



Praca poglądowa
Review paper

Mariusz Kobek¹, Rafał Skowronek¹, Zbigniew Jankowski², Artur Pałasz³

Angiogeneza w stłuczeniu mózgu Angiogenesis in brain contusion

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

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

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

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

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

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

Streszczenie

W medycynie sądowej praktyczne znaczenie ma obiektywne i w miarę możliwości jak najdokładniejsze ustalenie wieku – czasu powstania stłuczenia mózgu. W poprzedniej pracy autorzy omówili rolę w tym zakresie białek cytoszkieletu neuronu – neurofilamentów. Celem niniejszej pracy jest przedstawienie możliwości wykorzystania zjawiska angiogenezy w stłuczeniach mózgu do określenia wieku stłuczeń, na podstawie dotychczasowych badań na modelach zwierzęcych oraz w materiale ludzkim. W aktualnym przeglądzie piśmiennictwa nie wykazano jednoznacznych danych, które pozwoliłyby stosować zmiany morfologiczne w angiogenezie do ustalania wieku stłuczenia mózgu w praktyce sądowo-lekarskiej. Z tych powodów uzasadnione jest podjęcie szerszych badań na materiale ludzkim.

Słowa kluczowe: zmiany naczyniowe, urazowe uszkodzenie mózgu, gęstość mikronaczyń, barwienie immunohistochemiczne.

Abstract

In the forensic medicine, objective and, if possible, the most accurate determination of the age – the time of the brain contusion, has practical significance. In our previous work, we discussed the importance of the neuron cytoskeleton proteins – neurofilaments, in this area. The purpose of this paper is to present the possibilities of using the phenomenon of angiogenesis in the brain contusions, to determine its age, on the basis of previous studies in animal models and in human biological material. The current review of the literature showed no conclusive data that would allow use morphological changes in angiogenesis to determine the age of the brain contusion in forensic medical practice. For these reasons, it is reasonable to take a broader research on the human material.

Key words: traumatic brain injury, vascular reactions, microvessel density, immunohistochemical staining.

Wprowadzenie

Angiogeneza jest procesem powstawania nowych naczyń włosowatych – kapilar – w czasie życia osobniczego po urodzeniu. Proces ten po raz pierwszy opisał Judah Folkman w 1971 r. [1]. Tra-

Introduction

Angiogenesis is the process of formation of new capillary blood vessels during ontogeny after birth. The process was first described by Judah Folkman in 1971 [1]. It is traditionally differentiated from the

dycyjnie odróżnia się go od procesu waskulogenezy zachodzącego przede wszystkim w czasie rozwoju embrionalnego [2, 3].

W angiogenezie nowe naczynia włosowate powstają w następstwie proliferacji komórek śródbłonka z istniejących żyłek pozawłosowatych (*postcapillary venules*). Natomiast w waskulogenezie naczynia te powstają z angioblastów (wywodzących się z kolei z hemangioblastów), stanowiących komórki macierzyste dla naczyń i zaliczanych do tzw. komórek pnia (*stem cells*) [3, 4]. Pojęcie neowaskularyzacji z progenitorów szpikowych (tzw. waskulogenezy postnatalnej) obejmuje tworzenie nowych naczyń krwionośnych z rekrutowanych ze szpiku komórek progenitorowych śródbłonka (EPCs), których głównymi markerami błonowymi są antygeny: CD133, CD34, CD31, oraz receptor czynnika wzrostu śródbłonka naczyń VEGFR-2 [5, 6].

W czasie życia osobniczego tworzenie nowych naczyń krwionośnych towarzyszy wielu procesom fizjologicznym (np. regeneracji błony śluzowej trzonu macicy w cyklu miesięcznym, owulacji, implantacji zarodka do błony śluzowej macicy i tworzeniu łożyska, cyklicznemu wzrostowi włosów, rozwojowi gruczołów sutkowych itd.) oraz wielu stanom chorobowym (przede wszystkim rozrostowi nowotworów litych) [3]. Angiogenezie przypisuje się duże znaczenie praktyczne w procesie tworzenia ziarniny podczas gojenia ran, w procesach niedokrwienia i niedokrwiennego uszkodzenia narządów, podczas odczynów zapalnych w organizmie, a także we wspomnianej wyżej biologii i klinice nowotworów złośliwych [2–4].

Angiogeneza w medycynie sądowej

Dotychczas podjęto niewiele prób wykorzystania oceny procesu angiogenezy lub ekspresji zaangażowanych w niego czynników w praktyce medycyny sądowej. Jednym z przykładów możliwych zastosowań jest immunohistochemiczna ocena ekspresji czynnikowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) w wycinkach płuc w celu diagnostyki różnicowej wstrząsu septycznego [7]. W cytowanym badaniu ekspresja tego białka była istotnie niższa w porównaniu z grupą kontrolną i grupą przypadków zgonów w przebiegu wstrząsu hipowolemicznego. Kolejnym kierunkiem badawczym, analizowanym zarówno w modelach zwierzęcych [8], jak i na materiale ludzkim [9, 10], jest ocena wieku ran na podstawie immu-

process of vasculogenesis which mainly occurs during embryonic development [2, 3].

In angiogenesis, new capillaries are produced by proliferation of endothelial cells from pre-existing postcapillary venules. In contrast, in vasculogenesis the vessels develop from angioblasts (derived from hemangioblasts) which constitute progenitor cells for blood cells and are classified as the so-called stem cells [3, 4]. The concept of neovascularization from bone marrow progenitors (the so-called postnatal vasculogenesis) refers to the formation of new blood vessels from bone marrow-recruited endothelial progenitor cells (EPCs) whose main membrane markers are antigens CD133, CD34 and CD31 and the vascular endothelial growth factor receptor VEGFR-2 [5, 6].

During ontogeny, the process of formation of new blood vessels accompanies a range of physical processes (e.g. endometrial regeneration in the menstrual cycle, ovulation, embryonic implantation in the endometrium and placental formation, hair growth cycle, development of the mammary glands, etc.) and a number of pathological conditions (mostly the growth of solid tumours) [3]. Angiogenesis is thought to have great practical importance in the process of granulation tissue formation during wound healing, in processes of ischaemia and ischaemic organ damage, during inflammatory reactions occurring in the body and in the above-mentioned biology and clinics of malignant cancers [2–4].

