



جامعة الموصل
كلية الطب البيطري

تقييم التغيرات الحيوية للجروح المستحدثة في جلد
الجرذان واستخدامها في تقدير عمر الجرح: دراسة
مرضية نسجية وكيميائية نسجية مناعية

محمد عدنان محمد صالح

رسالة ماجستير

الطب البيطري / الامراض البيطرية

بإشراف

الاستاذ المساعد الدكتور

وسيم حنا كرومي الجميل

تقييم التغيرات الحيوية للجروح المستحدثة في جلد
الجرذان واستخدامها في تقدير عمر الجرح: دراسة
مرضية نسجية وكيميائية نسجية مناعية

رسالة قَدِّمها

محمد عدنان محمد صالح

إلى

مجلس كلية الطب البيطري في جامعة الموصل
في اختصاص الطب البيطري / الأمراض البيطرية
وهي جزء من متطلبات شهادة الماجستير

بإشراف

الاستاذ المساعد الدكتور

وسيم حنا كرومي الجميل

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

قُلْ لَوْ كَانَ الْبَحْرُ مِدَادًا لِكَلِمَاتِ رَبِّي لَنَفِدَ الْبَحْرُ قَبْلَ أَنْ
تَنفَدَ كَلِمَاتُ رَبِّي وَلَوْ جِئْنَا بِمِثْلِهِ مَدَدًا ﴿١٠٩﴾ قُلْ إِنَّمَا
أَنَا بَشَرٌ مِّثْلُكُمْ يُوحَىٰ إِلَيَّ أَنَّمَا إِلَهُمُ إِلَهٌ وَاحِدٌ فَمَنْ كَانَ
يَرْجُوا لِقَاءَ رَبِّهِ فَلْيَعْمَلْ عَمَلًا صَالِحًا وَلَا يُشْرِكْ بِعِبَادَةِ رَبِّهِ
أَحَدًا ﴿١١٠﴾

صدق الله العظيم

إقرار لجنة المناقشة

نشهد بأننا أعضاء لجنة التقويم والمناقشة، قد اطلعنا على هذه الرسالة وناقشنا الطالب في محتوياتها وفيما له علاقة بها بتاريخ / / 2022، وانه جدير لنيل شهادة الماجستير في اختصاص الامراض البيطرية.

عضو لجنة المناقشة
أ. م. د. نزار محمد ظاهر
التاريخ: / / ٢٠٢٢ م

عضو لجنة المناقشة
أ. د. سيفان سعد فاضل
التاريخ: / / ٢٠٢٢ م

عضو لجنة المناقشة (المشرف)
أ. م. د. وسيم حنا كرومي
التاريخ: / / ٢٠٢٢ م

رئيس لجنة المناقشة
أ. د. هناء خليل اسماعيل
التاريخ: / / ٢٠٢٢ م

قرار مجلس الكلية

اجتمع مجلس كلية الطب البيطري في جامعة الموصل بجلسته (.....) والمنعقدة بتاريخ: / / 2022م، وقرر منحه شهادة الماجستير في اختصاص الامراض البيطرية بتقدير

عميد الكلية
الاسم: أ. د. ظافر محمد عزيز
التاريخ: / / ٢٠٢٢ م

مقرر مجلس الكلية
الاسم: أ. د. رعد عبد الغني السنجري
التاريخ: / / ٢٠٢٢ م

إقرار المشرف

أشهد أنّ أعداد هذه الرسالة قد جرى بإشرافي في جامعة الموصل وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في اختصاص الطب البيطري / امراض بيطرية.

التوقيع:

الاسم: أ.م.د. وسيم حنا كرومي

التاريخ: / / ٢٠٢٢ م

إقرار المقوم اللغوي

أشهد أنّ هذه الرسالة الموسومة (تقييم التغيرات الحيوية للجروح المستحدثة في جلد الجرذان واستخدامها في تقدير عمر الجرح: دراسة مرضية نسجية وكيميائية نسجية مناعية) قد تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وتصحيح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر لإسلامة الأسلوب وصحة التعبير.

التوقيع :

الاسم: أ.م.د. ثامر عبدالجبار نصيف

التاريخ: / / ٢٠٢٢ م

إقرار رئيس فرع الامراض وامراض الدواجن

بناءً على التوصيتين المقدمتين من قبل المشرف والمقوم اللغوي، أشرح هذه الرسالة للمناقشة.

التوقيع:

الاسم: أ.د. هناء خليل اسماعيل

التاريخ: / / ٢٠٢٢ م

إقرار رئيس لجنة الدراسات العليا

بناءً على التوصيات المقدمة من قبل المشرف والمقوم اللغوي ورئيس فرع الامراض وامراض الدواجن، أشرح هذه الرسالة للمناقشة

التوقيع:

الاسم: أ.د. رعد عبد الغني السنجري

التاريخ: / / ٢٠٢٢ م

شكر وتقدير

بسم الله الرحمن الرحيم ، والصلاة والسلام على خير خلق الله اجمعين سيدنا محمد " صلى الله عليه وسلم" وعلى اله وصحبه الطيبين الطاهرين...

ليس بعد تمام العمل شيء أجمل من الحمد، فالحمد لله والشكر له كما ينبغي لجلال وجهه وعظيم سلطانه، وكما ينبغي لجزيل فضله وعظيم إحسانه على ما أنعم به عليّ من إتمام هذا البحث المتواضع.

ثم أنه لا يسعني إلا أن أشيد بالفضل وأقر بالمعروف لكل من أسهم في إنجاز هذا البحث وأخص بالذكر...

رئاسة جامعة الموصل وعمادة كلية الطب البيطري ورئاسة فرع الأمراض وأمراض الدواجن ، وكافة تدريسي الفرع، لما قدموا من النصائح والتوجيهات طوال مدة الدراسة.

كما لا يفوتني ان اتقدم بجزيل الشكر والتقدير لمشرفي أ.م.د. وسيم حنا كرومي الجميل الذي تفضل بالإشراف على هذا البحث، حيث قدّم لي كل النصح والإرشاد طوال فترة الإعداد فله مني كل الشكر والثناء.

كما يطيب لي ان اتقدم بالشكر والتقدير إلى كل من اسهم وأعانني في اتمام البحث، واقدم اعترازي وشكري الجزيل الى عائلتي واهلي واصدقائي لدورهم الكبير في دعمي اثناء مسيرة البحث.

الباحث

محمد عدنان محمد

الخلاصة

إن عملية تحديد عمر الجروح وحيويتها تعدّ من المسائل ذات الأهمية العالية في الطب العدلي، حيث يعتمد عليها أخصائي هذا المجال لإعادة مسرح الجريمة، والوصول الى الجاني من خلال الكشف عن المدة الزمنية للجروح وتحديد حيويتها إذا حدثت قبل الموت او بعده. هدفت هذه الدراسة الى تحديد عمر الجروح وحيويتها من خلال الاعتماد على الخصائص النسجية لعملية التئام الجروح، فضلاً عن تقييم فعالية الوسيطات الالتهابية (الانترلوكين السادس Interleukin-6، عامل نخر الورم- ألفا Tumor Necrosis Factor alpha) و مؤشرات الخلايا الالتهابية المتمثلة بمجاميع التمايز Cluster of Differentiation (CD15، CD68) بوصفها مؤشرات عالية الدقة لتحديد عمر الجروح وحيويتها.

أجريت هذه الدراسة على 39 جرداً على عينات الجلد المجروح، إذ أُحدثت جروح خطية في جلد الجرذان، ثم أخذت العينات بعد انقضاء الفترة الزمنية لكل مجموعة وحفظها في الفورمالين الدارئ 10% لغرض الفحص النسجي المرضي باستخدام الصبغة الروتينينية الهيماتوكسلين والايوسين، والفحص الكيميائي النسجي المناعي، وأخذت جميع العينات في مجاميع الجروح الحيوية بعد 30 و 60 و 180 و 360 دقيقة من احداث الجرح، وفي مجاميع الجروح غير الحيوية أخذت عينات الجلد المجروح بعد 30 و 60 و 180 و 360 دقيقة بعد الموت مع عينات مجاميع السيطرة (جلد بدون جروح)،

أشار الفحص النسجي المرضي لمجاميع الجروح الحيوية في جلد الجرذان الى وجود استجابة التهابية تمثلت في النزف والاحتقان و توسع قطر الأوعية الدموية القريبة من موقع الجرح، فضلاً عن استجابة الخلايا الالتهابية التي تمثلت بارتشاح العدلات Neutrophils والخلايا البلعمية Macrophages، حيث لوحظ بدء ارتشاح العدلات عند الدقيقة 30 من عمر الجروح وزيادتها بشكل كبير في الدقيقة 60 حتى الدقيقة 360 دقيقة من عمر الجروح الحيوية، فيما لوحظ بدء ارتشاح الخلايا البلعمية بصورة واضحة بعد الدقيقة 180 من عمر الجروح، لتصل الى أعلى مستوى في الدقيقة 360 من عمر الجروح الحيوية، فيما اقتصر التغيرات النسجية المرضية في الجروح غير الحيوية على وجود نزف دموي، فضلاً عن ملاحظة علامات التحلل الذاتي Autolysis بعد مرور 180 دقيقة من عمر الجروح.

فيما أشار الفحص الكيميائي النسجي المناعي الى بدء ارتشاح الخلايا المعبرة عن سي دي 15 في الدقيقة 30 من عمر الجروح الحيوية وشهدت مجموعة الجروح بعمر 360 دقيقة من عمر الجروح الحيوية ارتشاحاً كثيفاً للخلايا المعبرة عن سي دي 15، حيث تجاوزت بكثير نسبة الخلايا المرتشحة في كل من الدقيقة 30 و 180 من عمر الجروح الحيوية، فيما أشار الفحص الكيميائي النسجي المناعي عن بدء ارتشاح الخلايا البلعمية المعبر عن سي دي 68 في الدقيقة 30 من عمر الجروح الحيوية، ولكن بأعداد قليلة جداً تبدأ بالازدياد في الدقيقة 180 من عمر الجروح وتصل الى أعلى مستوى للارتشاح في الدقيقة 360 من عمر الجروح الحيوية، و نظراً لعدم ارتشاح الخلايا المعبرة عن كل من سي دي 15 و سي دي 68 في جميع الفترات الزمنية لمجاميع الجروح غير الحيوية، يمكن الاعتماد على هذه المؤشرات في تحديد الجروح الحيوية من الجروح غير الحيوية.

علاوة على ذلك كشفت نتائج الفحص الكيميائي النسجي المناعي للدراسة الحالية أن الوسيطات الالتهابية الانترلوكين-6 وعامل نخر الورم ألفا، لم يتم التعبير عنهم في عينات الجلد غير المجروح، فيما لوحظ أول تعبير عن كلا الوسيطات الالتهابية في الدقيقة 30 من عمر الجروح الحيوية، بينما زاد التعبير عن هذه الوسيطات عند الدقيقة 180 وبلغ شدته عند الدقيقة 360 من عمر الجروح الحيوية، فيما لم يعبر عن الانترلوكين-6 و عامل نخر الورم ألفا أو عبر عنهم بشدة منخفضة جداً في المناطق البعيدة عن حواف الجرح في الجروح الحيوية والعينات غير المجروحة والجروح غير الحيوية.

واستنتجت هذه الدراسة انه بالإمكان الاعتماد في تحديد عمر الجروح وحيويتها على الفحص النسجي المرضي، وذلك بالاعتماد على نسبة ارتشاح الخلايا الالتهابية المتمثلة بالعدلات والخلايا البلعمية في الجرح التي تعد مؤشراً حيوياً مهماً للجروح الحيوية، كذلك يمكن الاعتماد على الوسيطات الالتهابية مثل الأنترلوكين-6 و عامل نخر الورم ألفا، فضلاً عن مؤشرات الخلايا الالتهابية CD15، CD68 باستخدام الفحص الكيميائي النسجي المناعي للكشف عن مستويات التعبير عن هذه المؤشرات واستخدامها لتحديد عمر الجروح وحيويتها.

ثبت المحتويات

الصفحة	الموضوع	ت
أ		الخلاصة
ج		ثبت المحتويات
هـ		ثبت الجداول
هـ		ثبت الاشكال
1	Introduction	الفصل الاول: المقدمة
4	Literatures Review	الفصل الثاني: استعراض المراجع
4	Skin Structure	تركيب الجلد 1-2
5	Skin layers	طبقات الجلد 2-2
5	Epidermis	البشرة 1-2-2
5	Stratum Basale	الطبقة القاعدية للبشرة 1-1-2-2
6	Stratum Spinosum	الطبقة الشوكية 2-1-2-2
6	Stratum Granulosum	الطبقة الحبيبية 3-1-2-2
6	Stratum Lucidum	الطبقة الظاهرية 4-1-2-2
6	Stratum Corneum	الطبقة المتقرنة 5-1-2-2
7	Dermis	الأدمة 2-2-2
8	Hypoderm	الطبقة الدهنية 3-2-2
9	Skin Wounds	الجروح الجلدية 3-2
10	according to Wound Classification Forensic Medicine	تصنيف الجروح في الواجهة الطبية العدلية 1-3-2
10	Blunt injury	الجروح غير الحادة 1-1-3-2
11	Bruise	الكدمات 1-1-1-3-2
11	Abrasion's	السحجات 2-1-1-3-2
11	Laceration	التمزق 3-1-1-3-2
12	Sharp Injury	الجروح الحادة 2-1-3-2
12	Stab wounds	جروح الطعنة 2-1-2-3-2
12	Incised wounds	الجروح القطعية 2-1-2-3-2
13	Chop wound	الجروح الجذية 3-2-2-3-2
13	Wound Healing	التئام الجروح 4-2
14	Determination of Wound Age and Vitality	تحديد عمر الجروح وحيويتها 5-2
15	Methods for wound-age estimation	طرائق تقدير عمر الجروح 6-2

الصفحة	الموضوع	ت
15	Morphological analysis التحليل الشكلي	1-6-2
16	Biochemical methods الطرائق الكيميائية الحيوية	2-6-2
16	الكشف عن الحمض النووي الريبوزي الميكروي باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل MicroRNAs (miRNAs)	3-6-2
16	تفاعل البلمرة المتسلسل في الوقت الحقيقي (real-time polymerase chain reaction)	4-6-2
17	لطفة ويسترن و مقايصة الممتر المناعي المرتبط بالإنزيم (Western blotting and enzyme-linked immunosorbent assays)	5-6-2
17	Histopatholoical Changes التغيرات المرضية النسيجية	6-6-2
18	تقنية الكيمياء النسيجية المناعية (Immunohistochemistry)	7-6-2
18	Biomarkers of المؤشرات الحيوية لتحديد عمر الجرح Wound Age	7-2
19	Inflammatory Mediators الوسيطات الالتهابية	1-7-2
20	الأنترلوكين - 6 (Interleukin-6)	1-1-7-2
21	عامل نخر الورم ألفا (Tumor Necrosis Factor α)	2-1-7-2
22	Inflammatory cell markers علامات الخلايا الالتهابية	2-7-2
23	Cluster of differentiation15 (CD15) سي دي 15	1-2-7-2
23	Cluster of Designation 68 (CD68) سي دي 68	2-2-7-2
25	الفصل الثالث: المواد و طرائق العمل Materials & Methods	
25	حيوانات التجربة	1-3
25	تصميم التجربة	2-3
27	إحداث الجروح وجمع العينات	3-3
27	تخدير حيوانات التجربة	1-3-3
27	احداث الجرح	2-3-3
28	جمع العينات	3-3-3
28	التقطيع النسيجي للعينات	4-3
30	تقنية الكيمياء النسيجية المناعية	5-3
32	تحليل الفحص الكيميائي النسيجي المناعي	6-3
33	الفصل الرابع: النتائج Results	
33	Histopathological examination الفحص المرضي النسيجي	1-4
41	الفحص الكيميائي النسيجي المناعي Immunohistochemistry Examination	2-4

الصفحة	الموضوع	ت
54	المناقشة Discussion	الفصل الخامس:
54	العلامات النسجية المرضية للجروح المحدثة	1-5
56	التحليل الكيميائي النسيجي المناعي للجروح المحدثة	2-5
60	الاستنتاجات والتوصيات	الفصل السادس:
60	الاستنتاجات: Conclusions	1-6
61	التوصيات: Recommendation	2-6
62		المصادر
A		Abstract

ثبت الجداول

الصفحة	العنوان	رقم الجدول
31	الاجسام المضادة الاولية المستخدمة في الدراسة	1-3
52	شدة التعبير عن سي دي 15، سي دي 68، الانترلوكين-6 وعامل نخر الورم الفافي مجاميع الجروح الجلدية قبل وبعد الموت	1-4

ثبت الأشكال

الصفحة	العنوان	رقم الشكل
7	مقطع عرضي لطبقات البشرة في الجلد	1-2
9	مقطع عرضي يظهر تركيب طبقات الجلد	2-2
26	مجاميع الدراسة	1-3
27	إحداث جرح خطي في جلد جرذان مخدرة	2-3
33	مقطع نسجي لجلد جرذان غير مجروح من مجموعة السيطرة	1-4
34	مقاطع نسيجية لجروح جلدية في الجرذان لمجموعة الجروح الحيوية بعمر 30 دقيقة	2-4

الصفحة	العنوان	رقم الشكل
35	مقاطع نسجية لجروح جلدية في الجردان لمجموعة الجروح غير الحيوية بعمر 30 دقيقة	3-4
36	مقاطع نسجية لجلد جردان من مجموعة الجروح الحيوية بعمر 60 دقيقة.	4-4
36	مقاطع نسجية لجلد جردان من مجموعة الجروح غير الحيوية بعمر 60 دقيقة.	5-4
37	مقاطع نسجية لجلد جردان من مجموعة الجروح الحيوية بعمر 180 دقيقة	6-4
38	مقاطع نسجية لجلد جردان من مجموعة الجروح غير الحيوية بعمر 180 دقيقة	7-4
39	مقاطع نسجية لجلد جردان من مجموعة الجروح الحيوية بعمر 360 دقيقة	8-4
39	مقاطع نسجية لجلد جردان من مجموعة الجروح الحيوية بعمر 360 دقيقة	9-4
40	نسبة ارتشاح الخلايا الالتهابية المتمثلة بالعدلات والخلايا البلعمية بين المجاميع المختلفة للجروح الحيوية (AM) Antemortem.	10-4
41	الفحص الكيميائي النسجي المناعي للكشف عن الخلايا المعبرة عن سي دي 15، مجموعة السيطرة.	11-4
42	الفحص الكيميائي النسجي المناعي للكشف عن الخلايا المعبرة عن سي دي 15 مجموعة الجروح الحيوية بعمر 30 دقيقة	12-4
42	الفحص الكيميائي النسجي المناعي للكشف عن الخلايا المعبرة عن سي دي 15، مجموعة الجروح الحيوية بعمر 180 دقيقة	13-4
43	الفحص الكيميائي النسجي المناعي للكشف عن الخلايا المعبرة عن سي دي 15. مجموعة الجروح الحيوية بعمر 360	14-4
43	الفحص الكيميائي النسجي المناعي للكشف عن الخلايا المعبرة عن سي دي 15، مجاميع الجروح غير الحيوية	15-4
44	الفحص الكيميائي النسجي المناعي للكشف عن الخلايا المعبرة عن سي دي 68. مجموعة السيطرة بدون جروح.	16-4
45	الفحص الكيميائي النسجي المناعي للكشف عن الخلايا المعبرة عن سي دي 68، مجموعة الجروح الحيوية بعمر 30 دقيقة	17-4
45	الفحص الكيميائي النسجي المناعي للكشف عن الخلايا المعبرة عن سي دي 68، مجموعة الجروح الحيوية بعمر 360 دقيقة	18-4
46	الفحص الكيميائي النسجي المناعي للكشف عن الخلايا المعبرة عن سي دي 68، مجموعة الجروح الحيوية بعمر 360 دقيقة	19-4

