

Aleksandra Borowska-Solonyńko, Paweł Krajewski, Robert Koktyś¹, Łukasz Koperski²

Wybrane cechy budowy mikroskopowej jako element dodatkowy w ocenie wieku krwiałków podwardówkowych*

Usefulness of selected microscopic morphological changes in determining the age of subdural hematomas

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Kierownik: dr hab. n. med. P. Krajewski

¹ Z Zakładu Patomorfologii Wojskowego Instytutu Medycznego CSK MON w Warszawie

Kierownik: prof. dr hab. n. med. W. Kozłowski

² Z Katedry i Zakładu Anatomii Patologicznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Kierownik: prof. dr hab. n. med. A. Wasiutyński

W prezentowanej pracy przedstawione są wyniki analizy widocznych w badaniu histopatologicznym złogów hemosyderyny i hematoïdiny a także torebek krwiałków podwardówkowych, pod kątem ich przydatności do oceny wieku krwiałków podwardówkowych. Ocenie poddano preparaty histopatologiczne krwiałków podwardówkowych pobrane podczas 76 sekcji zwłok wykonanych w ZMS WUM u osób po doznanym urazie głowy, u których wystąpił krwiałek podwardówkowy, a czas urazu był znany. Preparaty barwiono hematoksyliną i eozyną, a także metodą Massona. Badanie wykazało przydatność oceny ww. elementów budowy mikroskopowej krwiałków podwardówkowych w ustalaniu ich czasu powstania, przy czym stwierdzono wyższość oceny o charakterze jakościowym nad oceną o charakterze ilościowym.

The objective of the study was to assess the usefulness of selected microscopic changes for determining the age of subdural hematoma (SDH). The research was based on microscopic examination of histopathological preparations representing SDHs collected in the course of 76 forensic autopsies performed in the Chair and Department of Forensic Medicine, Warsaw Medical University, Poland. The deceased had SDH after head injuries and the time of injury was known. H.E. and Masson's staining was employed for qualitative and quantitative determinations. The presence of

hematoma capsules, as well as hematoïdin and hemosiderine deposits were analyzed. The results suggest that microscopic SDH examinations based on the afore-said features is a helpful method for determining the age of SDHs. Additionally, the results of this study indicate that qualitative techniques of SDHs dating are more accurate than quantitative ones.

Słowa kluczowe: datowanie krwiałków podwardówkowych, obrażenia głowy, ocena mikroskopowa

Key words: determining the age of subdural hematomas, head injuries, microscopic evaluation

WSTĘP

Jednym z częściej wymienianych sposobów datowania krwiałków podwardówkowych jest ocena mikroskopowa pobranych fragmentów opony twardej wraz z krwiałkiem. Metoda ta opiera się na założeniu, że obraz histologiczny krwiałka podwardówkowego jest zmienny zgodnie z dynamiką uzależniony od czasu przemian. Niestety istnieją jedynie nieliczne publikacje poświęcone temu zagadnieniu. Jedną z najwcześniejszych prac została opublikowana przez Munro i pochodzi z 1934 roku [1]. Wyniki kolejnej pracy tego samego autora wykonanej

* Poszerzona wersja plakatu przedstawionego podczas XV Zjazdu Naukowego PTMSiK, Gdańsk 16-18.09.2010 r.

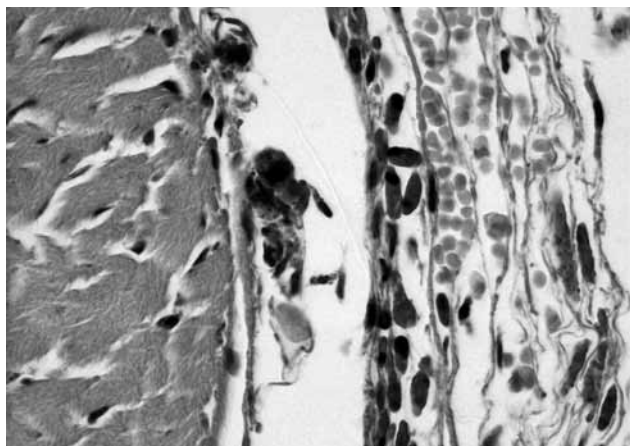
wraz z Meritt [2] z 1956 roku zostały przedstawione w formie tabeli, która w niewielkim stopniu została zmodyfikowana przez Hardmana w 1979 roku [3], McCormick 1983 [4], Leestman 1988 [5]. Prace te są podstawą współczesnej histopatologicznej oceny wieku krwiałków podtwardówkowych. W praktyce, w wielu przypadkach kryteria podane przez ww. autorów są trudne do zastosowania bądź nie sprawdzają się w indywidualnych przypadkach, co sprawia wrażenie ogólnie niskiej przydatności tradycyjnych metod histopatologicznych w datowaniu krwiałków podtwardówkowych. W Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego przeprowadzono badanie poświęcone ocenie przydatności tradycyjnych technik mikroskopowych przy określaniu wieku krwiałków podtwardówkowych. Prezentowana praca stanowi jedynie fragment tego badania i poświęcona jest kilku wybranym cechom budowy mikroskopowej krwiałków.