Angiogenesis in forensic medicine

To date, there have only been a few attempts to use the assessment of the angiogenesis process – or the expression of factors involved in it – in medico-legal practice. One example of possible applications is the immunohistochemical assessment of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in lung tissue specimens in the differential diagnosis of septic shock [7]. In the cited study, the expression of the protein was significantly lower in relation to the control group and the group of deaths from hypovolaemic shock. Another research direction, which is pursued both in animal models [8] and the human material [9, 10], is the assessment of wound age on the basis of the immunohistochemical expression of factors involved in the formation of new blood

nohistochemicznej ekspresji czynników związanych z tworzeniem nowych naczyń krwionośnych i limfatycznych oraz hipoksją tkankową, takich jak CD31, czynnik von Willebranda (vWF), VEGF, podopłaniina, ORP150 i izoformy syntazy tlenu azotu (NOS) [8–11]. Na uwagę zasługują także próby wykorzystania oceny pourazowej ekspresji cyklooksygenaz COX-1 i COX-2 w mózgu [12]. Odrębny problem stanowią diagnostyka i szacowanie wieku zawału mięśnia sercowego na podstawie zmian naczyniowych w trakcie przebudowy (remodelingu) uszkodzonego obszaru. Pierwsze badanie w tym obszarze dotyczyło oceny ekspresji mRNA dla VEGF [13]. Stwierdzono, że ekspresja tego proangiogenego czynnika jest wysoka w mięśniówce gładkiej i makrofagach otaczających strefę objętą zawałem. Ocena gęstości naczyń limfatycznych (D2-40+) i krwionośnych (CD34+) wykazała, że angiogeneza w sercu wyprzedza limfangiogenezę [14]. Obiecującym czynnikiem, którego ekspresja, jak stwierdzono, szybko wzrasta w obszarze niedokrwienia i niedotlenienia kardiomiocytów, jest czynnik indukujący hipoksję 1 (HIF-1 α), zaangażowany w procesy regulacji angiogenezy [15].

Mechanizmy angiogenezy

Mechanizmy angiogenezy, waskulogenezy i neowaskularyzacji z progenitorów szpikowych są podobne [3]. Na wszystkich etapach obu procesów dochodzi do złożonych interakcji między komórkami ściany naczyń, czynnikami regulatorowymi i macierzą pozakomórkową (ECM) [4]. W angiogenezie uczestniczą różnego rodzaju endogenne czynniki modulujące pochodzenia komórkowego, zarówno pobudzające, jak i hamujące wzrost naczyń, należące do grupy cytokin i czynników wzrostowych, wytwarzane przez komórki śródbłonna, makrofagi i płytki krwi [2, 3].

Endogenne czynniki pobudzające wzrost naczyń to: VEGF-A, łożyskowy czynnik wzrostu (PIGF), czynnik martwicy nowotworów α (TNF- α), płytkowo-pochodny czynnik wzrostu (PDGF), tlenek azotu (NO), kwaśny czynnik wzrostu fibroblastów (aFGF), zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF), angiopoetyna 1 i 2, transformujący czynnik wzrostu β (TGF- β). Do endogennych czynników hamujących wzrost naczyń należą m.in.: angiostatyna, endostatyna, trombospondyna 1, czynnik płytkowy 4 (PF 4) i interferon α (IFN- α).

and lymphatic vessels, and tissue hypoxia – including CD31, von Willebrand factor (vWF), VEGF, podopłaniin, ORP150 and NOS (nitric oxide synthase) isoforms (NOS) [8–11]. Also noteworthy are the attempts to use the assessment of post-traumatic expression of cyclooxygenases COX-1 and COX-2 in the brain [12]. A separate problem relates to the diagnostics and estimation of the age of myocardial infarction based on vascular changes arising during the remodelling of the damaged area. The first study in this line of research assessed the expression of mRNA for VEGF [13]. The study showed the expression of this proangiogenic factor to be high in the smooth muscle and in the macrophages surrounding the infarcted area. An assessment of the density of lymphatic (D2-40+) and blood (CD34+) vessels revealed that angiogenesis in the heart proceeded lymphangiogenesis [14]. A promising factor, whose expression has been demonstrated to rise rapidly in the area of cardiomyocytes ischaemia and hypoxia is hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α), which is involved in angiogenesis regulation processes [15].

Mechanisms of angiogenesis

The mechanisms underlying angiogenesis, vasculogenesis and neovascularization from bone marrow progenitors are similar [3]. All stages of the processes comprise complex interactions between vascular wall cells, regulator factors and the extracellular matrix (ECM) [4]. Angiogenesis involves various types of endogenous modulating factors of cellular origin, both stimulating and inhibiting vascular growth, belonging to the group of cytokines and growth factors, produced by endothelial cells, macrophages and blood platelets [2, 3].

Endogenous factors stimulating vascular growth include VEGF-A, placental growth factor (PIGF), tumour necrosis factor α (TNF- α), platelet-derived growth factor (PDGF), nitrogen oxide (NO), acidic fibroblast growth factor (aFGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), angiopoietin 1 and 2, and transformic growth factor β (TGF- β). In contrast, endogenous factors inhibiting vascular growth are, among others, angiostatin, endostatin, thrombospondin 1, platelet factor 4 (PF4) and interferon α (IFN- α).

An example of an exogenous angiogenesis-stimulating factor is prolonged oxygen deprivation in

Przykładem egzogenego czynnika pobudzającego angiogenezę jest długotrwałe niedotlenienie komórek – przewlekła hipoksja, obecna np. w guzach nowotworowych, związana z dysproporcją między masą i liczbą komórek nowotworowych a siecią naczyń, z przewagą tkanki nowotworowej, stymulująca komórki do wydzielania substancji proangiogennych, takich jak HIF-1. Egzogenne czynniki pobudzające angiogenezę mają także znaczenie w sekwencji faz zapalenia, niedokrwienia i „stresu” komórkowego [2, 3].

Kluczową rolę w regulacji procesu tworzenia naczyń krwionośnych, zarówno angiogenezy, jak i waskulogenezy i neowaskularyzacji, a także procesu tworzenia naczyń limfatycznych (limfangiogenezy) odgrywa wymieniona już grupa białek VEGF (-A, -B, -C, -D, -E), która wpływa głównie na komórki śródbłonna wyściełające powierzchnie wewnętrzne układu sercowo-naczyniowego, stymulując je do proliferacji, migracji i syntezy enzymów z grupy proteaz trawiących macierz pozakomórkową, co umożliwia tworzenie nowych naczyń (neoangiogenezę) [2–4]. Obecnie, dzięki postępom immunohistochemii, komórki śródbłonna mogą być zidentyfikowane w tkankach z wykorzystaniem różnych markerów – znaczników na ich powierzchni, np. CD34, CD31, vWF (tabela I) [5]. W praktyce najczęściej stosowany jest antygen 34 – CD34 (nazwa zwyczajowa: Gp105-120) [16].

Antygen CD34 to białko transbłonowe o masie cząsteczkowej 115 kDa, uczestniczące w adhezji, tj. przyleganiu do siebie, komórek śródbłonna oraz ich migracji podczas powstawania i dojrzewania nowych naczyń [17]. Antygen ten występuje także w błonie komórkowej wielu komórek hematopoetycznych szpiku kostnego. Ekspresję CD34 obserwuje się w początkowych stadiach rozwoju EPCs oraz we wczesnych etapach tworzenia nowych naczyń [16]. Wraz z dojrzewaniem i różnicowaniem się komórek macierzystych śródbłonna nasilenie ekspresji tego antygeny na powierzchni tych komórek maleje, w związku z czym CD34 jest bardzo często używany jako znacznik nowo powstających naczyń przy określaniu ich gęstości, m.in. w guzach nowotworowych.