الصفحة	العنوان	رقم الشكل
	دي 68، مجاميع الجروح غير الحيوية	
47	الفحص الكيميائي النسجي المناعي للكشف عن الانترلوكين-6 في النسيج في مجاميع الجروح الحيوية.	20-4
47	الفحص الكيميائي النسجي المناعي للكشف عن الانترلوكين-6 في النسيج في مجاميع الجروح الحيوية، بعمر 30 دقيقة	21-4
48	الفحص الكيميائي النسجي المناعي للكشف عن الانترلوكين-6 في النسيج في مجاميع الجروح الحيوية بعمر 360 دقيقة	22-4
48	الفحص الكيميائي النسجي المناعي للكشف عن الانترلوكين-6 في النسيج في مجاميع الجروح غير الحيوية، بعمر 30 دقيقة	23-4
49	الفحص الكيميائي النسجي المناعي للكشف عن الانترلوكين-6 في النسيج في مجاميع الجروح غير الحيوية بعمر 360 دقيقة	24-4
50	الفحص الكيميائي النسجي المناعي للكشف عامل نخر الورم ألفا في مجاميع الجروح الحيوية، مجموعة السيطرة بدون جروح	25-4
50	الفحص الكيميائي النسجي المناعي للكشف عامل نخر الورم ألفا في مجاميع الجروح الحيوية، بعمر 30 دقيقة	26-4
51	الفحص الكيميائي النسجي المناعي للكشف عامل نخر الورم ألفا في مجاميع الجروح الحيوية، مجموعة الجروح بعمر 360 دقيقة	27-4
51	الفحص الكيميائي النسجي المناعي للكشف عامل نخر الورم ألفا في مجاميع الجروح غير الحيوية بعمر 30 دقيقة	28-4

الفصل الاول

المقدمة

Introduction

تُعدّ عملية تحديد عمر الجروح وحيويتها من القضايا التقليدية في الطب العدلي، إذ اتجه علماء الطب العدلي الى تحديد حيوية الجروح اذا ما حدثت قبل الموت او بعده، فضلاً عن تحديد المدّة الزمنية المنقضية على الجرح باستخدام العديد من التحليلات عالية الدقة في تقييم العديد من المواد الحيوية مثل السايبتوكينات وعوامل النمو على المستويين الخلوي والجزيئي (Li et al., 2020). يُعرّف الجرح بأنه اضطراب في الوظيفة الطبيعية للعضو نتيجة تحطم النسيج الناتج عن قوة خارجية، وتعدّ عملية التئام الجروح استجابة حيوية معقدة ومنظمة تنظيماً جيداً، تبدأ مباشرة بعد حدوث الجرح، تتكون عملية التئام الجروح من عدة اطوار تشمل طور الإرقاء Hemostasis، الطور الالتهابي Inflammatory Phase، و الطور التكاثري للخلايا Proliferative Phase، و طور النضج Maturation Phase، تتحرر العديد من الجزيئات التنظيمية خلال هذه الأطوار مثل السايبتوكينات Cytokines، الكيموكينات Chemo-kines، وعوامل النمو Growth Factors التي تعمل على تنظيم عملية الالتئام عن طريق تأثيرها المباشر في الخلايا المشاركة في عملية الالتئام (Grellner and Madea, 2007). ويمكن الاعتماد على مجموعة متنوعة من الطرائق في تحديد عمر الجروح وحيويتها مثل الفحص المرضي النسيجي Histopathological Examination وتقنية الكيمياء النسجية المناعية Immunohistochemistry (Cecchi, 2010). تعد تقنية الفحص المرضي النسيجي طريقة تقليدية ومحل قلق لعلماء الامراض في الطب العدلي في تحديد عمر الجروح وحيويتها، ولاسيماً في الجروح المبكرة ولكن لا يمكن الاستغناء عنها، وهناك حاجة مستمرة لها في التطبيقات اليومية، حيث يمكن الاعتماد على تقنية الفحص النسيجي المرضي من قبل علماء الأمراض في الطب العدلي من خلال الكشف عن ارتشاح الخلايا الالتهابية في الجروح التي تبدأ في الارتشاح في الدقائق الاولى من عمر الجرح المتمثلة

بالخلايا الحبيبية العدلات Neutrophils، فيما تبدأ الخلايا البلعمية Macrophages في الارتشاح بعد عدة ساعات من عمر الجروح الحيوية (Betz, 1994). فيما تعدّ تقنية الكيمياء النسجية المناعية الطريقة الأمثل لأخصائي علم الأمراض في الطب العدلي بسبب دقتها العالية وتطبيقها البسيط على النسيج المظمور في شمع البارافين المثبت في الفورمالين، حيث تسمح هذه التقنية بالكشف عن المادة محل الاهتمام Biomarkers داخل النسيج أو الخلية في الدقائق الأولى من عمر الجرح (Ma et al., 2011). كما تم استخدام تقنية الكيمياء النسجية المناعية في تحديد عمر الجروح المبكرة عن طريق الكشف عن الوسيطات الالتهابية، مثل الساييتوكينات مثل عامل نخر الورم ألفا والأنترلوكين-6 والأنترلوكين-8 التي تفرز خلال المرحلة الالتهابية فضلاً عن الكشف عن العلامات الخاصة بالخلايا الالتهابية المتواجدة في منطقة الجرح من قبل مجموعة من الباحثين (Fronczek et al., 2015a). وتعدّ الساييتوكينات مثل الأنترلوكين-6 (IL-6) و Interleukin 6 وعامل نخر الورم الفا Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α)، من العوامل المهمة المؤدية للالتهاب (Ritsu et al., 2017). إذ تؤدي دوراً مهم في عملية التئام الجروح من خلال تحفيز الخلايا الكيراتينية، وانتشار الخلايا الليفية، فضلاً عن جذب الكيمياء لخلايا الدم البيض في موقع الجرح (Werner and Grose, 2003). لذلك استعمل علماء الأمراض في الطب العدلي العديد من الوسيطات الالتهابية المتمثلة بالسيتوكينات والكيموكينات كمؤشرات حيوية لتحديد عمر الجروح وحيويتها فضلاً عن الخصائص النسجية لعملية التئام الجروح (Kondo et al., 2002). وتعدّ علامات مجموعة التمايز Cluster of differentiation (CD) مجموعة من البروتينات التي يتم التعبير عنها من خلال الخلايا الالتهابية ويمكن ان تستخدم كمؤشرات في تحديد عمر الجروح (van et al., 2014). وتعد خلايا العدلات والبلعمية أكثر الخلايا الالتهابية تواجداً في الجروح المبكرة (Singer & Clark, 1999). فيما تعدّ CD15 و CD68 علامات محددة تستخدم عادة في تحديد خلايا العدلات والخلايا البلعمية على التوالي (Elghetany et al., 2004).

اجريت هذه الدراسة لتحقيق الاهداف الاتية:

1. تحديد عمر الجروح وحيويتها قبل الموت وبعده من خلال الخصائص النسجية لعملية النئام الجروح.
2. استخدام الفحوصات الكيميائية النسجية المناعية لتقييم دور الوسيطات الالتهابية (الانترلوكين-6 و عامل نخر الورم - الفا) و مجاميع التمايز للخلايا المناعية (CD15، CD68) في تحديد عمر الجروح وحيويتها.

الفصل الثاني

استعراض المراجع

Literatures Review

1-2 تركيب الجلد Skin Structure

الجلد هو أكبر عضو في الجسم، إذ يمثل حوالي 15% من إجمالي وزن الجسم البالغ، ويؤدي الجلد العديد من الوظائف الحيوية، بما في ذلك الحماية من العوامل الفيزيائية والكيميائية والحيوية الخارجية، فضلاً عن منع فقدان الماء الزائد من الجسم، فضلاً عن دوره المهم في تنظيم درجة حرارة الجسم، يحيط الجلد بجميع أجزاء الجسم من الخارج ويستمر مع الأغشية المخاطية التي تبطن الجسم (Kanitakis, 2002). نسيجياً يتكون الجلد من ثلاث طبقات متميزة من الداخل وهي: طبقة تحت الأدمة Hypodermis ، الأدمة Dermis و البشرة Epidermis، تُعد طبقة تحت الأدمة أعمق طبقة من الجلد تتكون بشكل أساس من الأنسجة الدهنية وتستخدم لتخزين الدهون وتعدّ عازلاً للجسم عن المحيط الخارجي حيث تحافظ على حرارة الجسم الداخلية فضلاً عن امتصاص الصدمات الخارجية، فيما تعد الأدمة الطبقة الوسطى من الجلد، إذ تقع الأدمة بين البشرة والطبقة الدهنية وتتكون من نسيج ضامّ يتكون من خلايا ليفية، وتحتوي الأدمة على الأوعية الدموية، والأوعية اللمفية، والأعصاب وبصيلات الشعر فضلاً عن الغدد العرقية، وأخيراً الطبقة الخارجية للجلد (البشرة)، تتكون من مجموعة متنوعة من الخلايا، مثل الخلايا الصبغية Melanocytes ، خلايا لانكرهانز Langerhans cells، خلايا مركل Merkel cells والخلايا الكيراتينية Keratinocytes. تصنع الخلايا الصبغية صبغة الميلانين المسؤولة عن تلوين البشرة وحمايتها من التأثيرات الضارة للأشعة فوق البنفسجية، والذي ينتج عن امتصاص الطاقة الضوئية بواسطة الكروموفورات الخلوية Cellular Chromophores ، مما يؤدي إلى الإجهاد التأكسدي وظفرات الحمض النووي المحتملة في الخلايا (Slominski et al., 2017).

2-2 طبقات الجلد Skin layers

1-2-2 البشرة Epidermis

تُعدّ البشرة الطبقة الخارجية لجلد الثدييات، حيث تشكل حاجزاً أساسياً و ضرورياً للحفاظ على الوظائف الأساسية للجلد وهي نسيج ظهاري حرشفي Stratified epithelium يتم الحفاظ عليها من خلال تكاثر الخلايا الجذعية Epidermal stem cells الموجودة في الطبقة القاعدية من البشرة Stratum Basale (Yang et al., 2020). وتُعدّ الخلايا الكيراتينية Keratinocytes التي تشكل حاجز الجلد، هي النوع السائد من الخلايا الموجودة في البشرة، حيث تشكل حوالي 90% من خلايا البشرة، كما إنها تشكل الطبقات الخمسة للبشرة التي تشمل الطبقة القاعدية Stratum basale، والطبقة التالية تسمى الطبقة الشوكية Stratum Spinosum، تليها الطبقة الحبيبية Stratum Granulosum، والطبقة الظاهرية Stratum Lucidum، والطبقة المتقرنة Stratum Corneum (Kang et al., 2019). الشكل (1-2).

1-1-2-2 الطبقة القاعدية للبشرة Stratum Basale

هي أعمق طبقة من البشرة والطبقة العلوية من الأدمة، تتكون الطبقة القاعدية في الغالب من الخلايا الجذعية للخلايا الكيراتينية القاعدية، التي تتميز إلى خلايا أخرى تشكل هيكل البشرة، ويتم تثبيتها في موضعها عبر الجسيمات الرابطة Hemidesmosomes ملتصقة بغشاء قاعدي كولاجيني (Dinulos et al., 2019). وتعدّ الطبقة القاعدية أيضاً موطناً لخلايا أكثر تخصصاً مثل الخلايا الصبغية وخلايا لانكرهانز وخلايا ميركل على التوالي، والخلايا العارضة للمستضد المتخصصة Antigen-Presenting Cells، والبيبتيدات الصم العصبية Neuroendocrine Peptides. وتعمل الطبقة القاعدية على حماية البشرة من الصدمات، من خلال إسقاط أعمدة البشرة التي تعرف بالتنوعات الشبكية في الأدمة المجاورة (Gantwerker and Hom, 2012).

2-1-2-2 الطبقة الشوكية Stratum Spinosum

تُعرف باسم طبقة الخلايا الشائكة، تقع بين الطبقة الحبيبية والطبقة القاعدية للبشرة، تتميز خلايا هذه الطبقة بمظهر شائك بسبب تقعر الألياف الدقيقة العالقة بين الجسيمات الرابطة Desmosomes. تتكون هذه الطبقة من الخلايا المنتجة للكيراتين التي تنتج بروتين ليفي يسمى الكيراتين الخلوي Cytokeratin . تتجمع الكيراتينات الخلوية لتكوين ليف موتر داخل الخلايا التي بدورها تشكل الجسيمات الرابطة Desmosomes (اتصالات مرنة بين الخلايا). هناك عدة طبقات من الخلايا الكيراتينية متعدّدة السطوح في العمق قابلة للانقسام تساعد في استبدال الخلايا القديمة الخارجية (Yadav et al., 2019).

3-1-2-2 الطبقة الحبيبية Stratum Granulosum

تتكون من 3-5 طبقات خلوية، تضم خلايا ماسية الشكل مع حبيبات كيراتينية هيلانية Keratohyalin Granules وحبيبات صفائحية Lamellar Granules ، وتحتوي حبيبات الكيراتوهيالين على سليفات الكيراتين التي تتجمع في النهاية وتشكل حزمًا. بينما تضم الحبيبات الصفائية على الدهون الكلايكوجينية glycolipids التي تفرز على سطح الخلايا وتعمل كغراء ، مما يبقي الخلايا ملتصقة ببعضها (Yousef et al., 2017).

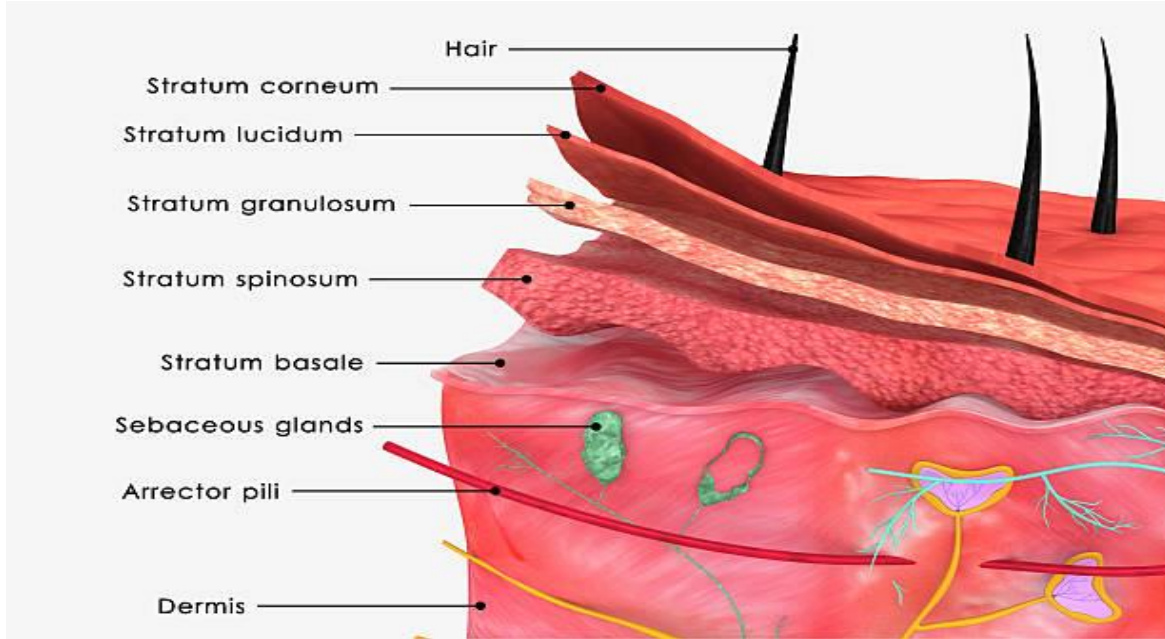
4-1-2-2 الطبقة الظاهرية Stratum Lucidum

تقع هذه الطبقة بين الطبقة الحبيبية والطبقة المتقرنة للبشرة. توجد هذه الطبقة فقط في الجلد السميك من الجسم كما في باطن الكف وفي القدم، تتكون من 3-5 طبقات وتحتوي على نسبة عالية من الكيراتين، تمتاز خلايا هذه الطبقة بغشاء معتم مع سيتوبلازم كثيف (Zaidi & Lanigan, 2010)

5-1-2-2 الطبقة المتقرنة Stratum Corneum

تعدّ الطبقة الخارجية للبشرة، وتمثل الطبقة المتقرنة خط الدفاع الأول للجسم، حيث تؤدي دوراً أساسياً بوصفها حاجزاً جلدياً وقائياً ضد البيئة الخارجية. تساعد الطبقة القرنية في الترطيب واحتباس الماء، مما يمنع تشقق الجلد وتتكون من الخلايا القرنية Corneocytes، وهي خلايا كيراتينية وصلت إلى المرحلة النهائية من التمايز للخلايا الكيراتينية. تحتفظ الخلايا القرنية بخيوط الكيراتين داخل بنية الفيلاغرين Filaggrin، ويحلّ الغلاف الدهني المتقرن

محل الغشاء البلازمي للخلية الكيراتينية. تنتظم هذه الخلايا المسطحة على هيئة تركيب دهني مميز داخل النسيج خارج الخلايا (Murphrey et al., 2018).



