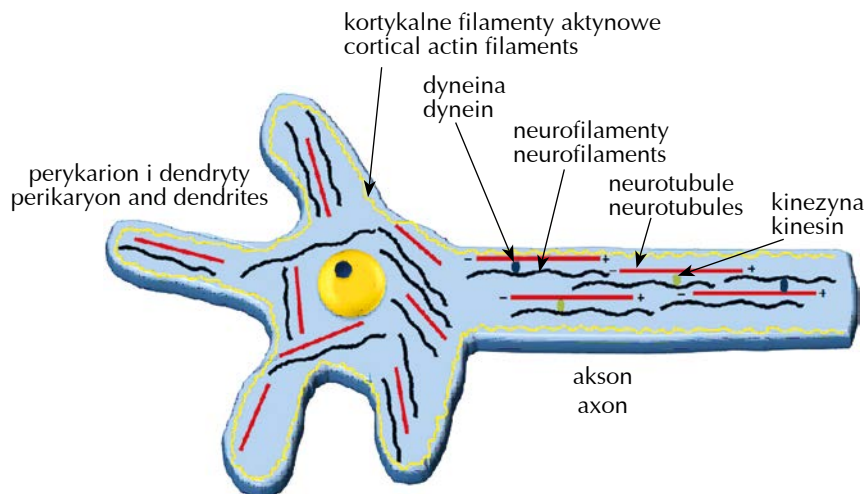
Do najważniejszych białek strukturalnych cytoszkieletu komórki nerwowej (neuronu) zalicza się: filamenty aktynowe (mikrofilamenty tworzące złożony przestrzenny układ, tzw. kortykalną sieć aktynową), mikrotubule (neurotubule) oraz filamenty pośrednie (tzw. neurofilamenty – NF), pełniące funkcję podporową w strukturze komórki [6, 7].

medicolegal diagnostics has shown them to be relatively inaccurate and prone to diagnostic errors. An evaluation of various morphological elements in the BC focus increases the accuracy of analysis and hence reduces the error range. At present, advances in immunohistochemistry have made it possible to investigate structural elements of cells, including neuronal cytoskeletal proteins – neurofilaments. Due to their properties (they are anatomical structures exhibiting a relative resistance to the activity of endogenous proteases and post-mortem processes of autolysis compared to other proteins such as enzymes), they could be used for determining the age of brain injuries in forensic medicine.

The purpose of this study was to review recently published literature with a focus on studies investigating changes which occur in neurofilaments after brain trauma, both in animal models and in human biological material.

Neurofilaments

The most important neuronal cytoskeletal structural proteins are: actin filaments (microfilaments forming a complex spatial system – the so-called cortical actin network), microtubules (neurotubules) and intermediate filaments (neurofilaments – NF), performing a supportive function in the cell structure [6, 7].



Ryc. 1. Schemat cytoszkieletu neuronu
Fig. 1. Representation of neuronal cytoskeleton

Neurofilamenty są obecne zarówno w ciele komórki nerwowej (gdzie są syntetyzowane), jak i w jej wypustkach – dendrytach i aksonie (ryc. 1). Wchodzące w ich skład trzy rodzaje polipeptydów powodują ich zróżnicowanie na podjednostki o różnej masie molekularnej: lekkie o masie 68–70 kDa (NF-L), średnie o masie 145–160 kDa (NF-M) i ciężkie o masie 200–220 kDa (NF-H). Neurofilamenty: NF-L, NF-M i NF-H, są równomiernie rozmieszczone w ciele komórki nerwowej i wypustkach w obrębie ośrodkowego (OUN) i obwodowego układu nerwowego [8]. Urazy mózgu powodują mechaniczną deformację tkanki nerwowej, w tym cytoszkieletu złożonego z neurofilamentów, co może odgrywać główną rolę m.in. w pourazowym przerwaniu transportu aksonalnego [9].

Neurofilamenty mogą być badane na poziomie tkankowym metodami immunohistochemicznymi, z użyciem specyficznych przeciwciał, a także w płynie mózgowo-rdzeniowym metodą immunoenzymatyczną (ELISA) lub immunochromatograficzną (Western blot) [7, 8].