Innym przydatnym markerem komórek śródbłonna jest antygen CD31 (nazwa zwyczajowa: PECAM-1, Plt GPIIa, endocam), biorący udział w adhezji do nich komórek zapalnych (leukocytów) [16]. Wartość diagnostyczna vWF, który także jest składnikiem komórek śródbłonna i był pierwszym

cells – chronic hypoxia accompanying, for example, cancerous tumours, related to the disproportion between the weight and number of cancer cells and the vascular network, with a dominance of the cancerous tissue, stimulating cells to secrete proangiogenic substances such as HIF-1. Exogenous factors stimulating angiogenesis also have an important function in the sequence of phases of inflammation, ischaemia and cellular stress [2, 3].

A key role in regulating the formation of blood vessels (angiogenesis, vasculogenesis and neovascularization) and lymphatic vessels (lymphangiogenesis) is attributed to the above-mentioned group of VEGF proteins (-A, -B, -C, -D, -E) which affect primarily the endothelial cells lining the internal surfaces of the cardiovascular system and stimulating them to proliferate, migrate and synthesize protease enzymes which digest the extracellular matrix, thus promoting the formation of new blood vessels (neoangiogenesis) [2–4]. At present, owing to advances in immunohistochemistry, endothelial cells can be identified in tissues by using a range of markers on their surface, e.g. CD34, CD31 or vWF (Table I) [5]. In practice, the most frequently used marker is antigen 34 – CD34 (cluster of differentiation 34; commonly referred to as Gp105-120) [16].

Antigen CD34 is a transmembrane protein with a molecular weight of 115 kDa which participates in adhesion, i.e. attachment of endothelial cells one to another, and their migration during the formation and maturation of new blood vessels [17]. The antigen is also found in the cellular membrane of many haematopoietic bone marrow cells. CD34 expression is observed in the initial development stages of EPCs and in the early stages of new blood vessel formation [16]. The process of maturation and differentiation of endothelial stem cells is paralleled by a decrease in the expression of this antigen on the cell surface, which is why CD34 is very commonly used as a marker of newly formed blood vessels for determining their density, e.g. in cancerous tumours.

Another useful marker of endothelial cells is antigen CD31 (commonly called PECAM-1, Plt GPIIa, endocam) which is involved in the adhesion of inflammatory cells (leukocytes) to endothelial cells [16]. However, the diagnostics value of the vWF, which is also found in endothelial cells and was the first immunohistochemical marker to be used for

Tabela I. Markery komórek śródbłonna wykorzystywane do identyfikacji mikrounaczynienia tkanek
Table I. Endothelial markers used for identification of tissue microvascularization

Marker	Ligand
adresyna, CD15 addressin, CD15	selektyny CD62E, P, L selectins CD62E, P, L
CD31 (PECAM-1)	CD31 na komórkach endotelialnych, leukocytach CD31 on endothelial cells, leukocytes
CD34	L-selektyna L-selectin
CD36	trombospondyna, kolagen thrombospondin, collagen
CD49e	fibronektyna fibronectin
CD54 (ICAM-1)	integryna LFA-1, MAC-1 integrin LFA-1, MAC-1
CD58 (LFA-3)	CD2
CD62E (E-selektyna) CD62E (E-selectin)	antygen Sialyl-Lewis-X i inne węglowodany Sialyl-Lewis-X antigen and other carbohydrates
CD62P (P-selektyna) CD62P (P-selectin)	PSGL-1, CD24, CD62E
CD102 (ICAM-2)	LFA-1
CD105	TGFβ-1, TGFβ-3
CD106 (VCAM-1)	integryna VLA-4 integrin VLA-4
CD141 (trombomodulina) CD141 (thrombomodulin)	trombina thrombin
CD144 (VE-kadheryna) CD144 (VE-cadherin)	interakcje homotypowe homotypic interactions
ETBR	ET-1
efryna B2 ephrin-B2	EphB4
EphB4	efryna B2 ephrin-B2
Tie-2	angiopoetyny angiopoietins
VEGFR-2	VEGF
vWF	czynnik VIII factor VIII
aktywny wychwyt LDL active uptake of LDL	receptor zmiatający scavenger receptor

markerem immunohistochemicznym wykorzystywanym do ich identyfikacji oraz identyfikacji zmian naczyniowych, jest obecnie ograniczona z powodu niskiej czułości i częstych trudności w interpretacji wyników, w związku z odczynem barwnym podłoża jako skutkiem obecności tego antygeny w surowicy krwi krążącej.

Wstępem do angiogenezy jest aktywacja komórek śródbłonna mikrokrążenia, w czasie której dochodzi do pęknięć i częściowej utraty błony podstawnej, z miejscowym uwalnianiem wyżej wymienionych cytokin i czynników wzrostowych [2, 3]. Ubytki w błonie podstawnej umożliwiają pączkowanie komórek śródbłonna, a także pericytów, do otaczającej macierzy pozakomórkowej, w otaczającej przestrzeni pozanaczyniowej. Rozprzestrzenianie się pączkujących komórek śródbłonna w macierzy pozakomórkowej stanowi proces inwazyjny, wymagający współdziałania aktywatorów plazminogenu i metaloproteinaz (MMPs). Pączkujące komórki śródbłonna zostają unieruchomione, łączą się ze sobą i w nowo powstających naczyniach włosowatych wytwarza się błona podstawna. Schematycznie proces angiogenezy przedstawiono na rycinie 1.

Angiogeneza w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) ma istotne znaczenie dla prawidłowego rozwoju i funkcjonowania tego układu [4]. Największe zainteresowanie badaczy wzbudza angiogeneza związana z pierwotnymi nowotworami mózgu (glejaki wielopostaciowe, gwiaździaki, oponiaki, naczyniaki krwionośne) oraz angiogeneza w przebiegu chorób naczyniowych i zwyrodnieniowych mózgu, np. po udarze mózgu czy w chorobie Alzheimera [18, 19]. Ocena gęstości mikrounaczynienia w guzie nowotworowym i jego bezpośrednim otoczeniu może mieć istotne znaczenie prognostyczne, a także decydować o kwalifikacji do terapii antyangiogennej tzw. lekami biologicznymi [5, 20].

W neuropatologii sądowej, przydatnej w praktyce sądowo-lekarskiej, badania angiogenezy mogą być pomocne w ustalaniu czasu powstania zmian urazowych w OUN w postaci stłuczenia półkul mózgu, co wynika z dotychczas poczynionych obserwacji [21, 22].