الشكل (1-2) مقطع عرضي لطبقات البشرة في الجلد

(<https://silkspa.wordpress.com/2016/10/25/the-5-skin-layers>)

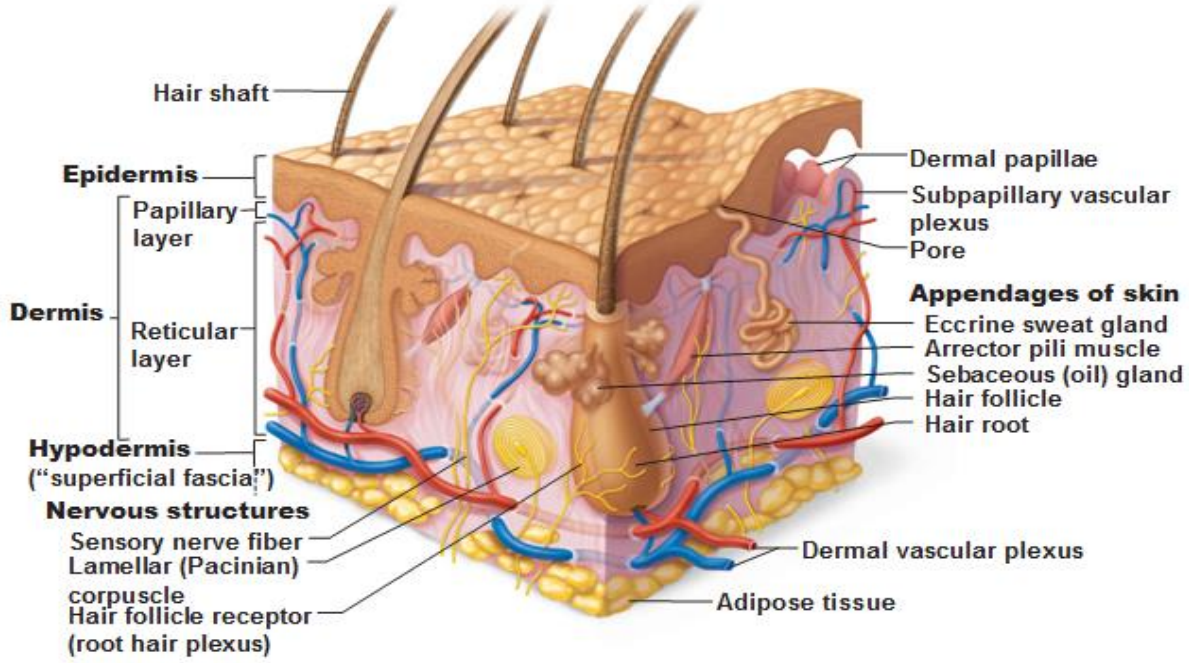
2-2-2 الأدمة Dermis

الأدمة هي طبقة من النسيج الضام محصورة بين البشرة والأنسجة تحت الجلد. وتعدّ الأدمة بنية ليفية تتكون من الكولاجين والأنسجة المرنة ومكونات أخرى خارج الخلية تشمل الأوعية الدموية والنهايات العصبية وبصيلات الشعر والغدد، يتمثل دور الأدمة في دعم وحماية الجلد والطبقات العميقة، والمساعدة في التنظيم الحراري، والإحساس. وتعد الخلايا الليفية هي الخلايا الأولية داخل الأدمة فضلاً عن الخلايا النسجية Histiocytes، والخلايا البدنية Mast Cells، والخلايا الشحمية Adipocytes التي تؤدي دوراً مهماً في الحفاظ على البنية الطبيعية ووظيفة الأدمة (Brown and Krishnamurthy, 2021). تنقسم الأدمة إلى طبقتين: الأدمة الحليمية Papillary dermis والأدمة الشبكية Reticular dermis، أما الأدمة الحليمية فهي الطبقة السطحية التي تقع في عمق البشرة، وتتكون الأدمة الحليمية من نسيج ضام رخو غزير الأوعية الدموية، وأما الطبقة الشبكية هي الطبقة العميقة، وتشكل طبقة

سميكة من النسيج الضام الكثيف الذي يشكل الجزء الأكبر من الأدمة، و يعد الكولاجين هو المكون الرئيس والاساس للأدمة. حيث تضمّ الادمة الكولاجين من النوع الأول Type I والنوع الثالث Type III بكثرة، وتؤدّي الألياف المرنة Elastic fibers أيضاً دوراً هيكلياً مهماً داخل الأدمة، وتتكون الألياف المرنة من الألياف الدقيقة من النسيج المرن والليفين Elastin and fibrillin microfibrils، بخلاف الكولاجين، ويسمح التكوين الكيميائي الحيوي للنسيج المرن بالانزلاق والتمدد والارتداد للألياف (Green et al., 2014). هناك العديد من أنواع الخلايا الموجودة داخل النسيج الضامّ للأدمة، بما في ذلك الارومات الليفية Fibroblasts، الخلايا البلعمية Macrophages، والخلايا الشحمية Adipocytes، والخلايا البدينة Mast cells، وخلايا شوان Schwann cells، والخلايا الجذعية Stem cells (Prost-Squarcioni et al., 2008). شكل (2-2).

3-2-2 طبقة تحت الأدمة Hypoderm

وتسمى أيضاً الطبقة الداخلية للجلد باسم طبقة تحت الجلدية، وهي طبقة تحتوي على شبكة من الخلايا الدهنية والكولاجين، وهي مسؤولة عن الحفاظ على حرارة الجسم وتعمل كمنصص للصدمات (Bolzinger et al., 2012). وتتكون الطبقة الدهنية بشكل اساس من الخلايا الليفية والخلايا الدهنية التي لها دور خاص في توازن الخلايا الشحمية في السمنة (Stienstra et al., 2014). وتؤدّي الطبقة الدهنية دوراً مهماً في التمثال الشحمي وهو غني بشكل خاص بالمستقبلات المقترنة بالبروتين كوانين G protein، التي تنظم تحلل الدهون وإفراز الأديبونكتين Adiponectin واللبتين Leptin (Amisten et al., 2015). ويخزن النسيج تحت الجلد الطاقة من خلال التفاعلات الحيوية. كما يُعدّ الاديبونكتين وسيطاً محدداً للخلايا الشحمية تحت الجلد. بالإضافة إلى ذلك يعدّ النسيج تحت الجلد عضواً في الغدد الصماء حيث يقوم بتحويل الأندروستيدينيون Androstenedione إلى إسترون Estrone بواسطة إنزيم الأروماتاز Aromatase، علاوة على ذلك تنتج الخلايا الشحمية اللبتين الذي ينظم وزن الجسم (Kolarsick et al., 2011). شكل (2-2).



الشكل (2-2) مقطع عرضي يظهر تركيب طبقات الجلد

(<https://thesciencyfellow.wordpress.com/2016/08/04/fun-fact-7/skin-structure/>)

3-2 الجروح الجلدية Skin Wounds

يُعرّف الجرح بأنه تلف أو اضطراب في التركيب التشريحي والوظيفة الطبيعية للعضو (Robson *et al.*, 2001). يمكن أن تنشأ الجروح نتيجة عوامل مرضية خارجية أو داخلية، وتشمل العوامل الخارجية عوامل فيزيائية و كيميائية أو نتيجة قوة ميكانيكية خارجية، بغض النظر عن السبب ومهما كانت المشكلة، فإن النسيج قد يتعرض الى ضرر أو اضطراب مما يؤدي الى فقدان الوظيفة الطبيعية، بالإضافة الى الشكل الطبيعي للنسيج. وتؤدي الاستجابة الطبيعية للعامل الضار إلى حدوث نزيف وتقلص الأوعية الدموية مع التخثر وتفعيل المتمم Complement والاستجابة الالتهابية (Robson, 1997). يحدث الجرح أو الإصابة بالجسم عندما تكون القوة المؤثرة في الجسم أكبر من قدرة الجسم على امتصاص هذه القوة، وتشير آلية الإصابة إلى قوى مختلفة مرتبطة بشكل شائع بالصدمات (مثل الصدمات المقذوفة والإصابات الحادة وغير الحادة والحرارية وغير ذلك). يعتمد التحديد الدقيق للآلية على التعرف على الأنماط وشكل الجرح، بالإضافة إلى إسهامات العوامل الداخلية والخارجية التي تملّي طريقة الجروح و الإصابات (Polson *et al.*, 1985). وتعدّ الجروح من المسائل المهمة في الطب العدلي وذلك من خلال تحديد حيوية الجروح في ما اذا كانت قد حدثت قبل الموت أو بعده،

والمساهمة في الوصول الى الجاني (Kondo and Ishida.,2010). وقد اتجه علماء الطب العدلي للتركيز على تقييم حيوية الجرح وتحديد المدة الزمنية على حدوث الجرح، حيث مكن التقدم الأخير في تقنيات الطب العدلي، ولا سيما التحليلات عالية الدقة في تقييم المواد على المستوى الخلوي والجزيئي، وكذلك في وقت واحد تقييم علامات متعددة (Li et al., 2020). وتنقسم الإصابات الناتجة عن القوة الميكانيكية عموماً إلى فئتين، هما: القوى الحادة وغير الحادة، وقد يكون هنالك أكثر من نوع واحد من الإصابات في الجلد التي تصيب الجسم وقد تكون موضعية ومنتشرة، وفي بعض الأحيان لا يستبعد عدم وجود إصابة خارجية للجلد أو الأعضاء الخارجية إمكانية حدوث إصابة خطيرة للأعضاء الداخلية أو أجزاء الجسم الداخلية (Sharma et al., 2011). وتصنف الجروح من الوجهة القانونية على انها جروح بسيطة او جروح خطيرة او جروح مميتة، الجروح البسيطة: هي الجروح التي تشفى بمدة تقل عن عشرين يوماً ولا يتخلف عنها عاهة مستديمة، فيما تعرف الجروح الخطيرة على انها الجروح التي تشفى بمدة تزيد عن عشرين يوماً وتترك عاهة مستديمة مثل البتر، وتعرف الجروح المميتة على انها الجروح التي تؤدي الى الموت اما بصورة مباشرة عند الاصابة او بعد فترة وجيزة جراء المضاعفات المترتبة على تلك الإصابة (Conner, 1999).

1-3-2 تصنيف الجروح في الوجهة الطبية العدلية **Wound Classification** according to Forensic Medicine

1-1-3-2 الجروح غير الحادة **Blunt injury**

الجروح غير الحادة هي تلك الجروح التي تحدث عموماً بسبب أشياء ليس لها حواف حادة أو قاطعة، ومن الأمثلة على الأشياء التي تسبب إصابات غير حادة ، قبضات اليدين والقدمين ومضرب البيسبول والهاوة والمطارق والقضبان المعدنية والزجاجات البلاستيكية للمشروبات. كما يمكن ان تنتج الاصابات غير الحادة للفرد نتيجة سقوط او ضرب شيئاً ما، (على سبيل المثال ، جدار أو الرصيف)، مما يتسبب في إصابة شديدة التأثير (Majdan et al., 2015). ويمكن أن تتسبب الضربة أو القوة غير الحادة في مجموعة من الأعراض (التي يشكو منها الفرد) أو علامات عيانية، اعتماداً على عدد من العوامل بما في ذلك القوة والموقع وسطح التأثير، التي تتراوح من عدم وجود دليل مرئي على الإصابة، أو الألم في موقع الصدمات، و تتميز المنطقة المصابة نتيجة قوة غير حادة إلى أشكال او علامات، ومنها

احمرار، تورم، كدمات، سحجات (جروح) ، تمزقات، وكسور في العظام. و قد تكون هذه العلامات بمفردها أو معاً في موقع الإصابة (Peel et al., 2003).

1-1-1-3-2 الكدمات Bruise

تنتج الكدمة عموماً عن استخدام قوة غير حادة على سطح الجلد تؤدي إلى تمزق الشعيرات الدموية، (وربما الأوعية الدموية الأكبر حجماً اعتماداً على القوة المطبقة) دون حدوث تمزق في الجلد تاركة احمراراً أو ازرقاقاً في الجلد، وعندما تتشكل الكدمة يتسرب الدم تحت الجلد من الشعيرات الدموية المتضررة إلى الجلد المغطى غير المنكسر و يعتمد حجم الكدمة وعمقها على العديد من العوامل التي تشمل: (أ) قوة التأثير، (ب) حجم الأوعية الدموية المتمزقة، (ج) الأوعية الدموية وكثافة النسيج الضام للنسيج المصاب، و (د) متانة الأوعية الدموية المعنية، مثل المنطقة المحيطة بمحجر العين إذ تكون الأوعية الدموية في هذه المنطقة ضعيفة نسبياً مما قد يجعلها عرضة للكدمات إذا ما تعرضت لقوة غير حادة (Richardson 1994).

2-1-1-3-2 السحجات Abrasion's

هذا النوع من الإصابات يؤثر فقط في الطبقة السطحية من الجلد أو الأغشية المخاطية، من دون فقدان أو تدمير للنسيج المصاب، مع نزيف طفيف، ولكنه عادة ما يكون مؤلماً للغاية ولا يمثل خطراً كبيراً على الضحية بشكل عام، وتحدث هذه الآفات بسبب أداة حادة أو غير حادة (Dreifke et al., 2015).

3-1-1-3-2 التمزق Laceration

وهي جروح غير منتظمة ناتجة عن الإصابة بجسم حاد أو الإصابة من جسم غير حاد، و قد تحدث هذه في أي مكان من الجسم، في معظم الحالات، قد تمتد التمزقات الشديدة عبر طبقات الجلد الكاملة وصولاً إلى الأنسجة تحت الجلد، بما في ذلك العضلات الأساسية أو الأعضاء الداخلية أو العظام، وغالباً ما يصاحب التمزقات الشديدة نزيف وألم شديدين (Bergfeld et al., 2014).

2-1-3-2 Sharp Injury الجروح الحادة

إصابات القوة الحادة هي الإصابات الناجمة عن قوة ميكانيكية باستخدام أدوات حادة على الجلد، وتُصنف إصابات القوة الحادة بشكل أساسي على أنها طعنات، وجروح محفورة، جروح قطعية، وجروح جراحية وهي أقل حدوثاً من إصابات القوة غير الحادة في الحيوانات، ويعد تحليل حواف الجرح أمراً بالغ الأهمية، ولاسيما إذا كان هناك أكثر من نوع واحد من الآفات، وقد يكون من الصعب التفريق بين الإصابة الحادة و الإصابة غير الحادة ، لأن التمزقات يمكن أن تشبه الجروح المحفورة، وقد يشير التوثيق الدقيق وفحص هذه الإصابات إلى الأداة المستخدمة، والعلاقة بين الضحية والجاني، وقوة الجاني. وقد تتضمن المواقف التي يحدث فيها هذا النوع من الصدمات الحوادث والصيد. وتشمل أسباب الوفاة المرتبطة بهذا النوع من الصدمات النزيف الحاد و نقص حجم الدم Hypovolemic Shock، استرواح الصدر Pneumothorax، أو الاختناق بسبب استنشاق الدم (Asphyxiation de Siqueira) (et al., 2016).

1-2-1-3-2 Stab wounds جروح الطعنة

هو شكل من أشكال الصدمات الحادة التي تنتج عن حركة دفع يكون طول الجرح على سطح الجسم أقل من عمق اختراقها في الجسم. تحدث نتيجة الإصابة بجسم ضيق مدبب بشكل حاد، و تتركز قوة التأثير عند طرف الجسم، وكلما كانت الحافة أكثر حدة زادت سهولة اختراقها للجلد، ويمكن أن تكون جروح الطعنات قاتلة أو عرضية، ويُعدّ النزيف الداخلي والخارجي مصدر قلق عند علاج ضحايا الطعن، وتشكل السكاكين غالبية الأسلحة المستخدمة في عمليات الطعن. ومع ذلك، يمكن أن يكون أي جسم مدبب سلاحاً مثل (قلم رصاص، مفك براغي، شوكة شواء، مقص، خراطة، إلخ) (Riviello and Rozzi, 2018).

2-1-2-3-2 Incised wounds الجروح القطعية

وهي جروح ناتجة من سحب أداة مدببة وحادة الحواف على طول سطح الجلد بضغط كافٍ، مما ينتج عنه جرحاً يكون طوله على الجلد أكبر من عمقه في الأنسجة الأساسية، يمكن أن تكون الجروح القطعية خطية أو منحنية أو مائلة ولها حواف محددة بشكل حاد نسبياً (Fukube et al., 2008). والجروح القطعية ذات المنشأ العرضي والتي تؤدي إلى الوفاة نادرة الحدوث، وتحدث عندما يسقط الفرد على مواد زجاجية أو يصطدم بشظية زجاجية

متطايرة أو بعض المقذوفات الأخرى ذات الحواف الحادة في الرقبة أو الجذع أو الرأس حيث يوجد وعاء دموي كبير بما يكفي لإحداث نزيف قاتل سريع (Prahlow et al., 2001).

3-2-1-3-2 الجروح الجذبية Chop wound

هي جروح ناتجة عن أداة ثقيلة ذات حافة حادة واحدة على الأقل يتم استخدامها بقوة هائلة، ومن الأمثلة على ذلك المنجل والفأس وسكين الأدغال ومروحة القارب وشفرة جزارة العشب والعديد من الآلات الصناعية والزراعية (Li, 2012).

4-2 التئام الجروح Wound Healing

يُعدّ التئام الجروح عملية حيوية طبيعية ومعقدة في النسيج المتضرر، تتضمن هذه العملية مجموعة من العمليات المتميزة و المترابطة في كثير من الأحيان، و تشمل التخرثر Coagulation، الالتهاب Inflammation، طور الانقسام وانتشار الخلايا Proliferation، والهجرة Migration والانتشار وإعادة تشكيل المصفوفة الخلوية الإضافية Remodelling، يبدأ التئام الجروح أولاً بالإرقاء Hemostasis، يليها طور الالتهابي Inflammatory stage، وطور التكاثر Proliferative Phase يؤدي إلى إعادة تكوين النسيج الظهاري، و طور إعادة البناء والتشكيل Remodelling phase، التي تنضج خلاله الندبة (Rodrigues et al., 2019). بعد حدوث الجرح، يجب استعادة سلامة الجلد على الفور من أجل الحفاظ على وظائفه، في هذه العملية، تشارك الخلايا وحيدة النواة Mononuclear Cells، في الدم المحيطي، وخلايا الجلد الدائمة Resident Skin Cells، والنسيج الخلوي Extracellular Matrix، والسابتوكينات Cytokines، والكيموكينات Chemokine، وعوامل النمو Growth Factors، والجزيئات التنظيمية في عملية التئام الجروح، وتشمل المرحلة الالتهابية عملية الإرقاء التي تعمل على اصلاح الضرر الحاصل للأوعية الدموية نتيجة الجروح، ومن ثم حدوث العملية الالتهابية وما يصاحبها من ارتشاح للخلايا الالتهابية، تبدأ هذه الأحداث المبكرة في الثواني الأولى بعد الإصابة وتستمر لمدة ساعة تقريباً، يتبعه ارتشاح سريع للعدلات Neutrophils في الأنسجة المصابة خلال الأربعة وعشرين ساعة الأولى وتراجعها الخلفي خلال الأسبوع التالي، ويبدأ التسلسل التدريجي للخلايا وحيدة النواة والخلايا البلعمية Monocytes-Macrophages إلى الجرح في اليوم الثاني بعد الإصابة ويستمر في الزيادة،

ليصل إلى أقصى حد له خلال طور التكاثر، ويبدأ في الانخفاض خلال الأسبوعين التاليين، لتصبح الخلية وحيدة النواة المهيمنة في عملية إصلاح الأنسجة، تهاجر الخلايا اللمفاوية إلى الجلد في وقت مبكر بعد الإصابة لتصل إلى أقصى حد بحلول اليوم الرابع ويستمر وجودها لمدة أسبوعين آخرين قبل أن تتراجع، تبدأ المرحلة الأخيرة في الأسبوع الثاني بعد الإصابة وتشمل إعادة تشكيل الأنسجة التي تكونت سابقاً في مرحلة التكاثر وتنظيم الندبة من أجل استعادة سلامة الجلد. ويمكن لهذه المرحلة الأخيرة أن تستمر لأشهر (Cañedo-Dorantes and Cañedo-Ayala, 2019).