MATERIAŁ I METODY

Ocenić poddano preparaty histopatologiczne krwiałków podtwardówkowych pobrane podczas 76 sekcji zwłok wykonanych w Zakładzie Medycyny Sądowej Warszawskiego Uniwersytetu w latach 2006-2007, u osób po doznanych urazie głowy, u których wystąpił krwiałek podtwardówkowy, a czas urazu był znany. W 20 przypadkach wykonana była chirurgiczna ewakuacja krwiałka, przy czym w czterech z tych przypadków do badań histologicznych pobrano materiał ze strony przeciwnej od ewakuowanej. Preparaty barwiono hematoksyliną i eozyną, a także metodą Masso-

Ryc. 1. Złogi hemosydeminy i hematoidyny na granicy krwiałka i opony twardej. Powiększenie 60x.

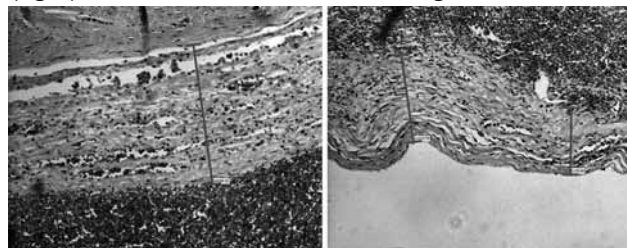
Fig.1. Hematoidin and hemosiderin deposits between the dura mater and hematoma. Magnification 60x.



na. Przy użyciu mikroskopu świetlnego oceniano obecność złogów hemosydeminy i hematoidyny w preparacie (ryc. 1) a także obecność torebki zewnętrznej i wewnętrznej krwiałka (ryc. 2 i 3). Za torebkę uznane zostały wszystkie elementy tworzące warstwę oddzielającą krwiałka od opony twardej (w przypadku torebki zewnętrznej) oraz pokrywające krwiałek od strony opony pajęczkowej (w przypadku torebki wewnętrznej) włączając w to zarówno elementy włókniste jak i komórkowe.

Ryc. 2 i 3. Torebka zewnętrzna (zdjęcie po stronie lewej) i torebka wewnętrzna (zdjęcie po stronie prawej) krwiałka. Powiększenie 20x.

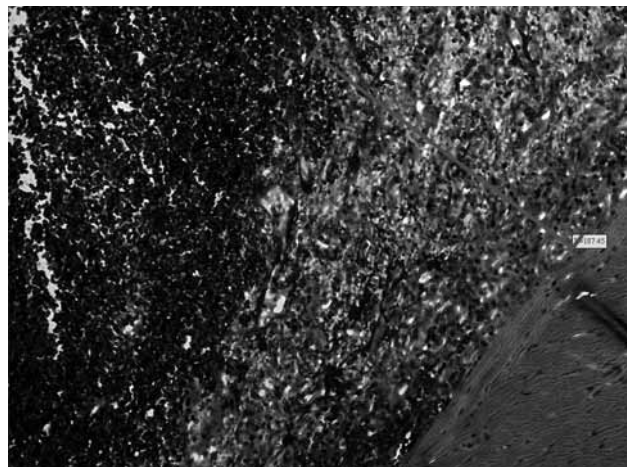
Fig. 2 and 3. Capsula externa (left) and capsula interna (right) of a subdural hematoma. Magnification 20x.