Angiogeneza po mechanicznym urazie mózgu

Następstwem urazów mechanicznych głowy godzących z dużą lub bardzo dużą siłą, bez względu

the identification of endothelial cells and detection of vascular changes, is currently limited because of its low sensitivity and frequent difficulties with the interpretation of results related to the colour reaction of the substrate as a result of the presence of the antigen in the circulating blood serum.

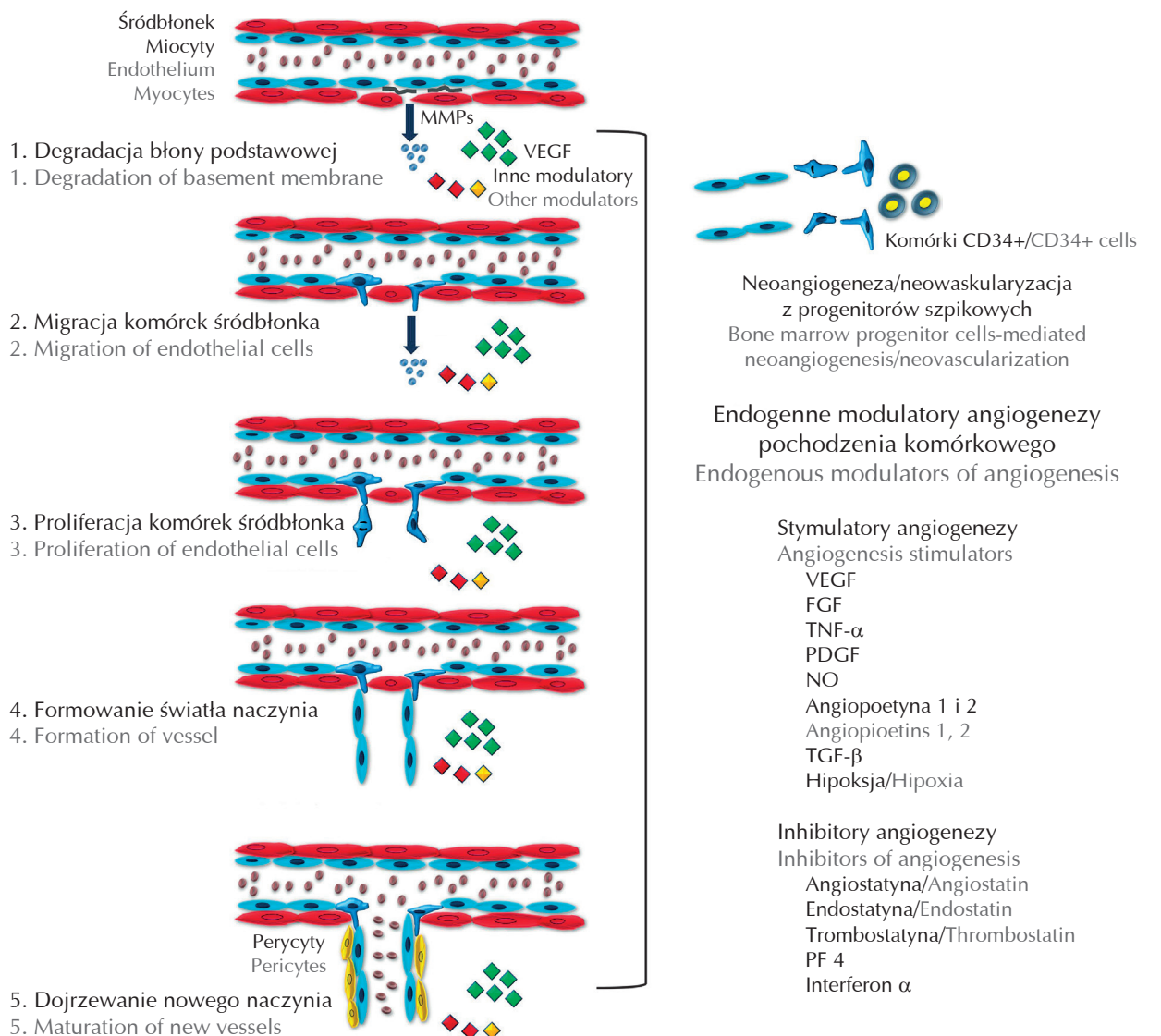
A stage preceding angiogenesis is the activation of microcirculatory endothelial cells involving ruptures and partial loss of the basement membrane with a local release of the above-mentioned cytokines and growth factors [2, 3]. Defects in the basement membrane enable the sprouting of endothelial cells and pericytes into the surrounding extracellular matrix in the adjoining extravascular space. The spread of sprouting endothelial cells in the extracellular matrix is an invasive process which requires joint action by plasminogen activators and matrix metalloproteinases (MMPs). The sprouting endothelial cells become immobilized and join one another, and the basement membrane arises in the newly formed capillary vessels. The process of angiogenesis is shown schematically in Figure 1.

Angiogenesis in the central nervous system (CNS) has a crucial significance for the correct development and functioning of the system [4]. The attention of researchers is mainly drawn to angiogenesis associated with primary brain tumours (glioblastomas, astrocytomas, meningiomas, haemangiomas) and angiogenesis accompanying vascular and degenerative diseases of the brain, e.g. stroke or Alzheimer's disease [18, 19]. An assessment of microvascular density in cancerous tumours and their immediate surroundings may have an important prognostic value and determine eligibility for antiangiogenic therapy with the so-called biologic drugs [5, 20].

In forensic neuropathology, which is useful in medico-legal practice, studies of angiogenesis may be helpful in establishing the time of occurrence of traumatic lesions in the CNS manifesting as cerebral hemisphere contusions, as shown by observations made in this field to date [21, 22].

Angiogenesis after mechanical brain injury

Mechanical injuries to the head sustained during exposure to large or very large forces, regardless of the circumstances in which they arise, may result in focal damage to peripheral cortico-subcortical areas



MMPs – metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej; VEGF – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego; FGF – czynnik wzrostu fibroblastów; TNF- α – czynnik martwicy nowotworów α ; PDGF – płytkowonabłonkowy czynnik wzrostu; TGF- β – transformujący czynnik wzrostu β