Badania na zwierzętach

Analiza dostępnego piśmiennictwa wskazuje, że dotychczasowe badania zmian czasowych zachodzących w miejscach urazowego uszkodzenia mózgu w obrębie NF oparto wyłącznie na zwierzęcych modelach doświadczalnych (obiektami były szczury,

Neurofilaments are present both within the neuron body (where they are synthesized) and in the neurites: dendrites and axon (Fig. 1). They are composed of three types of polypeptides which cause their differentiation into subunits of different molecular mass: light with a mass of 68–70 kDa (NF-L), medium with a mass of 145–160 kDa (NF-M) and heavy with a mass within the 200–220 kDa range (NF-H). Neurofilaments: NF-L, NF-M and NF-H, are evenly distributed through the body of the neuron and neurites within the central nervous system (CNS) and the peripheral nervous system [8]. Brain trauma causes a mechanical deformation of the nerve tissue including the neurofilament cytoskeleton, which can play a major role e.g. in post-traumatic interruption of axonal transport [9].

Neurofilaments can be studied at the tissue level by immunohistochemical methods using specific antibodies, and in the cerebrospinal fluid by means of immunoenzymatic (ELISA) or immunochromatographic (Western blot) methods [7, 8].

Animal studies

A review of available literature indicates that research conducted so far on the timing of lesions developing at the site of traumatic brain injury within NF has been based exclusively on animal experimental models, on objects including rats, mice, pigs and cats. The majority of studies have investigated

myszy, świnię, koty). W większości przypadków badano podjednostki ciężkie (NF-H) i lekkie (NF-L). Z badań tych wynika, iż NF w miejscu uszkodzenia mózgu stopniowo zanikają, a całkowity ich zanik obserwowano po 1–2 tygodniach po urazie [10–13].

Badania doświadczalne wykazały, że TBI skutkuje utratą białek cytoszkieletu lub związanych z cytoszkieletem, takich jak: NF68, NF200, NF300, spektryny czy MAP2. Rearanżacje cytoszkieletu neuronu u szczurów obserwowano już 3 godziny po urazie. W okresie pourazowym prawidłowa odbudowa NF i warunkowanej przez nie cytoarchitektoniki ułatwia rekonwalescencję neuronu, podczas gdy nieprawidłowe nasilenie zmian struktury NF może powodować śmierć neuronów, w tym opóźnioną, z dysfunkcją OUN. Zmiany w obrębie NF, zarówno w podjednostkach lekkich, jak i ciężkich, obserwowano w przypadkach ostrego niedokrwienego oraz urazowego uszkodzenia mózgu w zwierzęcych modelach doświadczalnych [14, 15].

U ludzi i zwierząt z TBI zmiany morfologiczne w obrębie NF występowały w przypadkach wspomnianego już powyżej rozlanego uszkodzenia aksonów, a u zwierząt także w ogniskach stłuczenia mózgu, współistniejących z wybiórczą martwicą neuronów w korze mózgu, a zwłaszcza w hipokampie, okolicy szczególnie wrażliwej zarówno na epizody hipoksji, jak i szerokie spektrum czynników uszkadzających [10–13, 16–24].

Należy zauważyć, że istnieją również takie prace, w których obserwowano nie spadek, lecz wzrost immunoreaktywności neurofilamentów po urazie [25, 26]. Li i wsp. stwierdzili stopniowy, statystycznie istotny wzrost immunoreaktywności (średniej gęstości) neurofilamentów lekkich – NF-L – wraz z upływem czasu po urazie (do 72 godzin) w takich strukturach mózgu szczura, jak: ciało modzelowate, torebka wewnętrzna i zewnętrzna czy drogi piramidowe [26].

Badania na materiale ludzkim

Autorzy niniejszego przeglądu nie znaleźli w literaturze wyników badań wpływu TBI na zmiany w strukturze neurofilamentów w funkcji czasu u ludzi, a zwłaszcza wyników badań analizujących materiał pobrany *post mortem*. Na uwagę zasługują niedawno opublikowane wyniki badań zespołu czeskiego Vajtr i wsp., którzy oznaczali białka: S-100B, GFAP i hiperfosforylowane neurofilamenty,

heavy (NF-H) and light (NF-L) subunits. From these studies it follows that NF present at the site of brain injury gradually decline, and disappear completely approx. 1–2 weeks after the trauma [10–13].

Experimental studies have demonstrated that TBI results in the loss of cytoskeletal proteins or cytoskeleton-associated proteins such as NF68, NF200, NF300, spectrins or MAP2. Rearrangements of the neuronal cytoskeleton in rats have been observed as early as 3 hours after a trauma. In the post-traumatic period, normal reconstruction of NF and NF-dependent cytoarchitectonics facilitates neuronal recovery, whereas abnormal intensification of changes in the NF structure can lead to neuronal death, also in a delayed manner, with CNS dysfunction. Changes in NF, both in light and heavy subunits, have been observed in cases of acute ischaemic and traumatic brain injuries in animal experimental models [14, 15].

