

Demands on scientific studies

Vitality of wounds and wound age estimation

Wolfgang Grellner and Burkhard Madea

Forensic Science International 165 (2007) 150–154

Outline

- Introduction
- Factors
- Appropriate Method
- Case material
- Analysis of results
- Quality control
- Conclusion

Introduction

Wound (บาดแผล) ในทางนิติพยาธิวิทยาแบ่งตามรูปแบบของแรงกล
ที่มักกระทำต่อร่างกาย เป็น 3 ชนิด คือ

1. Sharp force เช่น บาดแผลถูกฟัน (incised wound)

บาดแผลถูกแทง (stab wound)

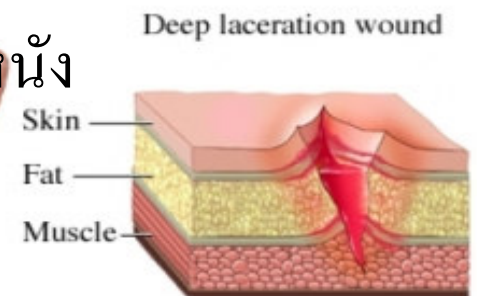
2. Blunt force เช่น บาดแผลถลอก (abrasion)

บาดแผลฉีกขาด (laceration)

บาดแผลฟกช้ำ (contusion)

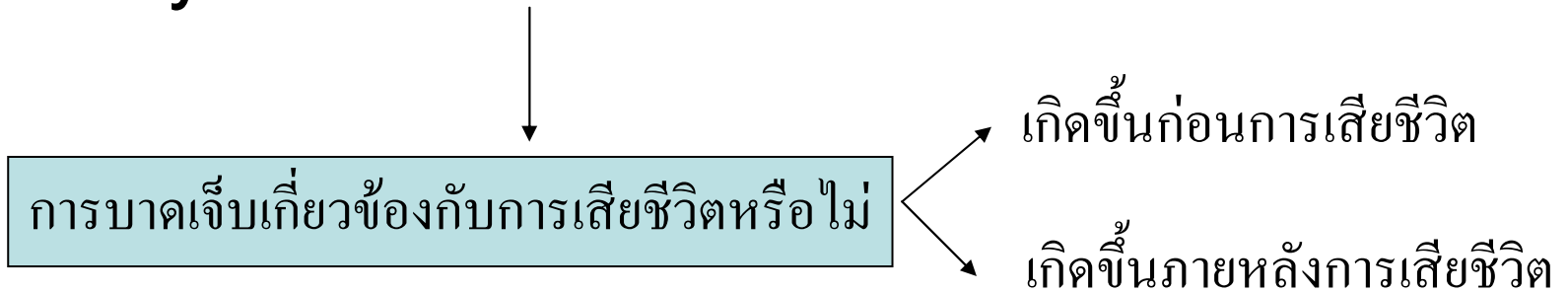
บาดแผลเลือดออกบริเวณใต้ชั้นผิวหนัง
(intradermal bleeding)

3. Gun shot wound



Introduction (cont.)

- **Vitality of wounds** = บาดแผลที่เกิดขึ้นขณะมีชีวิต



- **Wound healing or Wound age estimation**

= การประเมินอายุของบาดแผล

การบอกถึงช่วงเวลาตั้งแต่เกิดบาดแผลจนกระทั่งเสียชีวิต

Introduction (cont.)