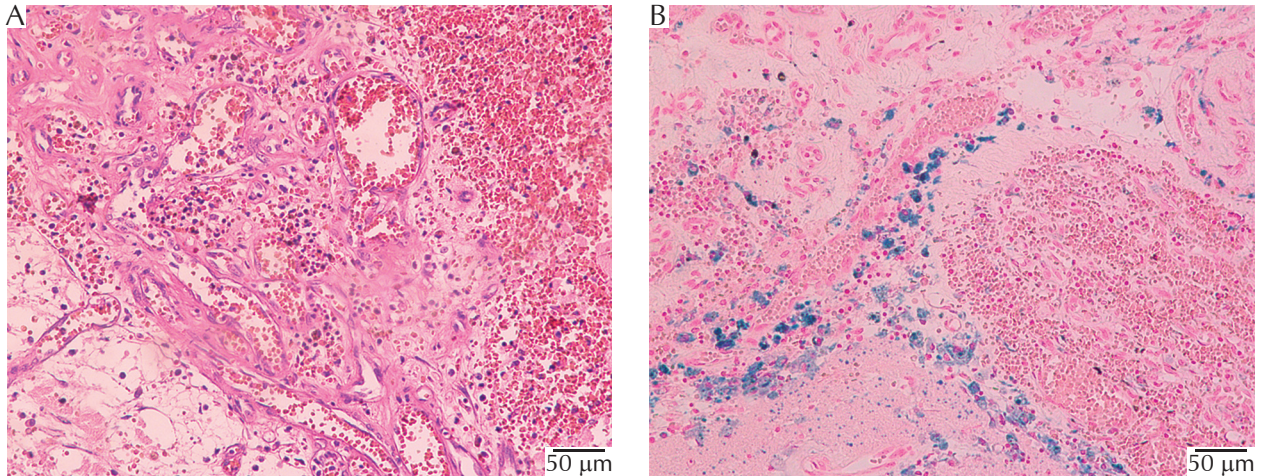
MMPs – matrix metalloproteinases; VEGF – vascular-endothelial growth factor; FGF – fibroblast growth factor; TNF- α – tumor necrosis factor α ; PDGF – platelet-derived growth factor; TGF- β – transforming growth factor β

Ryc. 1. Schemat poglądowy procesu angiogenezy

Fig. 1. The scheme of the angiogenesis process

na okoliczności ich powstania, może być ogniskowe uszkodzenie obwodowych, korowo-podkorowych okolic półkul mózgu, określane jako stłuczenie mózgu [22]. Uszkodzenie to we wczesnym okresie po urazie ma postać wylewów krwawych z martwicą tkanki nerwowej w ich obrębie (ryc. 2.). W miarę upływu czasu od urazu zmiany te ulegają resorpcji i organizacji wskutek procesów naprawczych zachodzących w obrębie nieuszkodzonej tkanki w bez-

around cerebral hemispheres which is referred to as brain contusion [22]. In the early post-injury period, damage present as haemorrhages accompanied by the necrosis of the nervous tissue within the injury site (Fig. 2). As the time post-injury progresses, the lesions are affected by resorption and organization due to repair processes occurring within the undamaged tissue immediately adjacent to the contusion [23]. One of the structural elements of the re-



Ryc. 2. Obraz mikroskopowy stłuczenia mózgu w barwieniu standardowym hematoksyliną i eozyną (A) i w barwieniu Turbulla, ujawniającym złogi hemosyderyny (B)

Fig. 2. Microscopic image of brain contusion in standard staining with hematoxylin and eosin (A) and in Turbulla's staining disclosing haemosiderin deposits (B)

pośrednim sąsiedztwie stłuczeń [23]. Jednym z elementów strukturalnych procesów naprawczych jest stwierdzana w czasie badania histopatologicznego proliferacja naczyń włosowatych o pobudzonych śródbłónek, stanowiąca wykładnik morfologiczny angiogenezy (ryc. 3.).

Ostatnio coraz częściej analizuje się procesy naprawcze w OUN w kontekście tzw. jednostki neurowaskularnej, którą tworzą trzy kompartmenty/przedziały – neurony, glia (głównie astroglej) i naczynia [24, 25].

Badania na zwierzętach

Jedno z pierwszych badań regeneracji śródbłonka po eksperymentalnym urazie mózgu u szczurów wykazało, że regenerujące (tj. wychwytyjące znacznik BrdU – 5-bromo-2-deoksyurydynę, analog tymidyny) komórki śródbłonka były widoczne najwcześniej po 2 dniach od urazu (dzień później niż pozostałe komórki), natomiast największy wzrost ich liczby zanotowano w 3. dniu [26].

Sköld i wsp. wykazali, że mechaniczny uraz mózgu u szczurów szczepu Sprague Dawley skutkuje indukcją ekspresji mRNA oraz białka VEGF i jego receptorów VEGFR1 (Flt-1) i VEGFR2 (Flk-1), zarówno w miejscu urazu, jak i wokół niego [27]. Badania Tado i wsp. z wykorzystaniem bevacizumabu (monoklonalnego przeciwciała anty-VEGF) udowodniły, że zwiększona ekspresja VEGF po urazie mózgu jest związana ze zmniejszaniem obszaru

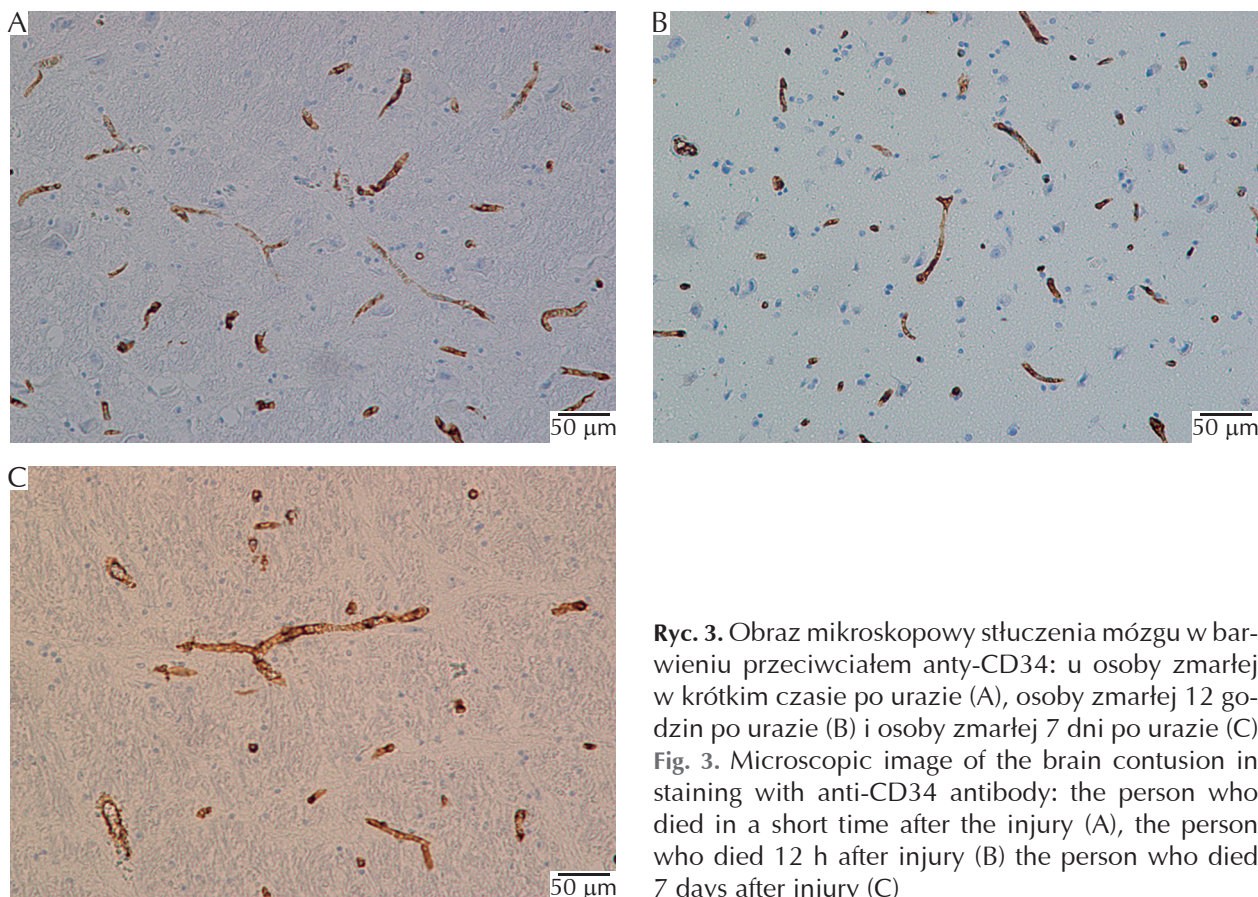
pair processes is the proliferation of capillaries with stimulated endothelium which is identified during the histopathological examination and represents the morphological marker of angiogenesis (Fig. 3).