5-2 تحديد عمر الجروح وحيويتها **Determination of Wound Age and**

Vitality

تعد عملية تحديد عمر الجروح وحيويتها من المسائل المهمة في الطب العدلي، إذ يمكن من خلال هذه العملية الإسهام في إعادة مسرح الجريمة والوصول إلى الجاني (Casse et al., 2016). فمن المهام الأساسية لأطباء الطب العدلي الكشف عن الجروح وتحديد ما إذا كانت الإصابة قاتلة أم لا، أو هل قد حدثت قبل الموت أو بعده، فضلاً عن تحديد المدة الزمنية المنقضية على حدوث هذه الإصابة، كذلك تحديد المدة الزمنية من حدوث الإصابة حتى الموت في حالة الجروح المميتة (Mao et al., 2011). بعد حدوث الجرح تحدث استجابة للنسيج متمثلة بسلسلة من التفاعلات الحيوية في موقع الإصابة مثل النزف Hemorrhage، ارتشاح الخلايا الالتهابية Inflammatory Cell Infiltration من الأوعية الدموية، بالإضافة إلى تكون النسيج الحبيبي Formation of Granulation Tissue. وتعدّ هذه التفاعلات استجابة حيوية من النسيج للحفاظ أو إعادة الشكل والوظيفة الطبيعية للنسيج المصاب، وتحدث الاستجابة الحيوية هذه في الجروح المحدثة قبل الموت ويمكن تمييزها عن الجروح المحدثة بعد الموت، وقد اعتمد علماء الطب العدلي على هذه الخصائص في تحديد عمر الجروح وحيويتها (Oehmichen, 2004). ويمكن الاعتماد على عملية التئام الجروح في تحديد عمر الجروح وحيويتها، وذلك من خلال تحليل العديد من العوامل الحيوية والتنظيمية مثل الساييتوكينات Cytokines، الكيموكينات Chemokine's، بالإضافة إلى عوامل النمو Growth factors، حيث تؤدي هذه المواد دوراً مهماً ورئيساً في عملية التئام الجروح من خلال تأثيرها في مسار العملية حيث تعمل على تحفيز العديد من الخلايا مثل

الجذب الكيميائي للخلايا الالتهابية وتحفيز خلايا بطانة الوعاء الدموي على التكاثر، كذلك اعتمد علماء الطب العدلي على الخلايا المرتشحة وأنواعها خلال فترة التئام الجروح وتعد هذه العوامل مؤشرات مهمة في تحديد حيوية الجروح (Kondo *et al.*, 2010). ومن خلال الاعتماد على هذه المؤشرات المهمة التي تتواجد أثناء عملية التئام الجروح أصبح من الممكن تحديد حيوية الجروح وعمرها وذلك باستخدام العديد من التقنيات مثل التقنيات الحيوية Biological والخلية Cytological والجزيئية Molecular (Cecchi, 2010). ويشير الى هذه الاستجابات مجتمعة بـ (الحيوية، Vitality) التي تتعلق بما اذا كان الجرح قد حدث قبل الموت او الفترة الزمنية المنقضية من لحظة الإصابة حتى موت الضحية، وتستخدم حيوية الجروح لتمييز جروح قبل الموت عن الجروح التي تحدث بعد الموت التي تفتقر الى الاستجابة الحيوية في الجسم (Oehmichen, 2004).

6-2 طرق تقدير عمر الجروح *Methods for wound-age estimation*

1-6-2 التحليل الشكلي *Morphological analysis*

التحليل الشكلي له تاريخ طويل في كونه الطريقة الأكثر استخداماً بسبب طبيعته العيانية أو طبيعته الحدسية والموضوعية والقدرة على تقييم توطين العلامة. فلطالما كانت الملاحظة العيانية (تغيرات اللون) للكدمات أداة استقصائية لتحديد عمر الكدمة (Langlois, 2007). ويوفر الكثير من المعلومات المفيدة حول تحديد عمر الجرح ولا تزال الحاجة إليه قائمة حتى يومنا هذا، وقد أجريت محاولات لتحديد عمر الكدمات بناءً على لونها العياني من خلال الفحص العياني، ولكن ثبت أن هذه الطريقة متغيرة جداً بحيث لا تكون ذات فائدة عملية لأن وقت ظهور الكدمة ولونها يتأثران بالعمق والموقع وبشرة الجلد، من بين عوامل أخرى (Schwartz and Ricci, 1996).

2-6-2 الطرق الكيميائية الحيوية Biochemical methods

تم تكييف الطرائق الكيميائية الحيوية لتقييم مستويات تركيز الأمينات النشطة في الأوعية Vasoactive amines في أثناء التئام الجروح، وتعود الدراسات المبكرة على الهستامين والسيروتونين إلى مدرسة بيرج (Berg, 1972). في وقت لاحق تمت دراسة الهستامين بطرق أكثر تعقيداً مثل قياس التآلق الدقيق (Maeno *et al.*, 1990) microfluorimetry والقياس الطيفي spectrophotometry ، وقياس التآلق الطيفي spectrofluorimetry (Fernández *et al.*, 1994). كما استُخدم مطياف الامتصاص الذري Atomic absorption spectrometry في فحص الأيونات مثل الحديد والزنك والمغنيسيوم والصوديوم والبوتاسيوم والنحاس مما يدل على فائدة الحديد كعامل للحوية ونسبة الصوديوم الى البوتاسيوم K / Na (Yu-Chuan *et al.*, 1995).

3-6-2 الكشف عن الحمض النووي الريبوزي المجهرى باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل**MicroRNAs (miRNAs)**

الاحماض النووية الرايبوزية الدقيقة هي فئة من الحمض النووي الريبوي غير المشفر تحتوي على 18-24 قاعد نيتروجينية، وتشارك في تنظيم العديد من الآليات الكيميائية الحيوية في جسم الإنسان، ويزداد مستوى الحمض النووي الريبوزي الدقيق في سائل الجسم وأنسجته بسبب تغير الآليات الوظيفية المرضية، وبالتالي يتم استخدامها كمؤشرات حيوية لمختلف الأمراض والظروف، وتم تقييم الجزيئات المتعلقة بالشفاء لتحديد حيوية الجرح من قبل (Rocchi *et al.*, 2020). بالإضافة إلى ذلك تمت دراسة الاحماض النووية الرايبوزية الدقيقة كمؤشرات حيوية محتملة للجروح، لأن التقارير المنشورة سابقاً أظهرت دوراً رئيساً للحمض النووي الريبوزي الدقيق في تنظيم عملية التئام الجروح (Mori *et al.*, 2018).

4-6-2 تفاعل البلمرة المتسلسل في الوقت الحقيقي (Real-time Polymerase Chain**Reaction)**

تستعمل هذه التقنية بشكل واسع في الطب العدلي في الوقت الحالي (Lindquist *et al.*, 2011). في هذه الطريقة يتم تقييم مستويات mRNA من السائتوكينات الالتهابية وعوامل التئام الجروح باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل في الوقت الحقيقي (PCR) لتقييم عمر الجرح، نظراً لأن تفاعل البلمرة المتسلسل في الوقت الحقيقي (qPCR) تُعدّ طريقة حساسة

للغاية لاكتشاف حتى التغييرات الطفيفة في التعبير الجيني بين العينات ، فمن الضروري توحي الحذر في كل خطوة بما في ذلك تحليل البيانات، كما تم استعمال هذه التقنية من قبل أطباء الطب العدلي في عملية تقدير عمر الجروح وحيويتها، وذلك من خلال تقييم مستويات التعبير الجيني في الأنسجة المجروحة (Sun et al., 2012).

5-6-2 لطفة ويسترن و مقايسة الممتز المناعي المرتبط بالإنزيم (Western blotting and Enzyme-Linked Immunosorbent Assays)

يمكن أيضاً تقييم حيوية الجرح ومستويات البروتين باستخدام لطفة ويسترن ومقايسة الممتز المناعي المرتبط بالإنزيم، التي تُعدّ أكثر حساسية من الكيمياء النسجية المناعية Immunohistochemistry. علاوة على ذلك بخلاف علم الجينات Genomics وعلم النسخ Transcriptomics, يمكن أن توفر البروتينات نظرة ثاقبة لأحداث نقل الإشارة التي تؤثر بشكل مباشر في العمليات الكيميائية الحيوية في الجروح مقارنة بالاختبارات الأخرى، ومع ذلك يعوقها تعقيد الإجراءات وصعوبة التحكم في الظروف، وتعتبر المصفوفة الدقيقة للبروتين (Protein microarray) هي طريقة حساسة عالية الدقة تتيح التحليل المتزامن لتحليلات البروتين المتعددة في عينة واحدة (Gupta et al., 2016).

6-6-2 التغيرات المرضية النسجية Histopathological Changes

التغيرات النسجية المرضية تميز المراحل المختلفة لالتئام الجروح ويمكن تطبيقها لتحديد عمر الجرح ومع ذلك، فإن التغيرات الحاصلة في الجروح تعتمد بشكل خاص على مدى الإصابة، ترتشح العدلات في البداية في موقع الإصابة ، تليها الخلايا البلعمية، وفقاً لفترة ما بعد الإصابة، وبشكل عام فالعديد من التفاعلات الحيوية لها أهمية في عملية التئام الجروح، فضلاً عن وجود تغيرات نسجية عديدة يمكن ملاحظتها في الجروح حسب مرحلة الالتئام وتشمل التغيرات التنكسية في الخلايا المصابة (مثل خلايا العضلات)، تأثر الدورة الدموية والأوعية الدموية، واستجابة الأنسجة الغير مصابة، وجود نخر أو تنكس لخلايا النسيج ، وظهور كريات الدم البيض متعددة الأشكال، والتغيرات في حجم النوى، الانقسام في بعض أنواع الخلايا و ظهور المواد السكرية المخاطية المتعددة Mucopolysaccharides، والكولاجين والألياف المرنة المتكونة حديثاً (Dettmeyer., 2018).

7-6-2 تقنية الكيمياء النسجية المناعية Immunohistochemistry

تعد الكيمياء النسجية المناعية الطريقة المفضلة في علم الأمراض العدلي بسبب دقتها و سهولة تطبيقها في الأنسجة المظمورة بالبارافين. بخلاف معظم التقنيات تسمح هذه التقنية بتحديد موقع المادة محل الاهتمام داخل الأنسجة أو اللبنة الأساسية للخلية. وبشكل عام فخلال الدقائق القليلة الأولى بعد حدوث الجرح، لا يمكن للفحوصات المجهرية التحقق مما إذا كان الجرح قد أصيب قبل الموت أو بعده، فيما تتغير مستويات mRNA من السايوتوكينات والإنزيمات والتشكيل النسيجي في وقت قريب بعد الإصابة (Ma et al., 2011). ومع تقنية الكيمياء النسجية المناعية، أصبح من الممكن تحديد المدة الزمنية وتكاثر الخلايا في التئام الجروح بدقة أكثر من التقنيات الأخرى. فضلاً عن تحديد أنواع الخلايا المختلفة في سياق التفاعل الالتهابي (Betz, 1995). كما أتاحت هذه التقنية دراسة الوسيطات الكيميائية التي يتم إفرازها مبكراً أو إنتاجها، والتغيرات التي تحدث لمكونات النسيج الخلالي في أثناء التئام الجروح (أنواع بروتين الكولاجين الأول، والثالث، والخامس، والسادس Protein Collagen Types I, III, V and VI، اللامينين Laminin، بروتين كبريتات سلفات الهيبارين Heparansulphate، البروتين السكري Proteoglycan، الفيمنتين Vimentin، الديدزيمين Desmin) (Eisenmenger et al., 1988). ان المبدأ الأساسي لهذه التقنية هو التفاعل المناعي للمستضدات الموجودة في النسيج المراد الكشف عنها مع الاجسام المضادة المطبقة، وتستخدم هذه التقنية للكشف عن العديد من العلامات مثل السايوتوكينات، الكيموكينات، عوامل النمو و مستضدات التمايز في الخلايا المناعية (Neri M et al., 2018).

7-2 المؤشرات الحيوية لتحديد عمر الجرح Biomarkers of Wound Age

أجرى علماء الأمراض في الطب العدلي تجارب مكثفة للبحث عن العلامات الزمنية لتقدير عمر الجرح (Bacci et al., 2014). والاعتماد على المواد والإشارات التي تتحرر خلال عملية الالتئام مثل السايوتوكينات (Takamiya et al., 2008)، الكيموكينات، عوامل النمو و البروتيناز (Kubo et al., 2014)، و جزيئات النسيج الخلالي أيضاً توفر تجارب قيمة لتقدير عمر الجرح (Fronczek et al., 2015). وتؤدي الوسيطات الالتهابية Inflammatory Mediators مثل (السايوتوكينات والكيموكينات) وعلامات الخلايا الالتهابية Inflammatory cell markers المتمثلة بمستضدات التمايز Cluster of

Differentiation Antigen دوراً مهماً في تنظيم عملية التئام الجروح حيث يمكن الاعتماد عليها كمؤشرات مهمة لعملية تقدير عمر الجروح وحيويتها (Fronczek *et al.*, 2015). حيث تم استخدام الاختبارات الكيميائية المناعية لتقييم التعبيرات الجينية لكل من CD68 و α -Smooth Muscle Actin (α -SMA) و Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) في جروح جلد الفئران في مختلف الأعمار ، ومناقشة التوافر العملي للجينات المذكورة أعلاه على أنها علامات لتحديد عمر الجروح (Khalaf *et al.*, 2019). كما ان سي دي CD15 يُسهم في التصاق الكريات الدم البيض من خلال التفاعل مع المحددات السطحية البطانية حيث يمكن استخدام CD15 كمؤشر مهم لخلايا الدم البيض والاعتماد عليه لتقدير عمر الجروح وحيويتها (Lo *et al.*, 1997). ان تحديد حيوية الجروح قد يعتمد على التغيرات المرضية النسجية الحاصلة في النسيج المتضرر، ولكن تفتقر هذه الطريقة الى الحساسية والدقة في حالة الجروح قصيرة العمر، لذلك هناك حاجة ماسة إلى مؤشرات حيوية جديدة وموثوقة. تم تقييم قدرة 10 سايبتوكينات مرشحة ($\text{IL-1}\beta$ و $\text{IFN-}\gamma$ و IL-2 و IL-4 و IL-6 و IL-8 و IL-10 و IL-12p70 و IL-13 و $\text{TNF-}\alpha$) للتمييز بين الجروح الحيوية والجروح المبكرة بعد الوفاة. (Peyron *et al.*, 2021).

1-7-2 الوسائط الالتهابية Inflammatory Mediators

تعدّ السايبتوكينات من الوسائط الالتهابية و هي مواد كيميائية لها دور مهم و نشط في مسارات الاتصال بين الخلايا، تشارك هذه البروتينات المنظمة في المرحلة الالتهابية وعملية إصلاح الجروح عن طريق جذب كريات الدم البيض، وبهذه الطريقة يتم تحفيز ارتشاح خلايا الدم البيض من خلال الخصائص الكيميائية الجاذبة لهذه المواد، مثل الانترلوكين الثامن Interleukin-8 و الليكوترين B4 B4 leukotriene، يتم انتاج وافراز هذه المواد ذات الفعالية القصيرة مبكراً بعد حدوث الضرر او الجرح في النسيج (Gougerot- Pocidallo , 2002). وتؤدي السايبتوكينات دوراً مهماً في عملية التئام الجروح ، ولاسيما أن الأنترلوكين 6 (IL-6) وعامل نخر الورم الفا ($\text{TNF-}\alpha$) يؤديان دوراً مهماً في تعزيز التفاعلات الالتهابية التي تُسهم بشكل رئيس في تكوين النسيج الحبيبي و تكوين الأوعية الدموية (O'Neill and Bowie, 2001). ومن الممكن استخدام هذه المواد الحيوية التي تفرز في الجروح الجلدية لتحديد عمر الجرح ، كذلك تُستخدم العديد من السايبتوكينات في

تقنية الكيمياء النسيجية المناعية لتحديد عمر الجرح بشكل أكثر دقة، بالإضافة إلى الخصائص النسيجية التقليدية للجرح. (Kondo *et al.*, 2002).