In people and animals with TBI, morphological changes within NF have been found to occur in cases of the above-mentioned diffuse axonal injury, an in animals also in brain contusion foci, coexisting with selective neuronal necrosis in the brain cortex and, particularly, in the hippocampus – a region which is especially sensitive both to hypoxic episodes and to a wide spectrum of damaging factors [10–13, 16–24].

It should be noted that there are also studies which, instead of a decrease, have demonstrated a post-traumatic increase in neurofilament immunoreactivity [25, 26]. Li *et al.* have found a gradual, statistically significant increase in immunoreactivity (average density) of light neurofilaments (NF-L) along with the lapse of time after the trauma (up to 72 h) in selected structures of rat brains including the corpus callosum, internal and external capsules or pyramidal tracts [26].

Studies of human material

The authors of the present review have not found in literature any results of studies investigating the effects of TBI on changes in the neurofilament structure in the function of time in people, particularly results of studies analyzing material collected *post mortem*. Some important findings have recently come from studies published by the Czech research team Vajtr *et al.* who analyzed S-100B and GFAP

metodami immunohistochemicznymi (w tkankach) i biochemicznymi (w surowicy) w materiale biologicznym pobranym od pacjentów, którzy doznali rozlanych lub ograniczonych uszkodzeń mózgu – żywych, hospitalizowanych przez 10 dni, oraz pacjentów, którzy zmarli [27]. Stężenie NF-H w surowicy stopniowo się zwiększało wraz z upływem kolejnych dni od urazu, co wskazuje na postępującą dezintegrację cytoszkieletu i uwalnianie NF-H do krwi. Przez cały analizowany przez badaczy okres (10 dni od urazu) stężenie NF-H w surowicy było większe u osób z DAI w porównaniu z osobami z ograniczonym urazem mózgu.

Czynniki warunkujące wartość wyniku badania neuroimmunochemicznego

Należy mieć świadomość obecności licznych czynników warunkujących wiarygodność i tym samym przydatność wyniku badania neuroimmunochemicznego. Powszechnie wiadomo, że OUN jest szczególnie wrażliwy na działanie różnego rodzaju czynników uszkodzających: mechanicznych, ischemicznych czy toksycznych [28]. Z uszkodzonej tkanki nerwowej uwalniane są różnego rodzaju substancje wewnątrzkomórkowe, w tym białka, co przy przerwaniu bariery krew–mózg prowadzi w efekcie do zwiększenia ich stężenia w płynie mózgowo-rdzeniowym oraz we krwi [29–31]. Pierwotnie ograniczony uraz może wtórnie doprowadzić do uogólnionych zmian w tkance nerwowej (np. DAI), zatem przy krytycznej interpretacji wyniku badań neuroimmunochemicznych należy dokładnie przeanalizować dostępne dane dotyczące charakteru i lokalizacji urazu pierwotnego mózgu, a także obecności urazów wtórnych (obrzęk, efekt masy, podwyższone ciśnienie wewnątrzczaszkowe, wgłobienia, respiratoroterapia), które mogą dodatkowo wpływać na globalną ekspresję genów i białek [32]. Zasadne wydaje się również weryfikowanie (optymalnie immunohistochemicznie przeciwciałem anti-APP, skierowanym przeciw białku prekursora β -amyloidu) obecności DAI w każdym przypadku podejrzenia urazu czaszkowo-mózgowego, ponieważ jak już wspomniano, DAI może powodować zmiany w ekspresji białek, w tym neurofilamentów [6, 17, 27]. Ekspresja neurofilamentów i stopień ich fosforylacji (defosforylacja zwiększa wrażliwość neurofilamentów na degradację enzymatyczną

proteins and hyperphosphorylated neurofilaments using immunohistochemical methods (in tissues) and biochemical techniques (in blood serum) in biological material harvested from patients who had suffered diffuse or focal brain injury – living, hospitalized for 10 days, and patients who had died [27]. The concentration of NF-H in the blood serum was found to increase gradually with the lapse of days after the trauma, which suggests a progressive disintegration of the cytoskeleton and the release of NF-H into the blood. During the entire period analyzed by the researchers (10 days after the trauma), the blood serum concentration of NF-H was higher in patients with DAI than in those with focal brain injury.