Recent years have seen an increased interest in the analysis of repair processes occurring in the CNS in the context of the so-called neurovascular unit which is composed of three compartments: neurons, glia (mainly astroglia) and blood vessels [24, 25].

Animal studies

One of the first studies focused on endothelial regeneration following experimental brain injury in rats showed that regenerating endothelial cells (i.e. those taking up the BrdU marker – 5-bromo-2-deoxyuridine, an analogue of thymidine) were first detected two days after the injury (one day later than other cells), and the highest increase in their count was noted on the third day [26].

Sköld *et al.* have demonstrated that a mechanical brain injury in Sprague Dawley rats induces the expression of mRNA, VEGF protein and its receptors VEGFR1 (Flt-1) and VEGFR2 (Flk-1), both in the injury site and around it [27]. Studies conducted by Tado *et al.* using bevacizumab (monoclonal anti-VEGF antibody) have provided evidence that an increased expression of VEGF following cerebral injury is linked to a decrease in the necrotic area, without participating in the formation of post-injury oedema [28].



Ryc. 3. Obraz mikroskopowy stłuczenia mózgu w barwieniu przeciwciałem anti-CD34: u osoby zmarłej w krótkim czasie po urazie (A), osoby zmarłej 12 godzin po urazie (B) i osoby zmarłej 7 dni po urazie (C)
Fig. 3. Microscopic image of the brain contusion in staining with anti-CD34 antibody: the person who died in a short time after the injury (A), the person who died 12 h after injury (B) the person who died 7 days after injury (C)

martwicy, natomiast nie bierze udziału w powstawaniu obrzęku pourazowego [28].

Guo i wsp. zweryfikowali doświadczalnie hipotezę o mobilizacji komórek CD34+ do krwi obwodowej i OUN po urazowym uszkodzeniu mózgu (TBI) u szczurów szczepu Wistar. Wykorzystali w tym celu cytometrię przepływową i barwienie immunohistochemiczne przeciwciałem anti-CD34. Stwierdzili ścisłą korelację pomiędzy wzrostem liczby komórek CD34+ krążących we krwi obwodowej a intensywnością procesu angiogenezy w mózgu zwierząt [6]. W innym badaniu autorzy ci potwierdzili istnienie liniowej, ujemnej korelacji między rekrutacją komórek CD34+ do miejsca uszkodzenia a wzrostem przepuszczalności bariery krew–mózg na skutek urazu [29].

Badania na materiale ludzkim

W aktualnie dostępnym piśmiennictwie dostępne są nieliczne publikacje dotyczące badania angiogenezy w przypadkach stłuczeń mózgu u ludzi. Kła-

Guo *et al.* have verified experimentally the hypothesis concerning the mobilization of CD34+ cells into the peripheral blood and the central nervous system after traumatic brain injury (TBI) in Wistar rats. The study was based on flow cytometry and immunohistochemical staining using anti-CD34 antibody. A close correlation was identified between an increase in the number of CD34+ cells circulating in peripheral blood and the intensity of the angiogenesis process in the animal brain [6]. In another study, the same research team confirmed a negative linear correlation between the recruitment of CD34+ cells into the injury site and increased permeability of the blood-brain barrier as a result of injury [29]

Studies on the human material

The currently available literature only contains a few publications devoted to the studies of angiogenesis in brain contusion in humans. A classic microscopic study using the Gomori staining pro-

sycznym badaniem mikroskopowym w barwieniu metodą Gomoriego stwierdzono obecność proliferujących naczyń włosowatych w okolicy stłuczenia mózgu u osób zmarłych w drugiej połowie pierwszego tygodnia po urazie [22].

Na uwagę zasługują informacje zawarte w dwóch monografiach z dziedziny neuropatologii sądowej dotyczące odczynu naczyniowego w stłuczeniach mózgu. Według autorów, od ok. 5.–7. dnia po urazie czaszkowo-mózgowym zaczyna się proliferacja naczyń penetrujących w ognisko stłuczenia w czasie toczącej się fagocytozy uszkodzonej tkanki i osiąga plateau ok. trzeciego tygodnia, a następnie zmniejsza się w miarę upływu miesięcy i lat [30, 31].

Hausmann i Betz podjęli próbę wykorzystania metod immunohistochemicznych do dokładniejszego ustalenia wieku stłuczeń mózgu [21]. W tym celu zbadali ekspresję białek strukturalnych macierzy pozakomórkowej oraz błony podstawnej naczyń, które biorą udział zarówno w naprawie uszkodzonej ściany naczynia, jak i w tworzeniu nowych naczyń – angiogenezie w obszarze uszkodzenia narządu. Były to białka macierzy pozakomórkowej: laminina, kolagen typu IV i tenascyna, oraz markery komórek śródbłonna, tj. trombomodulina i czynnik VIII. Laminina to białko błon podstawnych umożliwiające wiązanie ich struktur ze sobą. Kolagen typu IV to białko bezstrukturalne błon podstawnych. Tenascyny są białkami biorącymi udział w adhezji i migracji komórek, obecnymi w czasie organogenezy, uszkodzenia tkanek i gojenia ran. Trombomodulina z kolei to kofaktor o działaniu przeciwzakrzepowym, związany z wiązaniem trombiny. Czynnik VIII stanowi marker komórek śródbłonna.