1-1-7-2 الأنترلوكين 6 (Interleukin-6)

هو عضو في عائلة الساييتوكينات المؤدية للالتهابات، ويعمل على تحفيز مجموعة متنوعة من البروتينات المسؤولة عن الالتهاب الحاد ، فضلاً عن دوره المهم في التحفيز على تكاثر الخلايا وتمايزها (Uciechowski and Dempke., 2020). ويعدّ IL-6 ساييتوكين متعدد الاتجاهات ويمكن أن يؤثر في العديد من العمليات المناعية والوظيفية، أولها: توليد بروتين المرحلة الحادة للالتهاب (على سبيل المثال ، البروتين التفاعلي C-Reactive Protein ، الهيبيسيدين Hecpidin، إلخ)، ثانيها: الالتهاب Inflammation و الاستجابات المناعية النوعية للمستضد Antigen-specific Immune Responses، ثالثها: تكوّن الدم Hematopoiesis، رابعها: موت الخلايا المبرمج Apoptosis و خامسها: التمايز والتمثيل الغذائي الخلوي (Differentiation, and Cellular Metabolism Hunter and Jones., 2015). تم تحديد الأنترلوكين-6 عام 1986 كعامل تحفيز للخلية البائية B Cell الذي يعزز تمايز الخلايا اللمفية البائية B Lymphocyte إلى الخلايا المنتجة للأجسام المضادة (Scheller *et al.*, 2011). وتعدّ الخلايا وحيدة النواة والخلايا البلعمية المنتجين الرئيسيين لـ IL-6، فضلاً عن الخلايا التائية والخلايا البائية والخلايا الكبدية والخلايا البطانية والأرومات الليفية والخلايا الكيراتينية و خلايا ميسانجيل Mesenchymal Cell والخلايا الدهنية، والعديد من الخلايا السرطانية يمكن أن تولد الأنترلوكين 6 بشكل أساس أو بعد التحفيز (Chalaris *et al.*, 2011). يفرز IL-6 مبكراً استجابة للجروح، ويحث على إطلاق السيتوكينات المنشطة للالتهابات من الخلايا البلعمية المقيمة في الأنسجة، والخلايا الكيراتينية، والخلايا البطانية، والخلايا اللحمية، يقوم الأنترلوكين-6 أيضاً على جذب الكيمائي للكريات البيض في الجرح (Wright *et al.*, 2014). مع تقدم الالتهاب تكون إشارات IL-6 مسؤولة عن تحويل مسار عملية الالتئام من الالتهاب إلى بيئة تعويضية، ويعدّ تنظيم التئام الجروح أمراً بالغ الأهمية إذ يمكن أن تؤدي الإشارات الالتهابية غير الملائمة إلى جروح تستغرق وقتاً أطول للشفاء وتكون معرضة لخطر العدوى (Nishikai-Yan *et al.*, 2017). تم استخدام IL-6 كمؤشر حيوي لتحديد عمر الجروح في الطب العدلي من قبل

(Wang *et al.*, 2015) لما يمتلك من وظائف مهمة في تنظيم المرحلة الالتهابية في عملية التئام الجروح.

2-1-7-2 عامل نخر الورم ألفا (Tumor Necrosis Factor α)

هو سايتوكين متعدد الوظائف يعمل عامل نخر الورم على إحداث الالتهاب والسيطرة عليه وحماية الأنسجة من العدوى، ومن ناحية أخرى يشارك عامل نخر الورم في الحفاظ على تنظيم المناعة والحفاظ على بنية الأعضاء اللمفاوية الثانوية، ونظرًا لأن عامل نخر الورم يعمل كمحفز رئيس للعديد من العمليات الالتهابية، فقد أصبح من الواضح منذ فترة طويلة نسبيًا أن عامل نخر الورم هو أحد العوامل الرئيسية المشاركة في التسبب في العديد من الاضطرابات الالتهابية الذاتية والمناعة الذاتية، مثل التهاب المفاصل الرثوي Rheumatoid Arthritis والصدفية Psoriasis ومرض كرون Crohn's disease (Feldmann., 2002). ويتم إنتاج عامل نخر الورم ألفا بشكل طبيعي عن طريق الخلايا البلعمية والخلايا وحيدة النواة المنشطة وله تأثيرات متعددة التوجه في الخلايا الطبيعية والخبيثة (Hieber and Heim., 1994). ويؤدي عامل نخر الورم ألفا دورًا حيويًا في العديد من الحالات الوظيفية والمرضية، حيث يعتبر عامل نخر الورم ضروريًا لتنظيم التطور الجنيني، ولا يعزز عامل نخر الورم ألفا إنتاج السايتوكينات الالتهابية فحسب، بل يعزز أيضًا التصاق ونفاذية الخلايا البطانية ويعزز فعالية الخلايا المناعية مثل العدلات والخلايا وحيدة النواة والخلايا الليمفاوية في مواقع الالتهاب (Pasparakis *et al.*, 1996). يتم إفراز عامل نخر الورم ألفا بشكل رئيس بواسطة الخلايا البلعمية استجابة للمحفزات لتحفيز الالتهاب الجهازى. ويؤدي ارتباط عامل نخر الورم ألفا بمستقبل (TNFR1) إلى بدء سلسلة الإشارات المؤيدة للالتهاب و يتم تحفيز مسارات الإشارات المسببة للالتهابات عن طريق تنشيط العامل النووي المعزز لسلسلة كابا الخفيفة في الخلايا البائية النشطة Nuclear Factor Kappa B أو كيناز البروتين Protein Kinas المنشط بالميتوجين Mutagen (Wajant, 2009). وتساعد هذه الإجراءات لعامل النخر ألفا في التفاعلات الالتهابية المنتظمة الحادة والمزمنة في ظل ظروف العدوى أو المناعة الذاتية. بالإضافة إلى ذلك يتسبب TNF α أيضًا في موت الخلايا المبرمج في ظل ظروف معينة، علاوة على ذلك يمكن أن تؤدي المستويات العالية من TNF α أيضًا إلى الهزال Cachexia وصدمة إنتانية ناتجة عن الذيفان الداخلي Septic shock (Kothari *et al.*, 2013). كما يعدّ عامل نخر الورم ألفا بروتين غشائي

Transmembrane protein من النوع الثاني موجود بشكل مرتبط بالغشاء (mTNF α) بوزن جزيئي نسبي 26 كيلو دالتون بشكل أساسي. يمكن معالجة mTNF α إلى 17 كيلو دالتون قابل للذوبان Soluble protein (sTNF α) من خلال عمل إنزيم الماتركس ميتالوبروتيناز Matrix Metalloproteinase المعروفة باسم إنزيم تحويل عامل نخر الورم ألفا (Moss *et al.*, 1997). فضلاً عن أنه mTNF α يمتلك القدرة على معالجة الإشارات الخارجية كمستقبل. فيما يدور sTNF α في جميع أنحاء الجسم بعيداً عن موقع تركيبه ويمنح عامل نخر الورم وظيفة الغدد الصماء القوية. تنشط كل من sTNF α و mTNF α كمتجانسات غير مرتبطة تساهمياً بينما يعمل متعدد السكريات الدهنية الجرثومية Lipopolysaccharide كمحفز رئيس لجهاز المناعة الفطري غير المتخصص، والمستضدات الجرثومية، والسموم المعوية، والساييتوكينات بما في ذلك TNF α نفسها قادرة أيضاً على تحفيز إنتاج عامل نخر الورم ألفا، و يحفز عامل نخر الورم ألفا أيضاً توليد العديد من الساييتوكينات المؤيدة للالتهابات بما في ذلك IL-6 و IL-8 و TNF α نفسها والجزيئات اللاصقة والكيموكينات (Bonizzi & Karin., 2004). ويعد عامل نخر الورم ألفا من العوامل المهمة في عملية التئام الجروح، حيث يعد أحد الوسيطات الكيميائية المهمة في تنظيم المرحلة الالتهابية في عملية التئام الجروح، كما يمكن الاعتماد عليه كمؤشر حيوي في تحديد عمر الجروح في الطب العدلي (Elzahed *et al.*., 2020).

2-7-2 علامات الخلايا الالتهابية Inflammatory cell markers

تعدّ مجموعة التمايز (Cluster of Differentiation (CD) علامات للخلايا الالتهابية وهي عبارة عن جزيئات سطحية يعبر عنها من خلال الخلايا المناعية مثل العدلات والخلايا البلعمية و الخلايا وحيدة النواة، وتعمل هذه الجزيئات كمستقبلات او روابط مهمة في وظائف الخلايا المناعية كما تعمل العديد من هذه الجزيئات على إرسال الاشارات الخلوية، فضلاً عن دورها المهم في التصاق الخلايا المناعية، ويوجد ما يقارب 250 بروتيناً من هذه الجزيئات قُسمت وفق الوظيفة ونوع الخلايا المعبرة عنها (Brahme.,2014). تم استخدام مجموعة من مجاميع التمايز في تحديد عمر الجروح وحيويتها، حيث استخدم CD68 من قبل الباحثين (Khalaf *et al.*.,2019). كما تم استخدام CD15 كمؤشر لخلايا الدم البيض المرتشحة في تحديد حيوية جروح الطعنة من قبل (Betz *et al.*., 1992).

Cluster of differentiation15 (CD15) 15 سي دي 1-2-7-2

سي دي 15 هو مجموعة من مستضد التمايز وهو جزء مهم من الناحية المناعية. ويعدّ سي دي 15 جزء التصاق من الكربوهيدرات الذي يمكن التعبير عنه في البروتينات السكرية والشحوم السكرية، و يساعد سي دي 15 في عملية البلعمة والتحول الكيميائي الموجودين في العدلات، ويُعبّر عنه في المرضى الذين يعانون من مرض هودجكين Hodgkin Disease ، وبعض أنواع سرطان الدم اللمفاوي المزمن للخلايا البائية، وسرطان الدم اللمفاوي الحاد وسرطان الدم اللمفاوي غير الحاد، ويسمى أيضاً Lewis x و SSEA-1 المستضد الجنيني الخاص بالمرحلة 1، ويمثل علامة للخلايا الجذعية متعدّدة القدرات في الفئران، حيث يؤدي دوراً مهماً في التصاق وهجرة الخلايا في الجنين قبل الغرس (Nakayama *et al.*, 2001). ويعدّ سي دي 15 مستضد تمايز مكون للدم يتم التعبير عنه في معظم الخلايا النخاعية المتميزة بما في ذلك الخلايا الحبيبية، والخلايا البدنية ، والخلايا وحيدة النواة، الخلايا البلعمية، وخلايا لانكرهانز، فيما لا يتم التعبير عنه في خلايا الدم الحمر والصفائح الدموية والخلايا اللمفاوية (Civin *et al.*, 1981). و يعتبر مشاركاً في وظائف العدلات، أي التفاعلات الخلوية، والاتصاق بالخلايا البطانية، والبلعمة، وتحفيز التحلل، والانفجار التنفسي Respiratory burst ، كما تم اقتراح دورها في تنشيط الخلايا وحيدة النواة (Warren *et al.*, 1996). كما أتمدّ سي دي 15 مؤشراً حيوياً مهماً في تحديد عمر جروح الطعنة من قبل (Gauchotte *et al.*, 2013). حيث يعد مؤشراً حساساً للخلايا الالتهابية وخاصة (العدلات) في المراحل المبكرة من طور الالتهابي في عملية التئام الجروح.

Cluster of Designation 68 (CD68) 68 سي دي 2-2-7-2

سي دي 68 وهو بروتين سكري داخل خلوي غشائي، ويدعى بأسماء أخرى مثل Macrosialin و KP1، وزنه الجزيئي 110 كيلو دالتون، وبسبب موقعه الداخل خلوي وبشكله السائد ضمن الحبيبات السيتوبلازمية كالأجسام الداخلية (Endosomes) و الاجسام الحالة (Lysosomes) ولخصائصه التركيبية عدّ عضواً من عائلة البروتينات الغشائية المقترنة بالأجسام الحالة Lysosomes Associated Membrane Proteins (LAMP) (Gottfried *et al.*, 2008). يتم التعبير عن سي دي 68 بشكل كبير في الخلايا البلعمية و الخلايا وحيدة النواة، تقليدياً يتم استخدام سي دي 68 كعلامة كيميائية خلوية قيّمة للخلايا

البلعمية المناعية في التحليل الكيميائي للأنسجة الملتهبة و الخلايا الورمية والتطبيقات المناعية الأخرى (Chistiakov *et al.*, 2017). ويشترك سي دي 68 في أوجه التشابه الهيكلي مع بروتينات الغشاء المرتبطة بالجسيمات الحالة (LAMPs) (Fukuda, 1991). ويستخدم CD68 بشكل روتيني كعلامة كيميائية نسية / كيميائية خلوية للالتهاب المرتبط بوجود الخلايا البلعمية (Ferenbach and Hughes, 2008). كما استُعمل سي دي 68 لتحديد خلايا سلالة البلاعم مثل منسجات الأنسجة، والخلايا العملاقة متعدّدة النوى، وخلايا كوفر، خلايا لانكرهانز، وخلايا العظم (Brooks *et al.*, 2009). كما استخدم سي دي 68 كعلامة قيّمة للخلايا البلعمية الموجودة في النسيج المجروح بغرض تحديد عمر الجروح وحيوتيتها من قبل الباحثون (Khalaf *et al.*, 2019).

الفصل الثالث

المواد و طرائق العمل

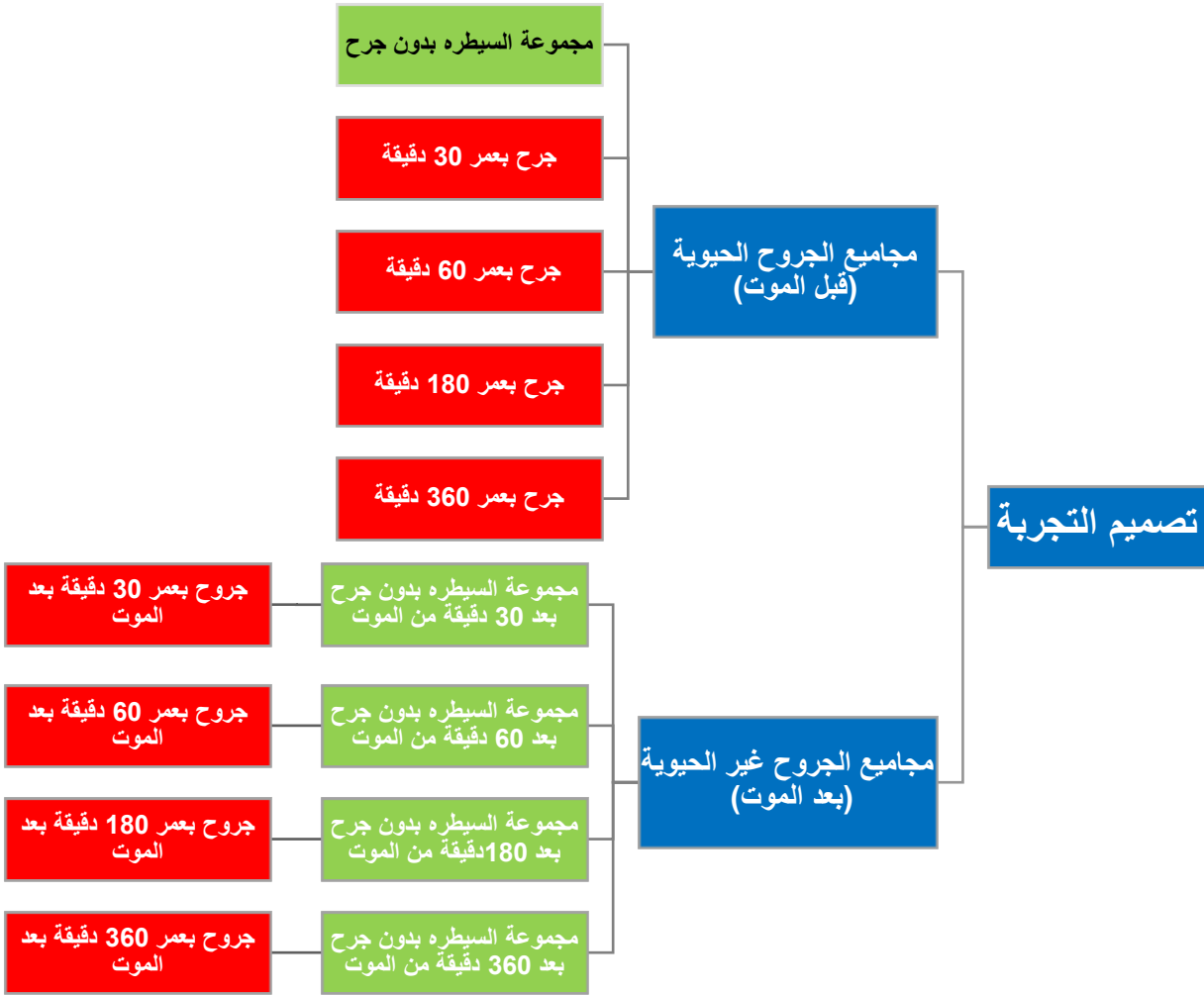
Materials & Methods

1-3 حيوانات التجربة

تم استخدام في هذا البحث إناث جرذان (ALBINO FEMAL RATS) خالية من مسببات الأمراض بأعمار تتراوح 8-10 أسبوع، و أوزان تتراوح (200-250 غرام) من بيت الحيوان / كلية الطب البيطري/ جامعة الموصل / العراق، تم إيواء جميع الجرذان في ظروف مختبرية مناسبة متمثلة بدورة ضوئية طبيعية (12 ساعة ظلام و 12 ساعة ضوء) ودرجة حرارة $20 \pm 18^{\circ}$ ، مع توفير العليقة وماء الشرب بشكل مستمر، قسّمت الجرذان بشكل عشوائي على شكل مجاميع كل مجموعة مكوّنة من ثلاث جرذان في أقفاص في ظل ظروف محددة خالية من مسببات الأمراض خلال التجارب. ووافقت جميع التجارب المطبقة على حيوانات التجربة كلية الطب البيطري جامعة الموصل وامثالها لرقم الموافقة (APPROVAL NO. UM.VET.2021.011).

2-3 تصميم التجربة

شملت الدراسة 39 جرذاً قسمت على مجاميع الجروح الحيوية، ومجاميع الجروح غير الحيوية بعد الموت ثلاث جرذان لكل مجموعة. أحدثت الجروح الحيوية بفترة زمنية محددة لكل مجموعة وشملت هذه الفترات 30 ، 60 ، 180 و 360 دقيقة بالإضافة إلى مجموعة السيطرة. فيما شملت مجاميع غير الحيوية إحداث جروح بأوقات مختلفة شملت: 30 ، 60 ، 180 و 360 دقيقة بعد الموت، بالإضافة إلى مجموعة السيطرة بدون جرح لكل مجموعة الشكل(1-3).



3-3 احداث الجروح وجمع العينات

1-3-3 تخدير حيوانات التجربة

تم تخدير الجرذان باستخدام الزايلازين وبجرعه 10ملغم/ كغم والكيثامين بجرعة 80 ملغم / كغم، تم حقن المادتين عن طريق الحقن في عضلة الفخذ باستخدام الحقن الخاصة بالأنسولين، وخذرت الحيوانات المحقونة بعد مرور ما يقارب 15 دقيقة من الحقن.

2-3-3 احداث الجرح

بعد تخدير الحيوان تم تحديد وتحضير منطقة الجرح من خلال إزالة الشعر الموجود في المنطقة باستخدام مقص الكتروني، وتعقيم المنطقة بالكحول 70%، وبعد الانتهاء من تهيئة المنطقة المحددة أحدث جرح خطي بطول 1.5 سم مخترقاً جميع طبقات الجلد في منطقة الظهر باستخدام مشرط جراحي معقم، الشكل (2-3).