Factors determining the result of neuroimmunochemical analysis

It is very important to realize that there are multiple factors influencing the reliability and hence the usefulness of neuroimmunochemical analysis results. It is commonly known that the CNS is highly sensitive to the effects of various damaging factors: mechanical, ischaemic and toxic [28]. Damaged nervous tissue releases intracellular substances of different types, including proteins. Their concentration in the cerebrospinal fluid and in the blood increases as a result of rupture of the blood-brain barrier [29–31]. An originally focal injury can, in a secondary process, lead to generalized lesions within the nervous tissue (e.g. DAI). Consequently, a critical interpretation of results of neuroimmunochemical analyses must involve an in-depth examination of available data describing the nature and location of the primary brain injury, and the presence of secondary injuries (oedema, mass effect, elevated intracranial pressure, herniation, respiratory therapy) which can additionally influence the global expression of genes and proteins. It also seems justified to verify – optimally by immunohistochemical means, using anti-APP antibody against β -amyloid precursor protein – the presence of DAI in every case of suspected craniocerebral trauma because, as mentioned above, DAI can cause changes in the expression of proteins, including neurofilaments [6, 17, 27]. The expression of neurofilaments and their degree of phosphorylation (dephosphorylation increases the sensitivity of neurofilaments to enzymatic degradation involving calpains) can also be

z udziałem kalpain) może być zmieniona w chorobach mózgu (zapalnych i neurodegeneracyjnych, takich jak np. stwardnienie rozsiane czy choroba Alzheimera), dlatego istotne jest szczegółowe zapoznanie się z dokumentacją medyczną zmarłego, jeśli takowa jest dostępna [5, 7, 23, 33].

Podczas oceny materiału sekcyjnego należy wziąć pod uwagę stopień zaawansowania zmian pośmiertnych (autoliza, gnicie) – im bardziej są nasilone, tym większe jest ryzyko uszkodzenia (proteolizy) białek i otrzymania zafałszowanego wyniku. Spośród neurofilamentów za najbardziej odporne na degradację uważane są neurofilamenty ciężkie – NF-H, co wynika z największego stopnia fosforylacji i zdolności do wiązania kalmoduliny [19, 34]. Geddes i wsp. w modelu zwierzęcym stwierdzili pośmiertną akumulację neurofilamentów w perikaryonie, dlatego zalecają szczególnie ostrożną interpretację tego procesu w materiale pośmiertnym [23]. Warto pamiętać, że mikroskopowa identyfikacja stłuczenia mózgu jest możliwa nawet do 3,5 tygodnia od daty zgonu, po ekshumacji zwłok [35].

Podsumowanie

W dostępnej literaturze specjalistycznej brakuje danych dotyczących czasowych zmian struktury cytoszkieletu neuronu po urazie mózgu, które mogłyby zostać wykorzystane praktycznie do określania wieku obrażeń w medycynie sądowej. Na fakt ten zwrócił uwagę również Hausmann [2]. Dlatego też autorzy niniejszej pracy podjęli próbę wykorzystania i określenia możliwości praktycznego zastosowania badania immunohistochemicznego zmian pourazowych w obrębie struktur morfologicznych komórek nerwowych – u osób zmarłych w różnym czasie po doznanym urazie czaszkowo-mózgowym [36]. Oryginalne wyniki tych badań będą przedmiotem kolejnych publikacji.

Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.

altered in some brain diseases (of inflammatory and neurodegenerative types, such as multiple sclerosis or Alzheimer's disease). Therefore, it is absolutely vital to thoroughly examine the dead patient's medical records, if they are available [5, 7, 23, 33].

An assessment of post-mortem material should take into consideration the advancement of post-mortem lesions (autolysis, decay): the more severe they are, the greater the risk of damage (proteolysis) to proteins and receiving false results. Heavy neurofilaments (NF-H) are considered to be the most resistant to degradation of all neurofilament types because of their highest degree of phosphorylation and ability to bind calmodulin [19, 34]. Geddes *et al.* have found post-mortem accumulation of neurofilaments in the perikaryon in an animal model. Consequently, they recommend a particularly cautious interpretation of this process in *post mortem* material [23]. Importantly, microscopic identification of brain contusion is possible for up to 3.5 weeks from the date of death, after performing exhumation [35].

Conclusions

Specialist medical literature does not contain any data about the timing of changes in neuronal cytoskeleton occurring after cerebral trauma, which could be practically applied for evaluating the age of injuries in forensic medicine. The fact has also been highlighted by Hausmann [2]. This is why the authors of the present study have undertaken an attempt to apply and assess the possibilities of using immunohistochemical analysis of post-traumatic lesions within morphological structures of nerve cells – in individuals who died at different time points after suffering craniocerebral trauma [36]. Original results of these studies will be discussed in forthcoming publications.