Wyżej wspomnieni autorzy zbadali grupę osób zmarłych wskutek urazu czaszkowo-mózgowego ze stłuczeniem mózgu oraz grupę osób zmarłych z przyczyn nieurazowych, głównie chorobowych. Laminina i kolagen typu IV okazały się nieprzydatne do ustalenia wieku stłuczenia mózgu, ponieważ wykazywały jednakową ekspresję w obu badanych grupach. Badając odczyn naczyniowy przy zastosowaniu metod immunohistochemicznych dla tenascyny, trombomoduliny i czynnika VIII, stwierdzono zmiany ich ekspresji w otoczeniu ogniska stłuczenia w porównaniu z obszarami odległymi – w zależności od czasu, jaki upłynął od urazu mózgu. Odczyn dla czynnika VIII występował po 3 godzinach, dla tenascyny – po 1,6 dnia, dla trombomo-

cedure has revealed the presence of proliferating capillary vessels around the brain contusion site in patients who died in the middle of the first week post-injury [22].

Also worth noting are the findings included in two forensic neuropathology monographs, concerning the vascular reaction in brain contusion. According to the authors, the period around 5 to 7 days after craniocerebral injury represents the onset of the proliferation of blood vessels penetrating into the contusion focus during the ongoing phagocytosis of the damaged tissue, which plateaus around the third week and then decreases over the course of subsequent months and years [30, 31].

Hausmann and Betz have undertaken an attempt to apply immunohistochemical methods for a more accurate determination of the age of brain contusion [21]. To this aim, they investigated the expression of the extracellular matrix and vascular basement membrane proteins which are involved both in the repair of the damaged vessel wall and in the formation of new vessels: angiogenesis within the organ injury site. They were the extracellular matrix proteins: laminin, type IV collagen, tenascin and endothelial cell markers, i.e. thrombomodulin and factor VIII. Laminin is a protein present in basement membranes which allows the binding of their structures. Type IV collagen is a non-structural basement membrane protein. Tenascins are proteins taking part in cellular adhesion and migration, which are present during organogenesis, tissue damage and wound healing. Thrombomodulin is a co-factor with anticoagulant properties which is involved in thrombin binding. Factor VIII is a marker of endothelial cells.

The above-mentioned authors examined a group of people who died from craniocerebral injury with cerebral contusion and a group of individuals who died from non-traumatic (mainly disease-related) causes. Laminin and type IV collagen failed to demonstrate suitability for determining the age of brain contusion, as they exhibited the same expression in both study groups. An investigation of the vascular reaction by means of immunohistochemical methods for tenascin, thrombomodulin and factor VIII showed changes in their expression in the vicinity of the contusion focus compared to distant sites – depending on the period elapsed after brain injury. For factor VIII, the reaction occurred after 3 hours,

duliny – po 6,8 dnia, i utrzymywał się, odpowiednio: 6 dni – 4 tygodnie, 1–4 tygodnie i 1–2 tygodnie – od urazu głowy [21, 32, 33].

Autorzy badania przy określaniu wieku stłuczenia mózgu wiążą nadzieję z badaniem tenascyny i trombomoduliny, natomiast ekspresja czynnika VIII może być problematyczna, zwłaszcza we wczesnym okresie po urazie, ponieważ wykazuje on słabą reakcję także w śródbłonkach mózgowych grupy kontrolnej.

Zdaniem autorów powyższe wyniki nie dają jeszcze podstaw do wykorzystania tych metod w praktyce sądowo-lekarskiej w celu ustalenia wieku stłuczenia mózgu i wymagają potwierdzenia w dalszych eksperymentach.

Ponadto w interpretacji wyników tego rodzaju badań należy pamiętać o nietraumatycznych źródłach neowaskularyzacji w mózgu, które mogą stanowić przyczynę możliwych trudności interpretacyjnych i orzeczniczych. Może to być obecność u zmarłego skutków ischemii zarówno przewlekłej (choroba nadciśnieniowa i zaawansowana miażdżycy naczyń mózgowych), jak i wokół i w strefie udowodnionego, przebytego wcześniej udaru mózgu (nałożenie się i konieczność różnicowania angiogenezy „poudarowej” i „pourazowej”). Na podstawie własnej praktyki medyczno-sądowej autorów należy jednak zaznaczyć, że jest to sytuacja wyjątkowa (w badanej grupie kilkuset losowo wybranych ofiar autorzy nie stwierdzili takiego przypadku).

Wnioski

Niejednoznaczne stwierdzenia dotyczące zależności między wystąpieniem, nasileniem i zanikiem procesu angiogenezy w bezpośrednim otoczeniu stłuczeń mózgu a czasem od urazu zawarte w piśmiennictwie specjalistycznym obecnie nie stanowią podstawy do określenia wieku stłuczenia mózgu w medycynie sądowej. Dlatego też zasadne jest podjęcie dalszych badań w tym zakresie na materiale ludzkim (takie badania są aktualnie prowadzone przez autorów niniejszej pracy i będą przedmiotem kolejnych doniesień).

Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.

for tenascin – after 1.6 days, and for thrombomodulin – after 6.8 days, and was sustained for 6 days – 4 weeks, 1-4 weeks and 1–2 weeks after head injury, respectively [21, 32, 33].

With regard to determining the age of brain contusion, the authors of the study place their hopes on tenascin and thrombomodulin assays, whereas the expression of factor VIII can be problematic, particularly in the early period post-injury, because it demonstrates a weak reaction also in the cerebral endothelia of the control group.

In our view, the results outlined above are not a sufficient basis justifying the application of the proposed methods in medico-legal practice for determining the age of brain contusion, and they require validation by further experiments.

Furthermore, the interpretation of results yielded by such studies must take into consideration non-traumatic causes of cerebral neovascularization which may be a potential source of difficulties with the interpretation and issue of medico-legal opinions. An example of such a situation involves the presence of ischaemic effects – both chronic (hypertensive disease and advanced cerebral atherosclerosis) and existing around and within the site of a confirmed prior stroke (the overlapping and the need to differentiate between “post-stroke” and “post-injury” angiogenesis). However, based on the authors’ own medico-legal practice, it must be stressed that such situations are exceptional (not a single case has been identified in a group of several hundred randomly selected victims).

Conclusions

Reports on correlations existing between the development, severity and regression of the process of angiogenesis in the immediate brain contusion area and time elapsed after injury which are found in the specialist literature are ambiguous, and consequently fail to provide a basis for determining the age of brain contusion in forensic medicine. Therefore, further research in this field, based on the human material, is needed. Such studies are currently being conducted by the authors of the present paper, and will be reported in future publications.

The authors declare no conflict of interest.