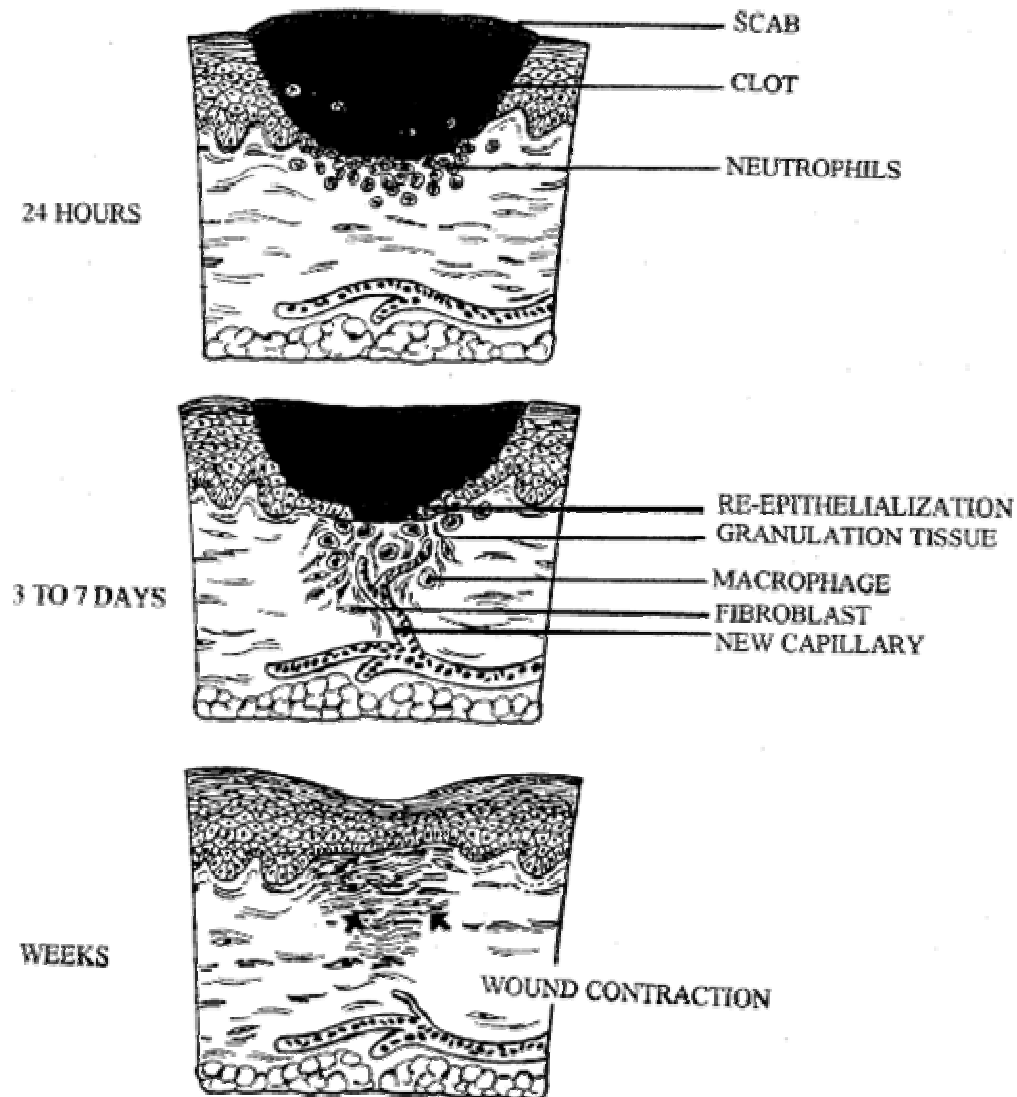


Fig. 1. Dermal wound repair

Factors influencing the time course of inflammation

- **Local factors**
 - Type and intensity of trauma
 - Severity and extension of damage
 - Type of tissue
 - Temperature
 - Circulation
- **Systemic factors**
 - Hereditary factors
 - Age
 - Sex
 - Nutritional state
 - Diseases
 - Endocrinopathy
 - Metabolic disturbances
- **Exogenous factors**
 - Drugs

Appropriate method

- Routine histology
- Enzyme histochemical methods
- Immunohistochemistry

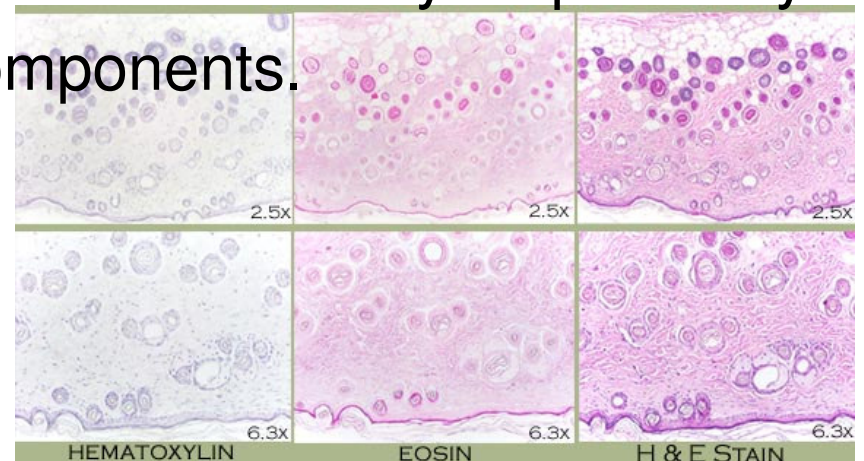
Routine histology



- Tissue preparation

- Fixation : stabilizes and preserves the tissue.
- Embedding : converts the tissue into a solid form which can be sliced or sectioned
- Sectioning : provides the very thin specimens needed for microscopy.
- Staining : provides visual contrast and may help identify specific tissue components.