الشكل (2-3) يوضح احداث جرح خطي في جلد جرذان مخدرة

وأحدث الجرح في مجاميع الجروح الحيوية قبل الموت على الحيوانات المخدرة، وبعد انقضاء الفترة الزمنية المحددة لكل مجموعة أخذت عينات الجلد من الجرذان و حسب الفترات الزمنية التالية: (30 ، 60 ، 180 ، 360 دقيقة) ، وفيما يخص مجاميع الجروح غير

الحيوية، قُتِلت الجرذان بعد إحداث الجرح مباشرة، وتم اخذ عينات الجلد المجروح بعد فترات زمنية مختلفة من الموت شملت: (30 ، 60 ، 180 ، 360 دقيقة).

3-3-3 جمع العينات

أُخِذت عينات الجلد كامل السماكة من الجرذان باستخدام مقص جراحي وملقط نسيجي معقم وفقاً لطريقة (Grellner, 2002)، وعلى النحو التالي:

1. تم جمع عينات الجلد السليم بدون جروح من مجاميع السيطرة بمساحة 2 سم X 2 سم من منطقة ظهر الجرذان
2. أُخِذت عينات الجلد المجروح من مجاميع الجروح الحيوية وغير الحيوية ايضاً بمساحة 2 سم X 2 سم. ووضعت عينات الجلد المجموعة في محلول الفورمالين الدارى المتعادل 10% لغرض تحضيرها للتقطيع النسيجي و تقنية الكيمياء النسجية المناعية.

3-4 التقطيع النسيجي للعينات

بعد وَضْع العينات في الفورمالين الدارى المتعادل لمدة 48 ساعة مُررت العينات في عدّة مراحل شملت مرحلة الإنكاز Dehydration، مرحلة الترويق Clearing، عملية إزالة الزايلول Impregnation و غمر العينات بالشمع و صبّها في القوالب المخصّصة لها (Luna, 1968).

1- **الإنكاز (DEHYDRATION)** : وُضِعَت العينات بتراكيز تصاعديّة من الكحول الأثيلي لغرض إزالة الماء من النسيج بالتراكيز الاتية (70% ، 80% ، 90% ، 100%) لمدة 60 دقيقة لكل تركيز.

2- **مرحلة الترويق (Clearing)** : بعد إزالة الماء بالكحول وُضِعَت العينات في محلول الزايلول تمريرتين لمدة 45 دقيقة لكل تمريرة، لغرض إزالة الكحول.

3- **عملية التشرب أو التخلل (Impregnation or Infiltration)** : وُضِعَت العينات في شمع البارافين المُذاب بدرجة حرارة 57⁰ و بعدة تمريرات، بُغِيَة إزالة الزايلول وترشيح

الشمع داخل العينات الذي يساعد على تصليد العينات ، وشملت هذه المرحلة ثلاث تمريرات 60 دقيقة لكل تمريرة في الشمع.

4- **طمر العينات وتحضير قالب الشمع (Embedding)** : وُضعت العينات داخل قالب مخصّص، وطُمرت بشمع البارافين المذاب، من ثمّ وُضع القالب بدرجة حرارة 18° وتركها لمدة من الوقت حتى تصلب الشمع.

5- **تقطيع العينة (Sectioning)** : قُطعت العينات باستخدام جهاز الميكروتوم، وذلك بتثبيت قالب الشمع على حامل العينة specimen holder واستخدام سكين حاد و قُطعت العينات بسلك 5 µm، ثمّ وُضعت شرائط العينات المقطوعة في حمام مائي بدرجة حرارة 37° من ثمّ وُضعت على الشرائح الزجاجية الخاصة

6- **صبغ النسيج بصبغة الهيماتوكسيلين Hematoxylin والأبوسين EOSIN (H&E)**: تمت عملية صبغ النسيج بصبغة الهيماتوكسيلين والأبوسين، وذلك بعدة مراحل (Luna, 1992) (Bancroft *et al.*, 1996) شملت:

- **الترويق (Clearing)** ، تضمنت هذه المرحلة إزالة شمع البارافين من النسيج باستخدام الزيول بثلاث تمريرات بواقع ثلاث دقائق لكل تمريرة.
- **ترطيب النسيج (REHYDRATION)** ، تمت هذه المرحلة من خلال تمرير النسيج في الكحول الأيثلي بتراكيز تنازلية (100% - 95% - 70%) حيث شملت دقيقة واحدة لكل تمريرة وذلك لإعادة ترطيب النسيج قبل الصبغ.
- **صبغة الهيماتوكسيلين (HEMATOXYLIN)** ، تضمنت هذه المرحلة وُضعت النسيج في صبغة الهيماتوكسيلين لمدة 5-10 دقائق.
- **محلول التزريق (BLUING REAGENT)** ، تشمل هذه المرحلة تحويل لون صبغة الهيماتوكسيلين الى اللون الأزرق باستخدام محلول الامونيا او الغسل بالماء .
- **تمييز صبغة الهيماتوكسيلين (HEMATOXYLIN DIFFERENTIATOR)** ، تشمل هذه المرحلة إزالة صبغة الهيماتوكسيلين من المناطق غير المرغوب بها، مثل الصبغة على الشريحة الزجاجية GLASS SLIDE وذلك باستخدام محاليل حامضية كحولية .

- صبغة الايوسين (EOSIN) ، وُضِعَت الأنسجة في صبغة الايوسين لمدة 3 دقائق بغرض صبغ أجزاء النسيج التي لم تصبغ بصبغة الهيماتوكسلين.
- التجفيف (Dehydration)، وُضِعَ النسيج في الكحول الأيثيلي بتركيز تصاعدي لمدة دقيقة واحدة في كل تركيز لسحب الماء من النسيج.
- الترويق (Clearing) ، وذلك لإزالة الكحول المتبقي في النسيج بعد مرحلة التجفيف وتمت هذه المرحلة بثلاث تمريرات في الزايلول لمدة دقيقة لكل تمريرة.
- وضع DPX وغطاء الشريحه (Distrene-plasticizer-xylene & Cover) (slide).
- الفحص المجهرى
تم استخدام مجهر ضوئي من نوع Leitz Co, Germany وكامرة من نوع Sony- DSC-W30, Korea بغرض الفحص وتصوير العينات.

3-5 تقنية الكيمياء النسيجية المناعية

قُطعت شرائح النسيج الموجودة على قالب الشمع باستخدام المايكروتوم بسمك $4\mu\text{m}$ ، ثم وضعها في الحمام المائي وتحميلها على شرائح زجاجية خاصة Charged Slid وتعريضها لحرارة 60° ، لزيادة قوة الالتصاق بين النسيج والشرائح الزجاجية. مرّرت الشرائح في محلول الزايلول لإزالة الشمع الموجود على النسيج لمرحلتين وبفترة 10 دقائق لكل تمريرة، ثم إعادة ترطيب النسيج من خلال وضع الشرائح في الكحول الأيثيلي بتركيز تنازلية، حيث شملت (100%-95%-70%-50%) لمدة 5 دقائق في كل تركيز. بعد إزالة شمع البارافين وإعادة ترطيب النسيج مرّرت الشرائح بعدة مراحل لغرض الصبغ بصبغة الكيمياء النسيجية المناعية وشملت هذه المراحل، ما يأتي (Crosby *et al.*, 2014):

1- استرجاع المستضد (Antigen retrieval)

وُضِعَت الشرائح في محلول السترات بتركيز 0.01، ثم وضعها في المايكرويف كُرّرت العملية 4 مرات، لمدة 5 دقائق لكل مرّة ، ثم تبريد الشرائح لمدة 20 دقيقة قبل غسلها بمحلول

phosphate-buffered saline (PBS) أجريت هذه المرحلة لغرض كسر روابط البروتينات المتشكلة نتيجة عملية التثبيت.

2- غلق المناطق غير المحددة في النسيج Tissue Blocking

وضعت 1-3 قطرات من كاشف البيروكسيد (3% H₂O₂ في الماء أو الميثانول) 10-15 دقيقة لإخماد نشاط البيروكسيد الداخلي.

ثم غسله بمحلول الغسل لمدة 5 دقائق.

لتقليل التفاعلات الكارهة للماء بين الأجسام المضاد الأولية والأنسجة استُخدم 1-3 قطرات من serum blocking reagent لمدة 15 دقيقة.

3- الأجسام المضادة الأولية (primary antibody)

اتم حضن النسيج مع الأجسام المضادة الأولية الجدول (3-3) بدرجة 4^o لمدة ليلة كاملة، تم تخفيف الأجسام المضادة من خلال اتباع تعليمات الشركة المصنعة، ثم غسل العينات بمحلول الغسل 3 مرات ولمدة 5 دقائق لكل مرة.

الجدول (3-3) الاجسام المضادة الاولية المستخدمة في الدراسة

ت	المؤشرات المستخدمة	النوع	التخفيف	الشركة المصنعة
1	سي دي 15	Rabbit Monoclonal	1:50	Dako
2	سي دي 68	Rabbit Polyclonal	1:30	Dako
3	الانترلوكين-6	Rabbit Polyclonal	1:100	LifeScience
4	عامل نخر الورم الفا	Rabbit Polyclonal	1:100	LifeScience

4- الأجسام المضادة الثانوية (secondary antibody)

حضنت العينات مع 1-3 قطرات من الأجسام المضادة الثانوية المعالجة بالبيوتين لمدة 30-60 دقيقة، ثم غسلت العينات بمحلول الغسل 3 مرات لمدة 5 دقائق لكل مرة، حيث استخدم poly-HRP Goat Anti-Rabbit IgG كأجسام مضادة ثانوية في التجربة.

5- إضافة مولد اللون (Di Amino Benzidine DAB)

تم إضافة 1-5 قطرات من محلول الكروموجين DAB لتغطية قسم الأنسجة بالكامل واحتضانها لمدة 15-20 دقيقة، وللتأكد من ظهور اللون فُحصت الشرائح بالمجهر الضوئي، ثم يَكرَّر الشطف بالمحلول الملحي المنظم PBS ثلاث مرات بمعدل 10 دقائق لكل مرة، ثم تشطف الشرائح بالماء المقطر و يزال الفائض منه، تليها عمية الشطف بالماء منزوع الأيونات.

6- صبغة الهيماتوكسلين (counterstain hematoxylin)

صُيغت الشرائح بالهيماتوكسلين ماير Haematoxylin 'Mayers بمدة تتراوح بين 3-5 دقائق ثم تشطف بالماء، وتمرر بسلسلة تصاعدية (50%-70%-95%-100%) من الكحول الأيثلي لمدة خمس دقائق، لكل تركيز، ثم تمرر بمتغيرين من الزايلين Zylene-X بمعدل 3 دقائق لكل متغير، تم تجفيف الشرائح في درجة حرارة الغرفة مدة 20 دقيقة وتغطى بواسطة (Cover slide & Distrene-plasticizer-xylene)DPX

3-6 تحليل الفحص الكيميائي النسجي المناعي

شاهد التعبير الإيجابي للخلايا المصبوغة وفحصها بالمجهر. وبالنسبة للخلايا الالتهابية ، سُجِّلت عدد العدلات والخلايا البلعمية المعبرة عن مؤشرات الخلايا الالتهابية سي دي 15 و سي دي 68 على التوالي في منطقة الجرح باستخدام مقياس من أربع نقاط:
(0 = لا يوجد خلايا معبرة) ، (1 = تعبير ضعيف >10 خلية/للحقل (قوة تكبير عالية))، (2 = تعبير معتدل > 30 خلية) ، (3 = تعبير قوي < 30 خلية). (Wu et al., 2017).
و بالنسبة للوسيطات الالتهابية ، سُجِّلت عدد الخلايا الالتهابية ودرجة شدة تعبير في طبقة البشرة للأجسام المضادة (عامل نخر الورم الفا و الانترلوكين-6) في منطقة الجرح باستخدام مقياس من أربع نقاط: (0 = لا يوجد تعبير) ، (1 = تعبير ضعيف) ، (2 = تعبير معتدل) ، (3 = تعبير قوي) (Al-Ghamdi & Atta, 2020).

الفصل الرابع

النتائج

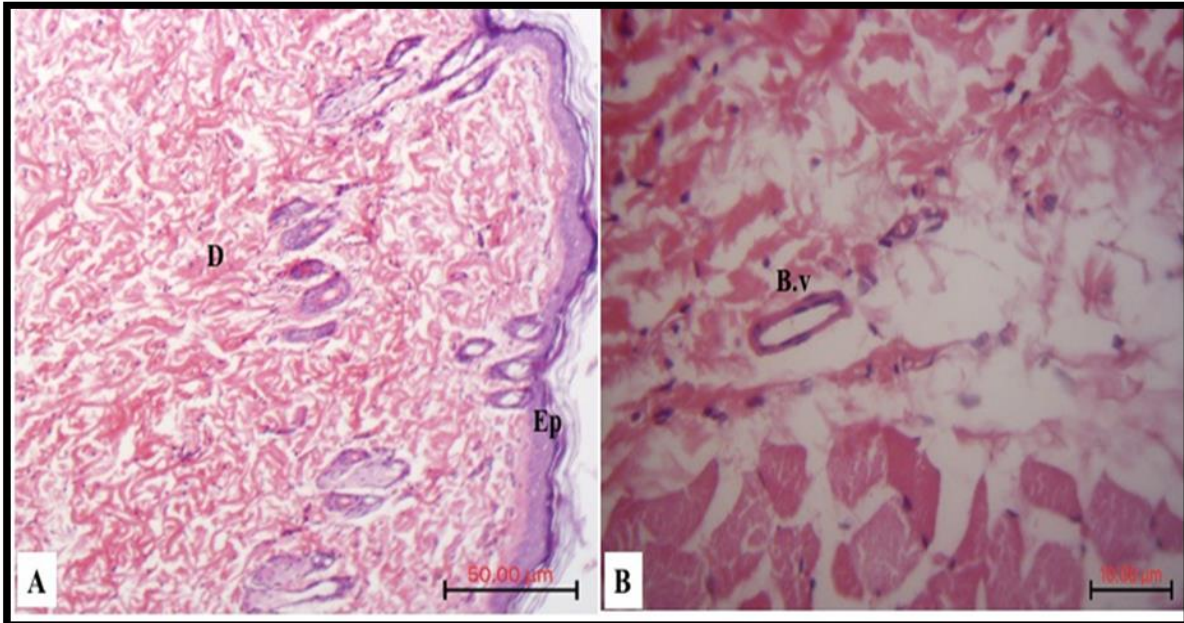
Results

1-4 الفحص المرضي النسجي Histopathological examination

أظهرت نتائج الفحص النسجي للجروح الحيوية في جلد الجرذان وجود عدة تغيرات نسجية شملت وجود نزف دموي، و توسع و احتقان في الاوعية الدموية، فضلاً عن ارتشاح خلايا الدم البيض، فيما اقتصررت التغيرات النسجية في الجروح غير الحيوية على وجود نزف دموي بدون تواجد ردود فعل حيوية في النسيج المجروح فضلاً عن تغيرات بعد الموت التي ظهرت بعد الدقيقة 180 للموت وشملت هذه التغيرات وجود وذمة في طبقات الجلد، وتنكس فجوي وتحطم في خلايا الغدد العرقية والغدد الدهنية، فضلاً عن تهتك طبقة البشرة.

أظهر الفحص النسجي لمجموعة السيطرة لجلد جرذان خلوه من الجروح، عدم وجود

اي تغيرات نسجية تذكر كما في الشكل (B-A-1-4)

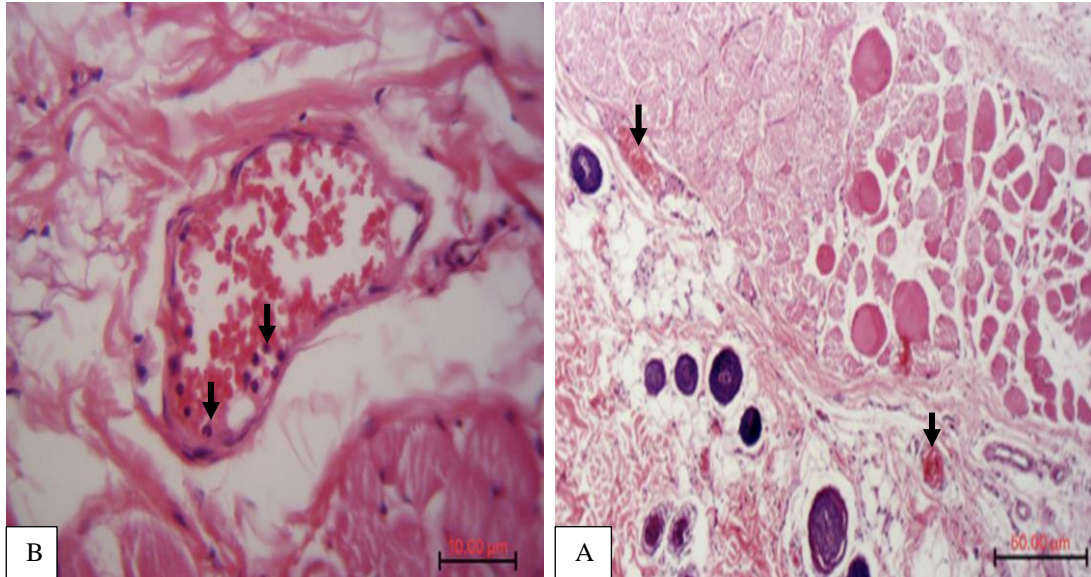


الشكل (1-4) مقطع نسجي لجلد جرذان غير مجروح من مجموعة السيطرة (A) - طبقات

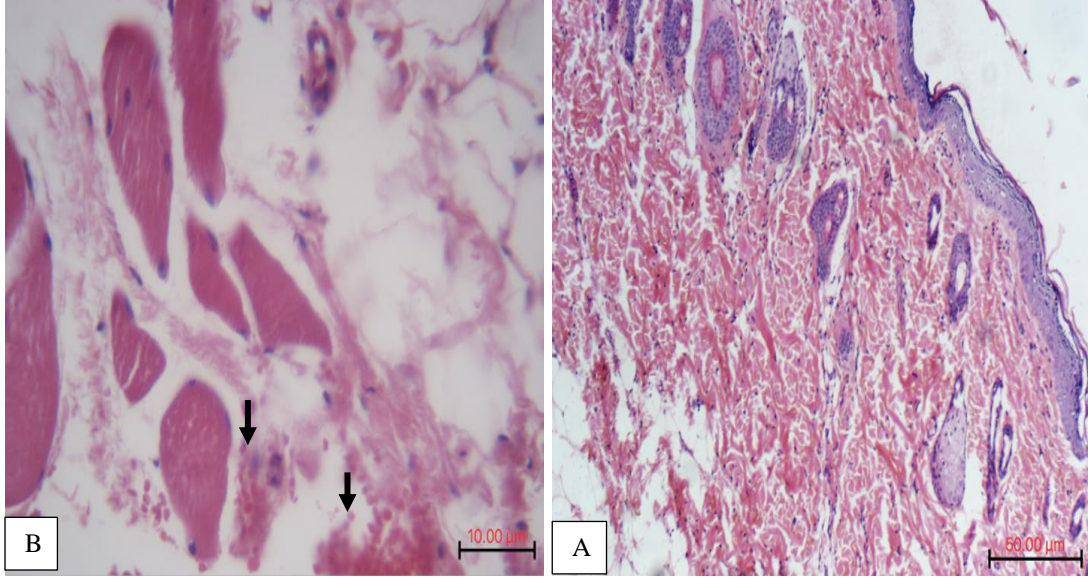
الجلد المتكونة من البشرة (EP) ، الأدمة (D) خالية من أية تغيرات نسجية تذكر H&E

50μm، (B) - الاوعية الدموية طبيعية في طبقة الأدمة H&E 10μm .