Piśmiennictwo

References

1. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Eng J Med* 1971; 285: 1182-1186.
2. Dulak J, Józkowicz A, Łoboda A. Angiogenesis and vascularisation. Cellular and molecular mechanisms in health and diseases. Springer-Verlag, Wien 2013.
3. Sawicki W, Malejczyk J. *Histologia*. PZWL, Warszawa 2012: 317-344.
4. Zadeh G, Guha A. Angiogenesis in nervous system disorders. *Neurosurgery* 2003; 53, 1362-1374; discussion 1374-1376.
5. Kurzyk A. Angiogeneza – możliwości, problemy, perspektywy. *Postępy Biochemii* 2015; 61: 25-34.
6. Guo X, Liu L, Zhang M, Bergeron A, Cui Z, Dong JF, Zhang J. Correlation of CD34+ cells with tissue angiogenesis after traumatic brain injury in a rat model. *J Neurotrauma* 2009; 26: 1337-1344.
7. Manoilescu I, Teleman S, Cojocaru E, Mihăilă D, Plămădeală P. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the lung in toxic septic shock. *Rom J Morphol Embryol* 2011; 52 (1 Suppl): 309-313.
8. Nogami M, Hoshi T, Arai T, Toukairin Y, Takama M, Takahashi I. Morphology of lymphatic regeneration in rat incision wound healing in comparison with vascular regeneration. *Leg Med* 2009; 11: 213-218.
9. Ishida Y, Kimura A, Takayasu T, Eisenmenger W, Kondo T. Expression of oxygen-regulated protein 150 (ORP150) in skin wound healing and its application for wound age determination. *Int J Legal Med* 2008; 122: 409-414.
10. Hayashi T, Ishida Y, Kimura A, Takayasu T, Eisenmenger W, Kondo T. Forensic application of VEGF expression to skin wound age determination. *Int J Legal Med* 2004; 118: 320-325.
11. Guan DW, Zhao R, Du Y. Expressions of NOS isoforms and roles of NO during skin wound healing. *Fa Yi Xue Za Zhi* 2004; 20: 244-246.
12. Guo XR, Zhou YW, Ma YL. The expression of COX-1 and COX-2 following brain injuries. *Fa Yi Xue Za Zhi* 2005; 21: 223-225.
13. Shinohara K, Shinohara T, Mochizuki N, Mochizuki Y, Sawa H, Kohya T, Fujita M, Fujioka Y, Kitabatake A, Nagashima K. Expression of vascular endothelial growth factor in human myocardial infarction. *Heart Vessels* 1996; 11: 113-122.
14. Ishikawa Y, Akishima-Fukasawa Y, Ito K, Akasaka Y, Tanaka M, Shimokawa R, Kimura-Matsumoto M, Morita H, Sato S, Kamata I, Ishii T. Lymphangiogenesis in myocardial remodelling after infarction. *Histopathology* 2007; 51: 345-353.
15. Blanco Pampín J, García Rivero SA, Otero Cepeda XL, Vázquez Boquete A, Forteza Vila J, Hinojal Fonseca R. Immunohistochemical expression of HIF-1alpha in response to early myocardial ischemia. *J Forensic Sci* 2006; 51: 120-124.
16. Gołąb J, Jakóbiśiak M, Lasek W, Stokłosa T. *Immunologia*. PWN, Warszawa 2007: XXIV-XXXV.
17. Kawiak J, Zabel M. *Seminaria z cytofizjologii dla studentów medycyny, weterynarii i biologii*. Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2014.
18. Michalak S. Angiogeneza w układzie nerwowym i jej znaczenie. Od nowotworów do choroby Alzheimer. *Neuroskop* 2004; 6: 136-139.
19. Nowacka M, Obuchowicz E. Rola VEGF, czynnika neurotroficznego i proangiogenego, w patogenezie choroby Alzheimer. *Aktualności Neurologiczne* 2011; 11: 123-130.
20. Folkherth RD. Histologic measures of angiogenesis in human primary brain tumors. *Cancer Treat Res* 2004; 117: 79-95.
21. Hausmann R, Betz P. The time course of the vascular response to human brain injury – an immunohistochemical study. *Int J Legal Med* 2000; 113: 288-292.
22. Oemichen M, Auer RN, König HG. *Forensic neuropathology and associated neurology*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2006.
23. Dettmeyer RB. *Forensic histopathology*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2011.
24. Lok J, Arai K, Guo S, Leung W, Maki T, Navaratna D, Leyen K, Xing C, Wu L, Noviski N, Lo EH. Neurovascular responses to traumatic brain injury. W: Lo EH, Lok J, Ning M, Whalen MJ (red.). *Vascular Mechanisms in CNS Trauma*. Springer-Verlag, New York 2014.
25. Lok J, Wang XS, Xing CH, Maki TK, Wu LM, Guo SZ, Noviski N, Arai K, Whalen MJ, Lo EH, Wang X-Y. Targeting the neurovascular unit in brain trauma. *CNS Neurosci Ther* 2015; 21: 304-308.
26. Orita T, Akimura T, Kamiryo T, Nishizaki T, Furutani Y, Harada K, Ikeyama Y, Aoki H. Cerebral endothelial regeneration following experimental brain injury. Variation in the regeneration process according to the severity of injury. *Acta Neuropathol* 1989; 77: 397-401.
27. Sköld MK, von Gertten C, Sandberg-Nordqvist AC, Mathiesen T, Holmin S. VEGF and VEGF receptor expression after experimental brain contusion in rat. *J Neurotrauma* 2005; 22: 353-367.
28. Tado M, Mori T, Fukushima M, Oshima H, Maeda T, Yoshino A, Aizawa S, Katayama Y. Increased expression of vascular endothelial growth factor attenuates contusion necrosis without influencing contusion edema after traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* 2014; 31: 691-698.
29. Jin X, Wang F, Liu X, Liang B, Chen Z, He J, Zhang H, Zhang J. Negative correlation of CD34+ cells with blood-brain barrier permeability following traumatic brain injury in a rat model. *Microcirculation* 2014; 21: 696-702.
30. Itabashi HJ, Andrews JM, Tomiyasu U, Erlich SS, Sathyavagiswaran L. *Forensic neuropathology. A practical review of the fundamentals*. Academic Press, London, UK 2007.

31. Leestma J. Forensic neuropathology. CRC Press Taylor and Francis Group, New York 2009.
32. 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.
33. Hausmann R. Age determination of brain contusions. Forensic Sci Med Pathol 2006; 2: 85-93.

Adres do korespondencji

Rafał Skowronek
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej
i Toksykologii Sądowo-Lekarskiej
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
ul. Medyków 18
40-752 Katowice, Polska
e-mail: rafal-skowronek@wp.pl

Address for correspondence

Rafał Skowronek
Chair and Department of Forensic
Medicine and Toxicology
Medical University of Silesia in Katowice
Medyków 18
40-752 Katowice, Poland
e-mail: rafal-skowronek@wp.pl