Routine histology uses the stain combination of **hematoxylin** and **eosin**, commonly referred to as **(HE)**.



Enzyme histochemical methods

- The techniques of enzyme histochemistry, which relate structure and function, can be used to locate many enzymes.
- Enzymes are the catalysts of most of biochemical reactions such as esterase, acid phosphatase and ATPase
- Frozen tissues are used.

Histochemical reaction

enzyme + substrate \longrightarrow product

2nd reaction : demonstration of the product

Immunohistochemistry

- Identifying cellular and subcellular or tissue constituents (antigens)
- Antigens: proteins in the tissue section
- Antibodies : serum proteins known as immunoglobulins that applied.
- Antigen-Antibody interactions

Essential methods for studying vitality and wound repair on different levels

- Cellular structures
 - Routine histology
 - Special staining methods
- Protein/antigen
 - Immunohistochemistry
 - Quantitative biochemical methods
- mRNA
 - In-situ hybridisation
 - RT-PCR

Table 1. Immunohistochemical detection of parameters in dependence on the survival time (human skin wounds)

Antigen/Marker	Earliest detection	Regular detection or marked reaction	Longest detection
TGF- β 1	(several) minutes	30–60 min	
TGF- α	ca. 10 min	30–60 min	
Fibronectin	ca. 10–20 min	>4 h	Months
IL-1 β	15 min	30–60 min	
IL-6	20 min	60–90 min	
TNF- α	15 min	60–90 min	
ICAM-1	50 min	>2 h	
VCAM-1	30 min	>1.5 h	
E-selectin	30 min	>1–1.5 h	
L-selectin	30 min	>1.5 h	
Tenascin	2–3 days	From 5 days	Months
Collagen III	2–3 days	From 6 days	Months
Collagen V	3 days	From 6 to 7 days	Months
Collagen VI	3 days	From 6 to 7 days	Months
Collagen I	4–6 days	From 7 days	Months
Myofibroblasts			
Laminin	ca. 1.5 days		Months
HSPG	ca. 1.5 days		Months
Collagen IV	4 days		Months
SMC-actin	5 days		Months
Marker of macrophages			
RM 3/1	7 days		Months
25 F 9	11 days		Months
G 16/1	12 days		Months
Epithelial basal membrane			
Fragments (Lm, HSPG, K IV, K VII)	4 days	From 13 days	ca. 21 days
Complete restitution	8 days	From 21 days	
Keratin 5			
Complete staining of basal layer	13 days	From 23 days	

ตัวอย่างการตรวจวัดทางด้านอิมมูโนพยาธิวิทยา

Transforming growth factor (TGF) มีความเกี่ยวข้องกับขบวนการหายของบาดแผล จึงมีการนำมาใช้ในการประเมินอายุของบาดแผล โดย TGF- β 1 ทำหน้าที่ในขบวนการสะสม collagen fiber พบมากภายในช่วง 60 นาทีแรกภายหลังการบาดเจ็บ