W preparatach barwionych metodą Massona dokonywano pomiaru grubości torebek krwiałka za pomocą mikroskopu Nikon Eclipse E200 sprzężonego z komputerem i kamerą Pixelink (ryc. 4). Ocenie poddawano trzy pola widzenia uwzględniając pola o widocznej najcieńszej i najgrubszej torebce. Do analizy wykorzystano zarówno średnią jak i maksymalną wartość z wykonywanych pomiarów.

Ryc. 4. Pomiar grubości torebki zewnętrznej krwiałka w barwieniu metodą Massona. Powiększenie 40x.

Fig. 4. Measurement of the thickness of the capsula externa of SDH – Masson's staining. Magnification 40x.



Analizy dokonano dla całej grupy badanej, jak również z podziałem krwiałków na podgrupy w za-

leżności od czasu, jaki upłynął od chwili urazu do zgonu: krwaki ostre (40 przypadków), podostre (27 przypadków) i przewlekłe (9 przypadków), przyjmując za górną granicę dla krwaka ostrego 72 godziny (3 dni), podostrego 480 godzin (20 dni).

W analizie statystycznej zastosowano typowe miary położenia i rozproszenia (średnia, odchylenie standardowe). Po zbadaniu rozkładu zmiennych zastosowano do dalszych obliczeń test t-Studenta i modyfikacje testu t Studenta. Do porównań zmiennych w skalach nominalnych zastosowano tabele kontyngencji analizowane typowym testem Chi². Dla wszelkich porównań przyjęto wartości krytyczne testów dla $p = 0,05$ (za istotne statystycznie uznawano wartości dla $p < 0,05$).

WYNIKI

Analiza wykazała wysoko znamiennej statystycznie zależność pomiędzy obecnością złogów hemosyderyny w preparatach krwaków, a podziałem krwaków na grupy w zależności od ich wieku (Test Chi² NW Chi-kwadr. 25,56199, $df=2$, $p=0,00000$) a także pomiędzy obecnością w preparacie złogów hematoidyny, a podziałem krwaków na grupy (Test Chi² NW Chi-kwadr. 8,431004 $df=2$, $p=0,01477$). Tabela I przedstawia zestawienie liczby krwaków w poszczególnych grupach w zależności od obecności lub braku w preparacie złogów hemosyderyny i hematoidyny.

Złogi hemosyderyny obecne były we wszystkich zbadanych przypadkach krwaków przewlekłych. W trzech przypadkach dodatkowo towarzyszyły im złogi hematoidyny. Obecność w preparacie histologicznym zarówno złogów hemosyderyny, jak i hematoidyny można było stwierdzić jedynie w pojedynczych przypadkach krwaków ostrych, jak i podostrych. Tylko w jednym przypadku obecność złogów hemosyderyny stwierdzono u osoby, która zmarła w kilka minut po doznanym urazie głowy, co zdaniem autorów może sugerować, że u wymienionej osoby miał miejsce co najmniej jeden dodatkowy uraz głowy w nieznanych okolicznościach, poprzedzający ten, co do którego okoliczności są znane. W pozostałych przypadkach widoczne podczas badania złogi hemosyderyny pojawiały się w krwakiach mających nie mniej niż 60 godzin (2,5 dnia). Najstarszy z krwaków, w którym nie stwierdzono obecności złogów hemosyderyny miał 408 godzin (17 dni).

Złogi hematoidyny widoczne czy to w samym krwaku, czy też w oponie twardej, obserwowane były w krwakiach mających co najmniej 216 godzin (9 dni), poza pojedynczym przypadkiem wystąpienia ich w krwaku mającym 72 godziny (3 dni).

Analiza wykazała wysoce znamiennej statystycznie zależność ($p < 0,01$) pomiędzy podziałem krwaków na grupy, w zależności od ich wieku, a obecnością widocznej w badaniu mikroskopowym torebki zewnętrznej krwaka

Tabela I. Liczba krwaków w poszczególnych grupach w zależności od obecności lub braku w preparacie hemosyderyny i hematoidyny.

Table I. Number of SDHs depending on the presence or absence of hematoidin and hemosiderin deposits.

Hemosyderyna / Hemosiderin	Hematoidyna / Hematoidin	Krwak ostry / Acute SDH	Podostry / Subacute SDH	Przewlekły / Chronic SDH	Suma końcowa / Total
Brak / Absence	Brak / Absence	35	18		53
Obecność / Presence	Brak / Absence	3	6	4	13
	Obecność / Presence	1	3	3	7
Brak danych / No data	Brak danych / No data	1		2	3

Tabela II. Liczba krwaków w poszczególnych grupach w zależności od obecności lub braku torebki zewnętrznej (Test Chi² NW Chi-kwadr. 78,96690 $df=2$, $p=0,00000$).