The authors declare no conflict of interest.

Piśmiennictwo

References

1. <http://www.who.int> (31.05.2014).
2. Hausmann R. Timing of Cortical Contusions in Human Brain Injury. Morphological Parameters for a Forensic Wound-Age Estimation. W: Forensic Pathology Reviews, Vol. 1. Tsokos M (red.). Humana Press Inc: Totowa, New Jersey 2004; 53-75.
3. Wang Q, Michiue T, Maeda H. Immunohistochemistry of Neuronal Apoptosis in Fatal Traumas: The Contribution of Forensic Molecular Pathology in Medical Science. W: Apoptosis and Medicine. Ntuli TM (red.). InTech, Rijeka 2012; 247-276.



4. Oemichen M, Auer RN, König HG. Forensic neuropathology and associated neurology. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2006; 190-194.
5. Dettmeyer RB. Forensic histopathology. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2011; 415-417.
6. Smith DH, Uryu K, Saatman KE, Trojanowski JQ, McIntosh T. Protein accumulation in traumatic brain injury. *Neuromol Med* 2003; 4: 59-72.
7. Gresle MM, Butzkueven H, Shaw G. Neurofilament proteins as body fluid biomarkers of neurodegeneration in multiple sclerosis. *Mult Scler Int* 2011; 2011: 315406.
8. Trojanowski JQ, Walkenstein N, Lee VM. Expression of neurofilament subunits in neurons of the central and peripheral nervous system: an immunohistochemical study with monoclonal antibodies. *J Neuroscience* 1986; 6: 650-660.
9. Hamberger A, Huang YL, Zhu H, Bao F, Ding M, Blennow K, Olsson A, Hansson HA, Viano D, Haglid KG. Redistribution of neurofilaments and accumulation of beta-amyloid protein after brain injury by rotational acceleration of the head. *J Neurotrauma* 2003; 20: 169-178.
10. Postmantur RM, Newcomb JK, Kampl A, Hayes RL. Light and confocal microscopic studies of evolutionary changes in neurofilament proteins following cortical impact injury in the rat. *Exp Neurology* 2000; 161: 15-26.
11. Huh J, Laurer HL, Raghupathi R, Helfaer MA, Saatman KE. Rapid loss and partial recovery of neurofilament immunostaining following focal brain injury in mice. *Exp Neurology* 2002; 175: 198-208.
12. Saatman KE, Graham DI, McIntosh TK. The neuronal cytoskeleton is at risk after mild and moderate brain injury. *J Neurotrauma* 1998; 15: 1047-1058.
13. Smith DH, Meaney DF. Axonal damage in traumatic brain injury. *Neuroscientist* 2000; 6: 483-495.
14. Ogata N, Yonekawa Y, Taki W, Kannagi R, Murachi T, Hamakubo T, Kikuchi H. Degradation of neurofilament protein in cerebral ischemia. *J Neurosurgery* 1989; 70: 103-107.
15. Aronowski J, Ki-Hyun C, Strong R, Grotta JC. Neurofilament proteolysis after focal ischemia; when do cells die after experimental stroke? *J Cerebral Blood Flow Metabolism* 1999; 19: 652-660.
16. Posmantur R, Hayes RL, Dixon CE, Taft WC. Neurofilament 68 and neurofilament 200 protein levels decrease after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 1994; 11: 533-545.
17. Sherriff FE, Bridges LR, Gentleman SM, Sivaloganathan S, Wilson S. Markers of axonal injury in post mortem human brain. *Acta Neuropathol* 1994; 88: 433-439.
18. Grady MS, McLaughlin MR, Christman CW. The use of antibodies targeted against the neurofilament subunits for the detection of diffuse axonal injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 1993; 21: 143-152.
19. Serbest G, Burkhardt M, Siman R, Raghupathi R, Saatman KE. Temporal profiles of cytoskeletal protein loss following traumatic axonal injury in mice. *Neurochemical Research* 2007; 32: 2006-2014.
20. DiLeonardi AM, Huh J, Raghupathi R. Impaired axonal transport and neurofilament compaction occur in separate populations of injured axons following diffuse brain injury in the immature rat. *Brain Res* 2009; 1263: 174-182.
21. Markos S. Neurofilament dephosphorylation and microglial activation following traumatic brain injury in the immature rat. *TCNJ J Student Scholarship* 2011; 13: 1-10.
22. King CE, Canty AJ, Vickers JC. Alterations in neurofilaments associated with reactive brain changes and axonal sprouting following acute physical injury to the rat neocortex. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2001; 27: 115-126.
23. Geddes JW, Bondada V, Tekirian TL, Pang Z, Siman RG. Perikaryal accumulation and proteolysis of neurofilament proteins in the post-mortem rat brain. *Neurobiol Aging* 1995; 16: 651-660.
24. Wang H, Rao G, Zhu S, Qin Q. A study of HSP70 and NF in brain contusion timing. *Fa Yi Xue Za Zhi* 2000; 16: 132-134.
25. Yaghamai A, Povlishock J. Traumatically induced reactive change as visualized through the use of monoclonal antibodies targeted to neurofilament subunits. *J Neuropathol Exp Neurol* 1992; 51: 158-176.
26. Li S, Sun Y, Shan D, Feng B, Xing J, Duan Y, Dai J, Lei H, Zhou Y. Temporal profiles of axonal injury following impact acceleration traumatic brain injury in rats – a comparative study with diffusion tensor imaging and morphological analysis. *Int J Legal Med* 2013; 127: 159-167.
27. Vajtr D, Benada O, Linzer P, Sámal F, Springer D, Strejc P, Beran M, Průša R, Zima T. Immunohistochemistry and serum values of S-100B, glial fibrillary acidic protein, and hyperphosphorylated neurofilaments in brain injuries. *Soud Lek* 2012; 57: 7-12.
28. Itabashi HJ, Andrews JM, Tomiyasu U, Erlich SS, Sathyavagiswaran L. Forensic Neuropathology. A Practical Review of the Fundamentals. Academic Press, London 2007.
29. Ahmed F, Gyorgy A, Kamnaksh A, Ling G, Tong L, Parks S, Agoston D. Time-dependent changes of protein biomarker levels in the cerebrospinal fluid after blast traumatic brain injury. *Electrophoresis* 2012; 33: 3705-3711.
30. Gyorgy A, Ling G, Wingo D, Walker J, Tong L, Parks S, Januszkiwicz A, Baumann R, Agoston DV. Time-dependent changes in serum biomarker levels after blast traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2011; 28: 1121-1126.
31. Vajtr D, Průša R, Houst'ava L, Sámal F, Kukacka J, Páchl J. Biochemical and immunohistochemical markers of brain injury. *Soud Lek* 2006; 51: 36-41.
32. Michael DB, Byers DM, Irwin LN. Gene expression following traumatic brain injury in humans: analysis by microarray. *J Clin Neurosci* 2005; 12: 284-290.