فيما شملت التغييرات النسجية لمجموعة الجروح الحيوية بعمر 30 دقيقة لجلد الجرذان وجود نزف دموي واحتقان وتوسع قطر الأوعية الدموية الموجودة في طبقة الأدمة في النسيج المجروح كما في الشكل (A-2-4)، فضلاً عن بدء هجرة الخلايا الالتهابية باتجاه جدار الأوعية الدموية كما في الشكل (B-2-4)، في الطرف الآخر لم تُرصد أيّة تغييرات نسيجية تذكر في مجموعة السيطرة للجلد بدون جرح بعمر 30 دقيقة بعد الموت كما في الشكل (3-4-A)، فيما اقتصرَت التغييرات النسجية في مجموعة الجروح غير الحيوية وبعمر 30 دقيقة على وجود نزف دموي فقط، بدون وجود أيّ استجابة حيوية متمثلة بارتشاح الخلايا الالتهابية كما في الشكل (B-3-4).

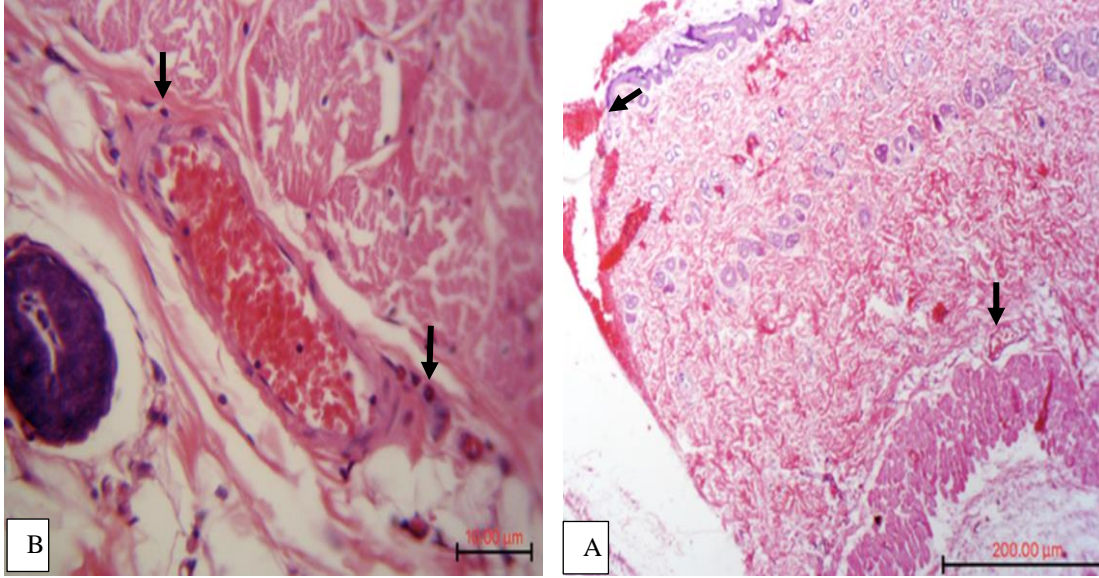


الشكل (2-4) مقاطع نسيجية لجروح جلدية في الجرذان لمجموعة الجروح الحيوية بعمر 30 دقيقة. (A) - يوضح وجود احتقان وتوسع قطر الأوعية الدموية في النسيج القريب من الجرح (السهم الاسود) $50\ \mu\text{m}$ H&E. (B) - يوضح تجمع خلايا الدم البيض على بطانة الوعاء الدموي (السهم الاسود) $10\ \mu\text{m}$ H&E.

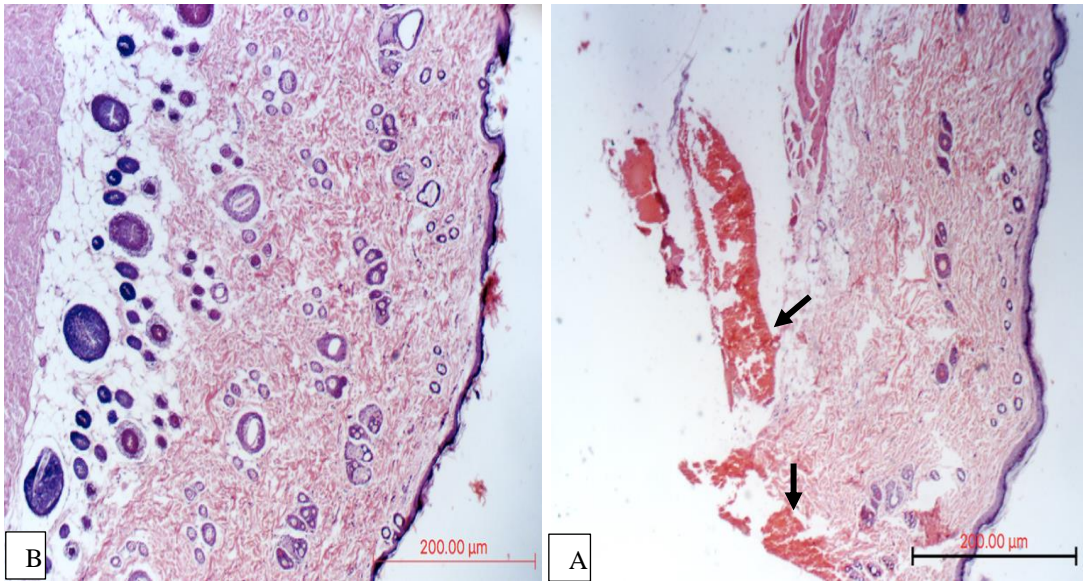


الشكل (3-4) مقاطع نسيجية لجروح جلدية في الجرذان لمجموعة الجروح غير الحيوية بعمر 30 دقيقة (A)- يوضح عدم وجود تغيرات نسيجية في طبقات الجلد لمجموعة السيطرة H&E µm50، (B)- يوضح وجود نزف دموي في النسيج المجروح (السهم الاسود) H&E µm10.

بينما امتازت التغيرات النسيجية لمجموعة الجروح الحيوية بعمر 60 دقيقة بوجود نزف دموي شديد على حافة الجرح مع احتقان شديد في الأوعية الدموية الموجودة في طبقة الأدمة كما في الشكل (A-4-4)، فضلاً عن ازدياد ارتشاح الخلايا الالتهابية المتمثلة بالعدلات بشكل اساس حول الأوعية الدموية وعلى جدرانها في نسيج الجلد كما في الشكل (B-4-4)، أتسمت التغيرات النسيجية للجروح غير الحيوية بعمر 60 دقيقة بعد الموت بوجود نزف دموي شديد على حافة الجرح دون وجود استجابة التهابية متمثلة بارتشاح الخلايا الالتهابية والاحتقان في الأوعية الدموية كما في الشكل (A-5-4)، فيما لم تلاحظ اي تغيرات نسيجية في مجموعة السيطرة بدون جروح كما في الشكل (B-5-4)

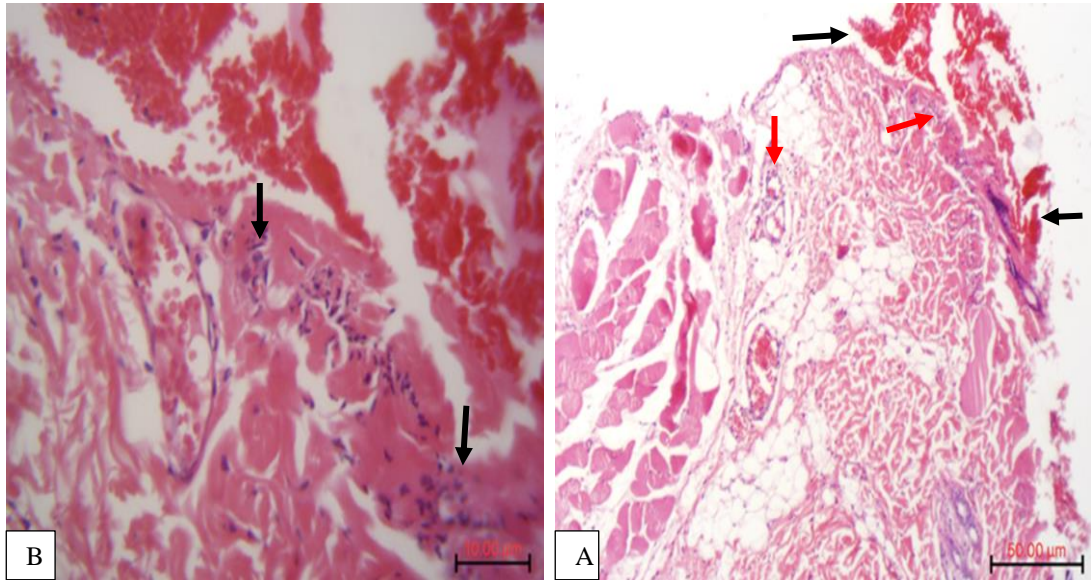


الشكل (4-4) مقاطع نسجية لجلد جرذان من مجموعة الجروح الحويوية بعمر 60 دقيقة.
 (A) - يلاحظ وجود نزف دموي شديد في حافة الجرح (السهم الاسود) $200\ \mu\text{m}$ H&E.
 (B) - يوضح ارتشاح الخلايا الالتهابية خارج الوعاء الدموي (السهم الاسود) $10\ \mu\text{m}$ H&E.



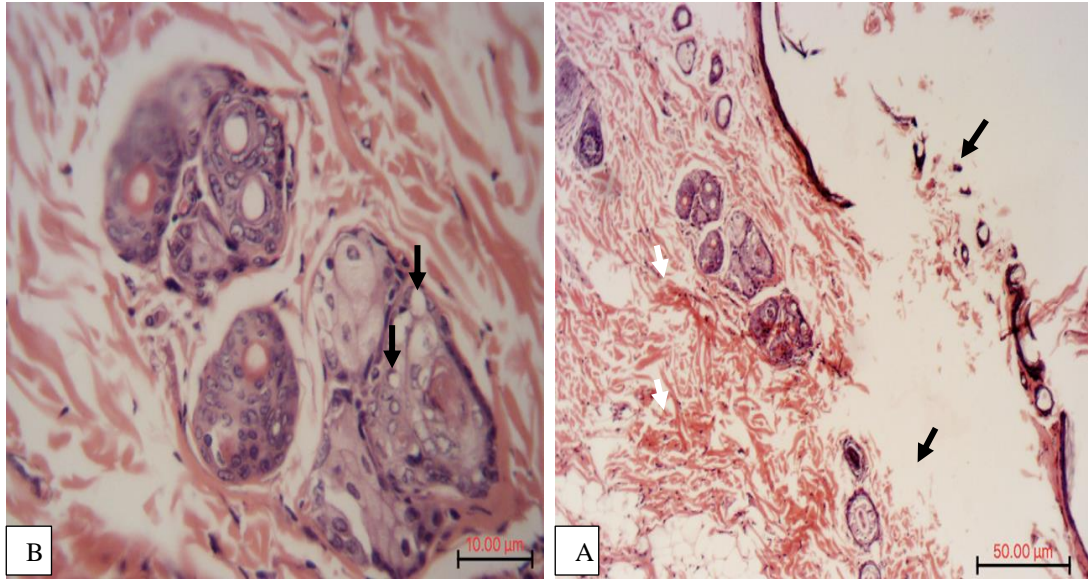
الشكل (5-4) مقاطع نسجية لجلد جرذان من مجموعة الجروح غير الحويوية بعمر 60 دقيقة.
 (A) - يوضح وجود نزف دموي على حواف الجرح (السهم الاسود)، (B) - يوضح عدم وجود اي تغيرات نسجية في نسيج الجلد لمجموعة السيطرة $200\ \mu\text{m}$ H&E.

وأظهر الفحص النسجي لمجموعة الجروح الحيوية بعمر 180 دقيقة وجود نزف دموي شديد في حواف الجروح مع زيادة ارتشاح الخلايا الالتهابية حول الاوعية الدموية، علاوة على تواجدها في منطقة الإصابة وحواف الجرح كما في الشكل (4-6-B&A)، وتمثلت هذه الخلايا بالعدلات بشكل أساس فضلاً عن ارتشاح أعداد قليلة من الخلايا البلعمية، في حين ازدادت علامات التحلل الذاتي بعد الموت لجلود جرذان سليمة بعمر 180 دقيقة بعد الموت تمثلت بوجود وذمة في النسيج و تنكس فجوي في بعض من خلايا الغدد الدهنية، واقتصرت التغيرات النسجية لجلود الجرذان المجروحة بعد الموت وبذات المدة على وجود نزف دموي فضلاً عن علامات التحلل الذاتي بعد الموت للنسيج كما في الشكل (4-7-B&A)



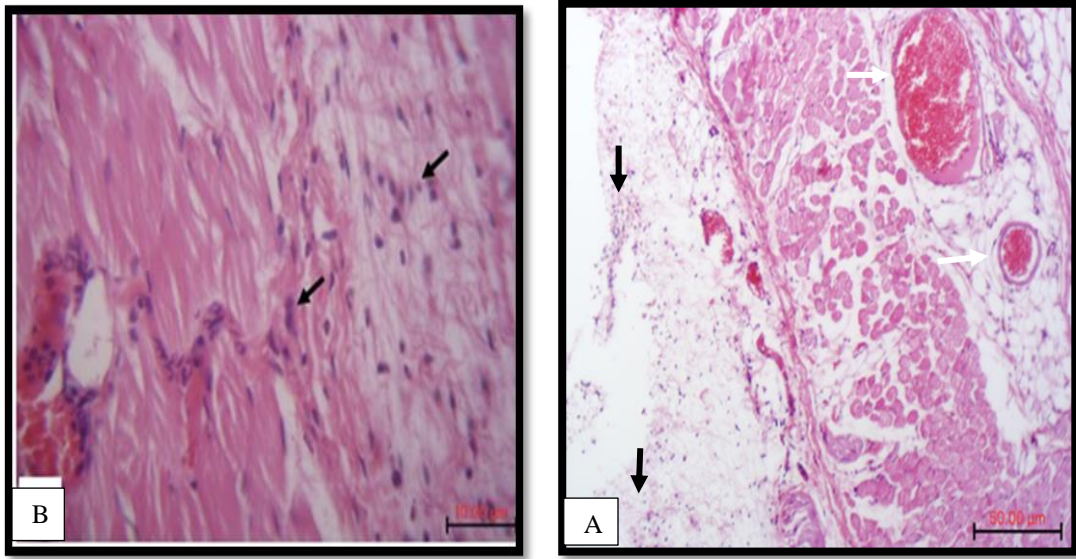
الشكل (4-6) مقاطع نسجية لجلد جرذان من مجموعة الجروح الحيوية بعمر 180 دقيقة.

(A)- يلاحظ وجود نزف دموي في حافة الجرح (السهم الاسود) بالإضافة الى زيادة ارتشاح الخلايا الالتهابية في النسيج (السهم الاحمر) H&E μm50، (B)- يوضح ارتشاح كثيف للخلايا الالتهابية حول الوعاء الدموي وفي حافة الجرح (السهم الاسود) H&E μm10.

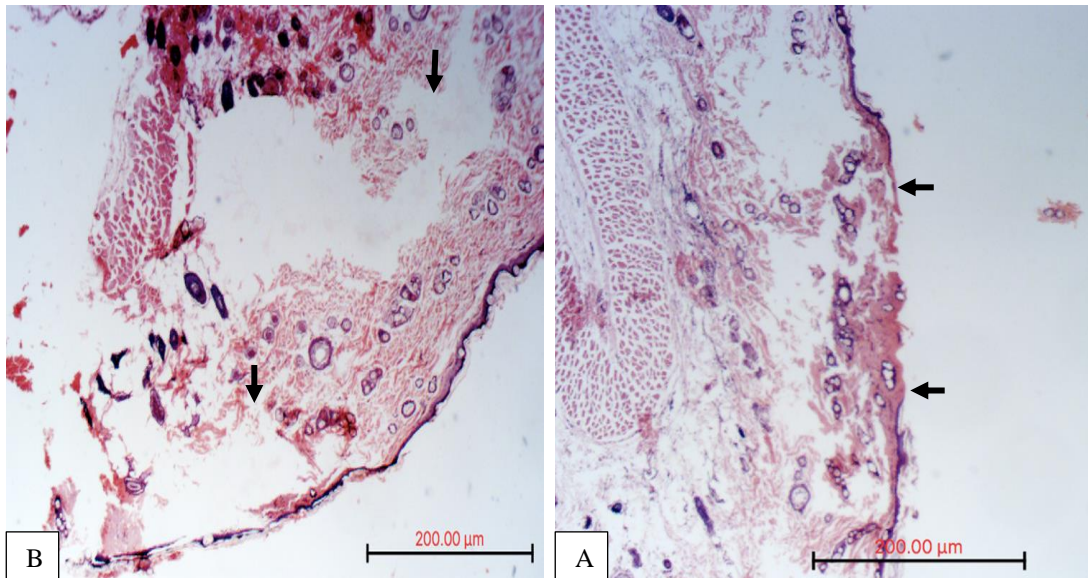


الشكل (4-7) مقاطع نسيجية لجلد جرذان من مجموعة الجروح غير الحيوية بعمر 180 دقيقة (A)- يوضح وجود نزف دموي في النسيج (السهم الابيض). بالإضافة الى وجود التحلل الذاتي في النسيج (السهم الاسود) $\mu\text{m}50$ H&E، (B)- يوضح التنكس الفجوي في خلايا الغدد الدهنية في مجموعة السيطرة بدون جروح (السهم الاسود) $\mu\text{m}10$ H&E.