Table II. Number of SDHs depending on the presence or absence of the capsula externa of SDH.

Torebka zewnętrzna / Capsula externa	Krwak ostry / Acute SDH	Podostry / Subacute SDH	Przewlekły / Chronic SDH	Suma końcowa / Total
Brak / Absence	39	3		42
Obecność / Presence		24	6	30
Brak danych / No data	1		3	4

(tab. II). Torebka ta nie była widoczna w żadnym z krwiaków ostrych zaś występowała w 88% krwiaków podostrych i wszystkich krwiakach przewlekłych.

Obecność torebki zewnętrznej była obserwowana od 96 godziny (4 dni) dzielącej uraz i zgon, zaś najstarszy krwiak, w którym nie udało się jej wyodrębnić miał 144 godziny (6 dni). W każdym krwiaku, z którego wykonano preparaty barwione metodą Massona, dokonano pomiaru grubości torebki zewnętrznej w trzech różnych polach widzenia, z tych pomiarów wyliczono średnią dla krwiaków w poszczególnym wieku co przedstawia rycina 5.

Ryc. 5. Średnia grubość torebki zewnętrznej podana w mikrometrach dla krwiaków w poszczególnym wieku określonym w godzinach.

Fig. 5. The mean thickness of capsula externa (in micrometers) depending on SDH age (in hours).



Jak pokazuje linia trendu zamieszczona na rycinie 1, widoczna jest tendencja do przyrostu grubości torebki zewnętrznej wraz ze „starzeniem się krwiaka”. Niestety analizując indywidualne przypadki zwraca uwagę, że grubość torebki niektórych krwiaków starszych jest mniejsza niż

krwiaków od nich młodszych. Stąd też praktycznie określenie wieku krwiaka jedynie w oparciu o pomiar grubości jego torebki jest niemożliwy.

Tabela III przedstawia liczbę krwiaków w poszczególnych grupach, w zależności od obecności lub braku torebki wewnętrznej. W niektórych przypadkach tkanka włóknista nie tylko pokrywała powierzchnię wewnętrzną krwiaka formując torebkę, ale włóknienie – przynajmniej ogniskowo – obejmowało całą grubość krwiaka, co zostało wyodrębnione w tabeli poniżej.

Podobnie jak w przypadku obecności torebki zewnętrznej analiza wykazała wysoce znaczącą statystycznie zależność ($p < 0,01$) pomiędzy podziałem krwiaków na grupy, a obecnością torebki wewnętrznej krwiaka oraz występowaniem ognisk włóknienia obejmujących cały skrzep. Torebka wewnętrzna nie występowała w krwiakach ostrych, zaś poza jednym przypadkiem była obecna we wszystkich krwiakach przewlekłych. Nie można wykluczyć, iż do jej utracenia w tym pojedynczym przypadku doszło w wyniku procedur przygotowywania preparatu zatem jest to artefaktem. Występowaniu torebki wewnętrznej, w krwiakach przewlekłych, zawsze towarzyszyło co najmniej jedno ognisko włóknienia obejmujące całą grubość krwiaka. Obecność torebki wewnętrznej bez ognisk pełnego włóknienia skrzepu obserwowano jedynie w krwiakach podostrych.

Minimalny wiek krwiaka, w którym zaobserwowano obecność torebki wewnętrznej wyniósł 120 godzin (5 dni). Najstarszy krwiak, w którym nie uwidoczniono torebki wewnętrznej miał 408 godzin (17 dni), poza pojedynczym krwiakiem mającym 22 dni, wymienionym wyżej, w przypadku którego utrata torebki wewnętrznej była najprawdopodobniej artefaktem.

Rycina nr 6 przedstawia wyniki pomiarów grubości torebki wewnętrznej przeprowadzone

Tabela III. Liczba krwiaków w poszczególnych grupach, w których stwierdzono obecność torebki wewnętrznej i ognisk włóknienia obejmujących cały skrzep.

Table III. Number of SDH depending on the presence or absence of the capsula interna and full-thickness foci of haematoma fibrosis.