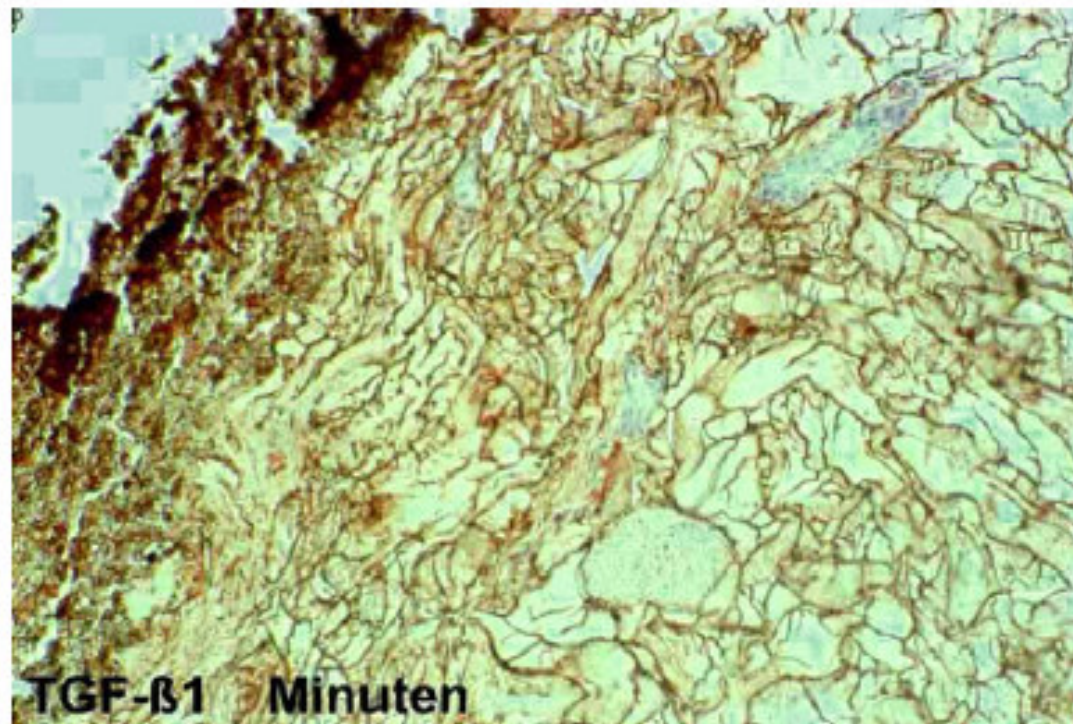


Fig. 2. Network-like immunohistochemical detection of transforming growth factor (TGF) β 1 at the margin of a stab wound, survival time of several minutes (LSAB, 200x)

Case material

	Advantages	Disadvantages
Animal experiments	<ul style="list-style-type: none">- สามารถควบคุมสถานะได้- สามารถประเมินปัจจัยที่มีอิทธิพลได้อย่างถูกต้อง	<ul style="list-style-type: none">- ผลที่ได้สามารถนำไปสู่สถานะที่เกิดกับมนุษย์ได้หรือไม่
Living human tissue samples	<ul style="list-style-type: none">- สามารถควบคุมสถานะได้- สามารถประเมินปัจจัยที่มีอิทธิพลได้อย่างถูกต้อง	<ul style="list-style-type: none">- ไม่สามารถนำไปเปรียบเทียบกับเหตุการณ์จริง
Autopsy samples	<ul style="list-style-type: none">- สะท้อนให้เห็นถึงเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นจริง	<ul style="list-style-type: none">- เกิดกระบวนการสลายตัว/เน่าเปื่อย- ยากต่อการระบุอายุของบาดแผล

Analysis of results

- Qualitative detection

บอกถึงการมี/ไม่มีของตัวชี้วัด

- Semi-quantitative detection

บอกในรูปของ percent range หรือจำนวนของเครื่องหมาย +/-

- Quantitative detection

การนับจำนวนเซลล์ (cell counts/microscopic field)

Quality control

- Control groups or control samples

อย่างน้อย 1 ตัวอย่าง เช่น วิธีทางอิมมูโนพยาธิวิทยา จะมี negative และ positive controls ศึกษาพร้อมกับตัวอย่างบาดแผล

Negative control : primary antibody ถูกแทนด้วย immune serum → (-)

Positive controls : เป็นตัวอย่างที่มี antigen → (+)

ในการศึกษาเกี่ยวกับ **microscopic slides** ในการนับจำนวนเซลล์ควรใช้ผู้สำรวจอย่างน้อย 2 คนที่เป็นอิสระต่อกัน

Conclusion

- การตรวจหา **vitality** ของบาดแผลและตรวจดูความเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการหายของบาดแผลสามารถบอกสาเหตุและจำแนกได้ว่าการบาดเจ็บเกิดขึ้นในขณะที่มีชีวิตหรือเกิดภายหลังการเสียชีวิตได้
- การศึกษาทางวิทยาศาสตร์ต้องมีพื้นฐานความรู้เพียงพอ เช่น การเลือกวิธี ตัวแปรต่างๆ วัตถุประสงค์ฐาน การวิเคราะห์ผล การวิเคราะห์ทางสถิติ และการควบคุมคุณภาพที่เหมาะสม เพื่อลดความเบี่ยงเบนของผลที่ได้รับให้น้อยที่สุด
- สามารถนำการศึกษาทางวิทยาศาสตร์ไปใช้ได้จริงกับงานด้านนิติพยาธิวิทยา