33. Yuan A, Rao MV, Veeranna, Nixon RA. Neurofilaments at a glance. *J Cell Sci* 2012; 125 (Pt 14): 3257-3263.
34. Johnson GV, Greenwood JA, Costello AC, Troncoso JC. The regulatory role of calmodulin in the proteolysis of individual neurofilament proteins by calpain. *Neurochem Res* 1991; 16: 869-873.
35. Grellner W, Glenewinkel F. Exhumations: synopsis of morphological and toxicological findings in relation to the post-mortem interval. Survey on a 20-year period and review of the literature. *Forensic Sci Int* 1997; 90: 139-159.
36. Kobek M, Jankowski Z, Szala J, Gąszczyk-Ożarówski Z, Pałasz A, Skowronek R. Morphological approach to brain contusion-timing in forensic medicine – initial results from the study on the deceased. *Neuronus 2014 – IBRO and IRUN Neuroscience Forum, Kraków 25-27.04.2014, Abstract book*, p. 48.
37. Leestma J. *Forensic Neuropathology*. CRC Press Taylor and Francis Group, New York 2009; 534-542.
38. Cummings PM, Trelka DP, Springer KM. *Atlas of forensic histopathology*. Cambridge University Press, Cambridge 2011; 14-18.

Adres do korespondencji

dr n. med. Mariusz Kobek
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej
i Toksykologii Sądowo-Lekarskiej
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
ul. Medyków 18
40-752 Katowice, Polska
e-mail: mariusz.kobek@wp.pl

Address for correspondence

Mariusz Kobek, PhD, MD
Chair and Department of Forensic
Medicine and Medicolegal Toxicology
Medical University of Silesia in Katowice
Medyków 18
40-752 Katowice, Poland
e-mail: mariusz.kobek@wp.pl