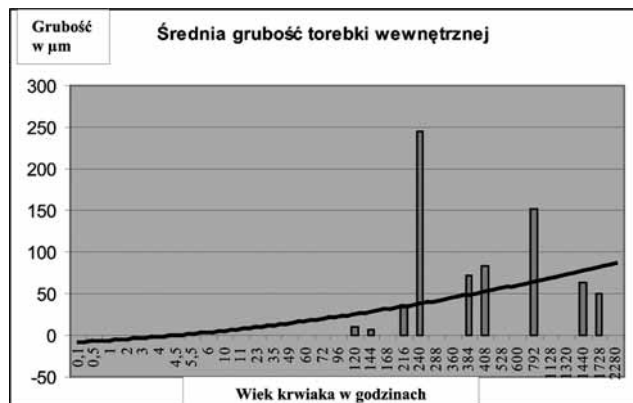
Torebka zewnętrzna / Capsula externa	Ogniska włóknienia obejmujące całą grubość skrzepu / Full-thickness foci of haematoma fibrosis	Krwiak ostry / Acute SDH	Podostry / Subacute SDH	Przewlekły / Chronic SDH	Suma końcowa / Total
Brak / Absence	Brak / Absence	39	14	1	54
Obecność / Presence	Brak / Absence		5		5
	Obecność / Presence		8	5	13
Brak danych / No data		1		3	4

w sposób analogiczny do opisanego powyżej dla torebki zewnętrznej.

Ryc. 6. Średnia grubość torebki wewnętrznej podana w mikrometrach dla krwiaków w poszczególnym wieku określonym w godzinach.

Fig. 6. The mean thickness of capsula interna (in micrometers) depending on SDH age (in hours).

Jak wynika z powyższego wykresu, podobnie jak w przypadku torebki zewnętrznej, nie jest



możliwe w indywidualnych przypadkach ustalenie wieku krwiaka podtwardówkowego w oparciu jedynie o grubość torebki wewnętrznej.

DYSKUSJA

W opublikowanych pracach na temat oceny wieku krwiaków podtwardówkowych na podstawie ich budowy mikroskopowej, dużą uwagę poświęca się obszarowi granicznemu pomiędzy wynaczynioną krwią a sąsiadującymi oponami: twardą i pajęczą. Przytoczeni we wstępie autorzy [2, 3, 4, 5] ustalenia dotyczące wieku krwiaków podtwardówkowych oparli głównie o analizę ilościową elementów pojawiających się w obszarach granicznych krwiaka. Tak np. w kryteriach podanych przez Munro i Merrit [2] poszczególnym dniom przypisana jest określona ilość warstw fibroblastów pojawiających się pomiędzy krwiakiem i oponą twardą a od 15 dnia pojawia się określenie „torebka krwiaka” i dalsza ewolucja określona jest poprzez zmiany szerokości tej torebki w stosunku do szerokości opony twardej z uwzględnieniem zmian w komponentach ją tworzących. Na temat zależności między krwiakiem podtwardówkowym a obrazem morfologicznym jego torebki pisał także Nowacki [6]. Ww. autor dokonał podziału torebki na trzy warstwy: zbitą, naczyniową i luźną a następnie zwrócił uwagę, że tempo zmian jest różne w poszczególnych warstwach. Niestety

tego typu kryteria, jak przytoczone powyżej, trudne są do zastosowania w praktyce. Mimo, że torebka krwiaka była tematem kilku prac [7, 8, 9], podstawowy problem stanowi jej zdefiniowanie. Dla jednych torebką można nazwać tylko strukturę składającą się z fibroblastów i elementów włóknistych [2] dla innych torebką jest wszystko to, co oddziela krwiaka od opony twardej w tym nacieki z komórek zapalnych [6]. W prezentowanym badaniu własnym przyjęta została druga definicja. Następny z problemów związany jest z trudnościami technicznymi przy pracy z niezwykle wymagającym materiałem jakim są krwiaki. Proces pobierania, utrwalania, krojenia i barwienia związany jest bardzo często z fragmentacją czy też wręcz gubieniem się elementów płynnych bądź półpłynnych krwiaka. Stąd też zwykle możliwa jest ocena jedynie różnej wielkości fragmentów. Pieśniak w rozprawie doktorskiej proponuje sposób, który ogranicza „gubienie się krwiaka” na etapie utrwalania [10] poprzez odpowiednie zwijanie opony twardej wraz z krwiakiem, jednakże nie udaje się tego problemu wyeliminować na dalszych etapach. W całym procesie przygotowania materiału dochodzi także do powstawania przestrzeni pomiędzy krwiakiem i oponami, a także w brzeźnych częściach krwiaków czy opony twardej, które są artefaktami i właściwie uniemożliwiają np. policzenie warstw fibroblastów, warstw torebki, czy odniesienie grubości torebki do grubości opony twardej. Ponadto opieranie się w ocenie wieku krwiaków o dane charakteryzujące nie sam fakt występowania danej cechy, ale jej nasilenie czy wręcz liczbę, wydaje się wątpliwe i mało przydatne w indywidualnych przypadkach, ze względu na dużą zmienność obrazu w obrębie nawet pojedynczego preparatu. Tezę tę potwierdzają wyniki prezentowanego badania, gdzie wykazano znikomą przydatność pomiaru szerokości torebek krwiaków, natomiast dowiedziono, że pomocne przy datowaniu krwiaków mogą być obserwacje odnośnie samej obecności lub braku torebek ograniczających krwiaki. Wydaje się zatem, że do oceny wieku krwiaków przy użyciu tradycyjnych technik mikroskopowych, z uwzględnieniem specyfiki badanego materiału, najlepsze byłoby opracowanie kryteriów w oparciu o cechy jakościowe, z których każda pozwala umiejscowić badanego krwiaka w konkretnym przedziale czasowym. Przy czym ocena wieku krwiaków podtwardówkowych będzie tym precyzyjniejsza im badający będzie dysponował większą ilością takich cech. Dzięki temu, po raz kolejny, udowodnione zostanie znaczenie badań

histopatologicznych w praktyce medyczo-sądowej w przypadkach zgonów gwałtownych o czym pisał Raszeja w artykule z 2007 roku [11].

WNIOSKI

1. Ocena występowania złogów hemosyde-ryny i hematoidyny oraz torebek w krwiaku podtwardówkowym stanowi przydatne, dodatkowe narzędzie do oceny wieku powstania wynaczynienia krwi pod oponę twardą.
2. Pomiar szerokości torebek krwiaka podtwardówkowego nie może stanowić podstawy datowania krwiaków.

PIŚMIENNICTWO

1. Munro D.: The diagnosis and treatment of subdural hematoma, *The New England Journal of Medicine* 1934; 31: 1145-1160.
2. Munro D., Merritt H.: Surgical pathology of subdural hematoma. *Arch. Neurol. Psychiatry* 1956; 35: 64-78.
3. Hardman J.: The Pathology of traumatic brain injuries. *Adv Neurol* 1979; 22: 15-50.
4. McCormick W., Trauma w Rosenberg R., Grossman R., Schochet S., Heinz E., Willis W.: *The clinical Neurosciences. Neuropathology.* Churchill Livingstone 1983.

5. Leestman J.: *Forensic Neuropathology.* Raven Press New York 1988.

6. Nowacki P.: Zależność między wiekiem krwiaka podtwardówkowego a obrazem morfologicznym jego torebki, *Neuropat. Pol.* 1980; 1: 151-166.

7. Friedel L.: Incidence and distribution of neomembranes of Dura mater. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat* 1971; 34: 439-446.

8. Friedel L., Schachenmayr W.: The origin of subdural neomembranes II. Fine structure of neomembranes, *Am J Pathol* 1978; 92: 69-84.

9. Moskała M., Gościński I., Kałuża J., Polak J., Krupa M., Adamek D., Pityński K., Miodoński A.: Morphological aspects of the traumatic chronic subdural hematoma kapsule. SEM studium, *Microsc. Microanal* 2007; 13: 211-219.

10. Pieśniak D.: Ocena przydatności badania histopatologicznego krwiaków podtwardówkowych do ustalania czasu ich powstania w praktyce sądowo-lekarskiej. Praca nastąpień doktora nauk medycznych Gdańsk 2008.

11. Raszeja S.: Badania histopatologiczne w opiniowaniu sądowo-lekarskim. *Arch. Med. Sąd. Kryminol.* 2007; 58: 180-183.

Adres autorów:

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
Ul. Oczki 1, 02-007 Warszawa
Tel. 22 628-89-75