فيما امتازت التغيرات النسيجية لمجموعة الجروح الحيوية بعمر 360 دقيقة على وجود نزف واحتقان للأوعية الدموية، فضلاً عن ارتشاح الخلايا الالتهابية بشكل كبير في جميع أنحاء النسيج كما في الشكل (4-8-A-B)، مع ازدياد أعداد الخلايا البلعمية المرتشحة في النسيج بشكل ملحوظ في هذه الفترة من عمر الجرح، فيما شملت التغيرات النسيجية لمجموعة السيطرة لجلد جرذان سليمة من دون جروح بعد الموت وبمدة 360 دقيقة على تحطم النسيج بشكل كبير نتيجة التحلل الذاتي بعد الموت وتحطم خلايا الغدد العرقية والغدد الدهنية، فيما اقتصرت التغيرات النسيجية في الجروح غير الحيوية و بذات الفترة الزمنية على وجود نزف دموي و وذمة في النسيج، فضلاً عن تحطم النسيج بشكل كبير نتيجة تغيرات بعد الموت كما في الشكل (4-9-A-B).

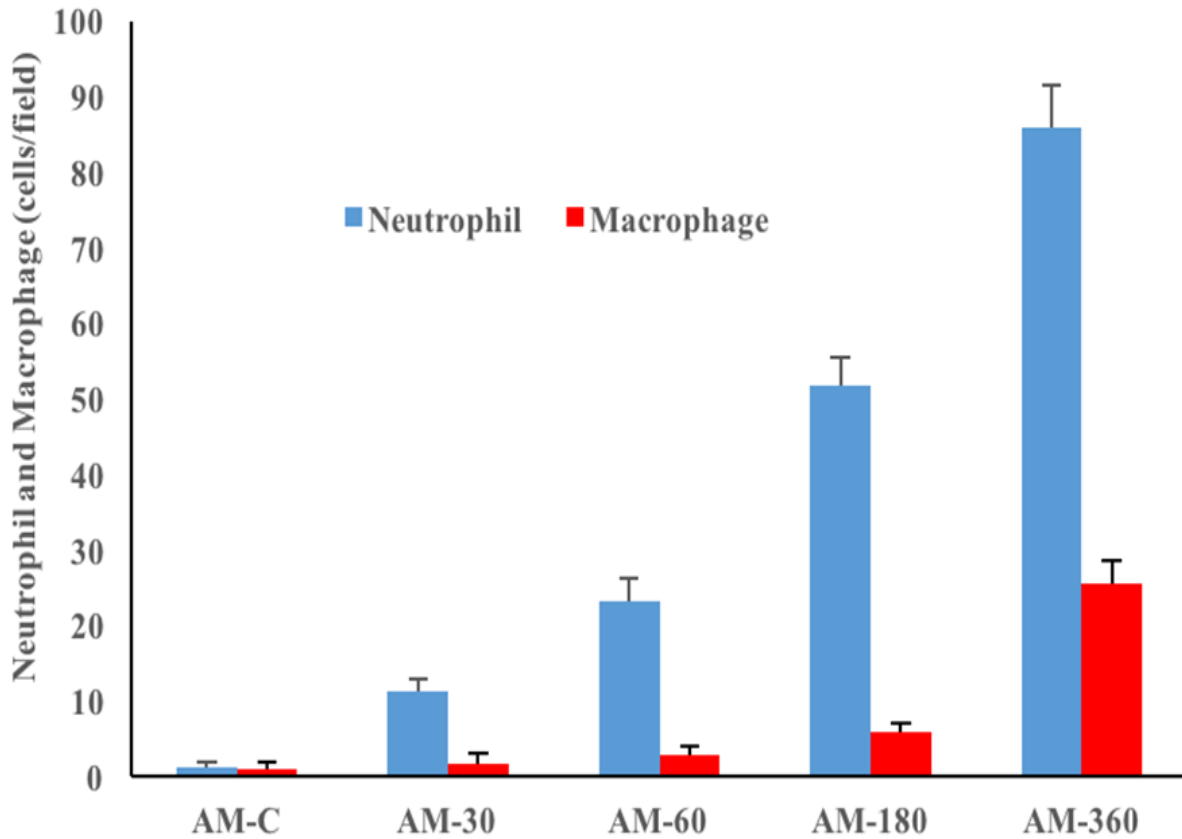


الشكل (4-8) مقاطع نسجية لجلد جرذان من مجموعة الجروح الحيوية بعمر 360 دقيقة. (A)- يلاحظ ارتشاحاً كثيفاً للخلايا العدلة في جميع انحاء النسيج (السهم الاسود)، فضلاً عن احتقان وتوسع قطر الأوعية الدموية (السهم الابيض) $50 \mu\text{m}$ H&E، (B)- يوضح ارتشاح كثيف للخلايا الالتهابية في طبقة الادمة (السهم الاسود) $10 \mu\text{m}$ H&E.



الشكل (4-9) مقاطع نسجية لجلد جرذان من مجموعة الجروح الحيوية بعمر 360 دقيقة. (A)- مجموعة السيطرة للجلد السليم بعد 360 دقيقة من الموت وجود علامات التحلل الذاتي في النسيج وتمثلت بوجود وذمة في جميع طبقات الجلد، فضلاً عن تهتك طبقة البشرة (السهم الاسود) $200 \mu\text{m}$ H&E، (B)- اظهر الفحص النسيجي لمجموعة الجروح غير الحيوية وجود نزف دموي، فضلاً عن التحلل الذاتي للنسيج (السهم الاسود) $200 \mu\text{m}$ H&E.

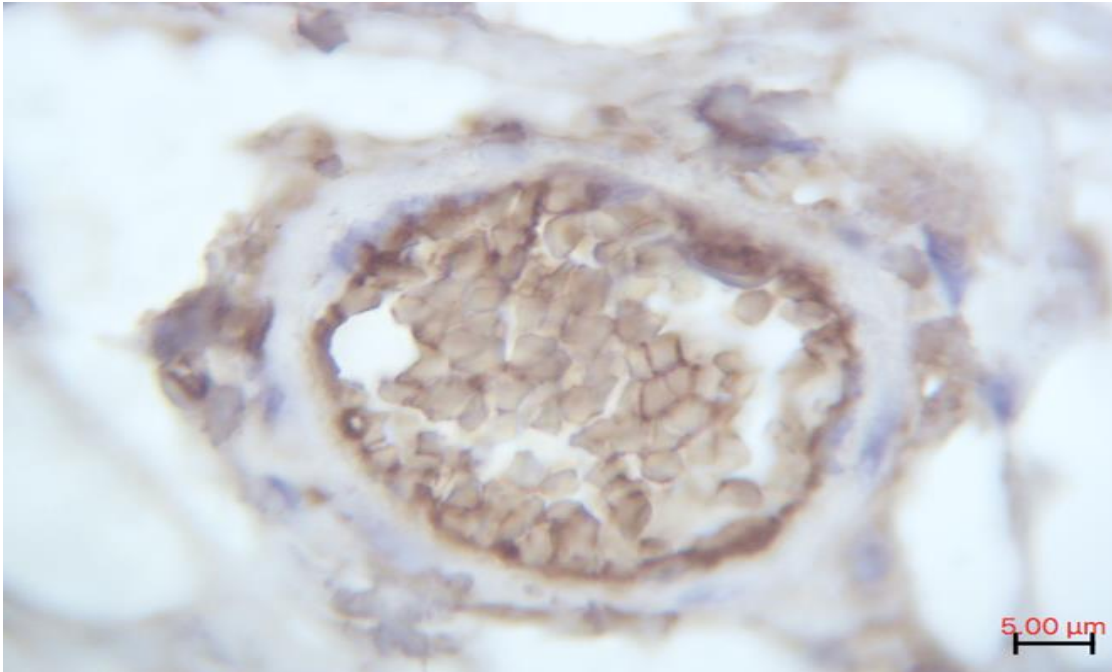
إن ارتشاح الخلايا الالتهابية المتمثلة بالعدلات و الخلايا البلعمية بشكل رئيسي كان متفاوتاً بين مجاميع الجروح الحيوية (جروح قبل الموت) كما موضح في الشكل (4-10)، حيث لوحظ بدء ارتشاح الخلايا الالتهابية المتمثلة بالعدلات في الدقائق الأولى من عمر الجرح الحيوية (مجموعة الجروح بعمر 30 دقيقة)، وازدادت أعداد هذه الخلايا تدريجياً حتى الدقيقة 60 من عمر الجرح، فيما شهدت مجموعة الجرح بعمر 180 دقيقة زيادة كبيرة في أعداد العدلات المرتشحة وبمعدل 50 خلية في الحقل (قوة التكبير X40) لتصل الى أعلى مستوى من الارتشاح في مجموعة الجروح بعمر 360 دقيقة بواقع 80 خلية لكل حقل، فيما يبدأ ارتشاح الخلايا البلعمية بعد مرور 180 دقيقة من عمر الجروح قبل الموت لتصل أعلى نسبة انتشار للخلايا في مجموعة الجروح بعمر 360 دقيقة بواقع 25 خلية لكل حقل.



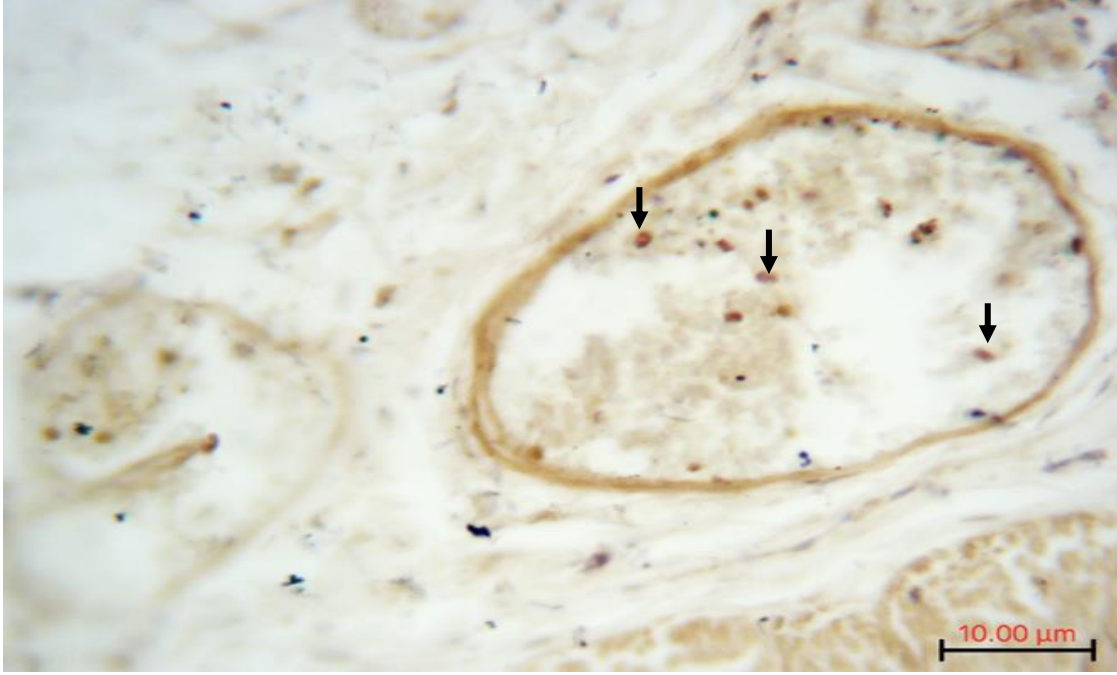
الشكل (4-10) نسبة ارتشاح الخلايا الالتهابية المتمثلة بالعدلات والخلايا البلعمية بين المجاميع المختلفة للجروح الحيوية (Antemortem (AM).

2-4 الفحص الكيميائي النسجي المناعي Immunohistochemistry Examination

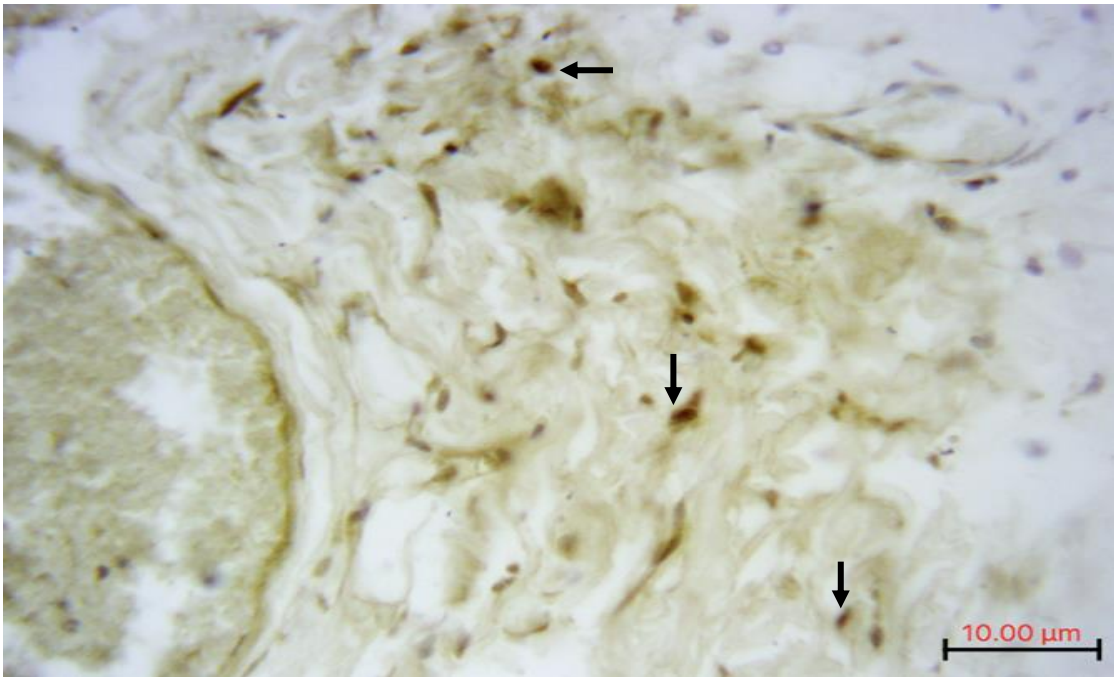
أظهرت الدراسة الكيميائية النسجية المناعية في مجموعة السيطرة قبل الموت (بدون جروح) عدم وجود لخلايا الدم البيض المعبرة للبروتين سي دي 15 (CD15) كما في الشكل (4-11). فيما تم ملاحظة الخلايا الالتهابية المتمثلة بالعدلات المعبرة عن سي دي 15 في مجموعة الجروح الحيوية بعمر 30 دقيقة، حيث لوحظ تواجد خلايا العدلات المعبرة عن سي دي 15 داخل الاوعية الدموية القريبة من حافة الجرح في النسيج كما في الشكل (4-12)، كما شوهدت خلايا العدلات المعبرة عن سي دي 15 في مجموعة الجروح الحيوية بعمر 180 دقيقة، حيث وجد ارتشاح هذه الخلايا خارج الأوعية الدموية وفي منطقة جرح النسيج كما في الشكل (4-13). بينما لوحظ ارتشاح كثيف للعدلات المعبرة عن سي دي 15 وانتشار واسع في طبقة الادمة فضلا عن الانسجة العميقة للجلد في مجموعة الجروح الحيوية بعمر 360 دقيقة كما في الشكل (4-14)، فيما لم يلحظ وجود اي ارتشاح للعدلات المعبرة عن البروتين سي دي 15 في مجاميع الجروح بعد الموت التي شملت 30، 60، 180، 360 دقيقة. الشكل (4-15).



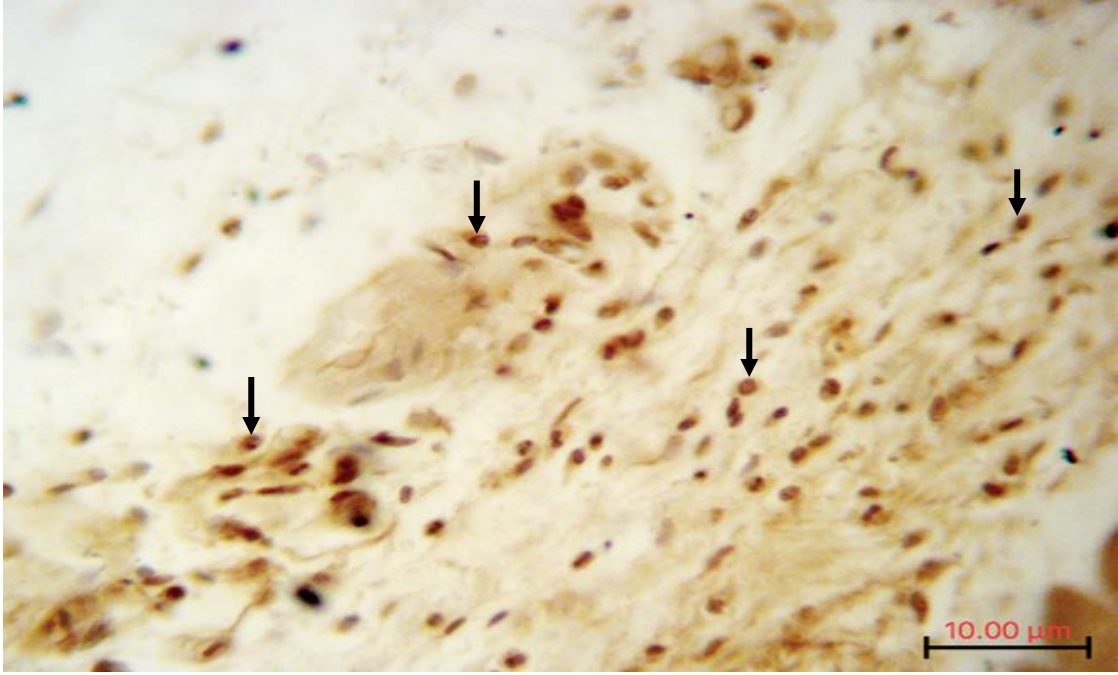
الشكل (4-11) الفحص الكيميائي النسجي المناعي للكشف عن الخلايا المعبرة عن سي دي 15، يوضح عدم وجود خلايا معبرة عن سي دي 15 في مجموعة السيطرة 5 μm IHC.



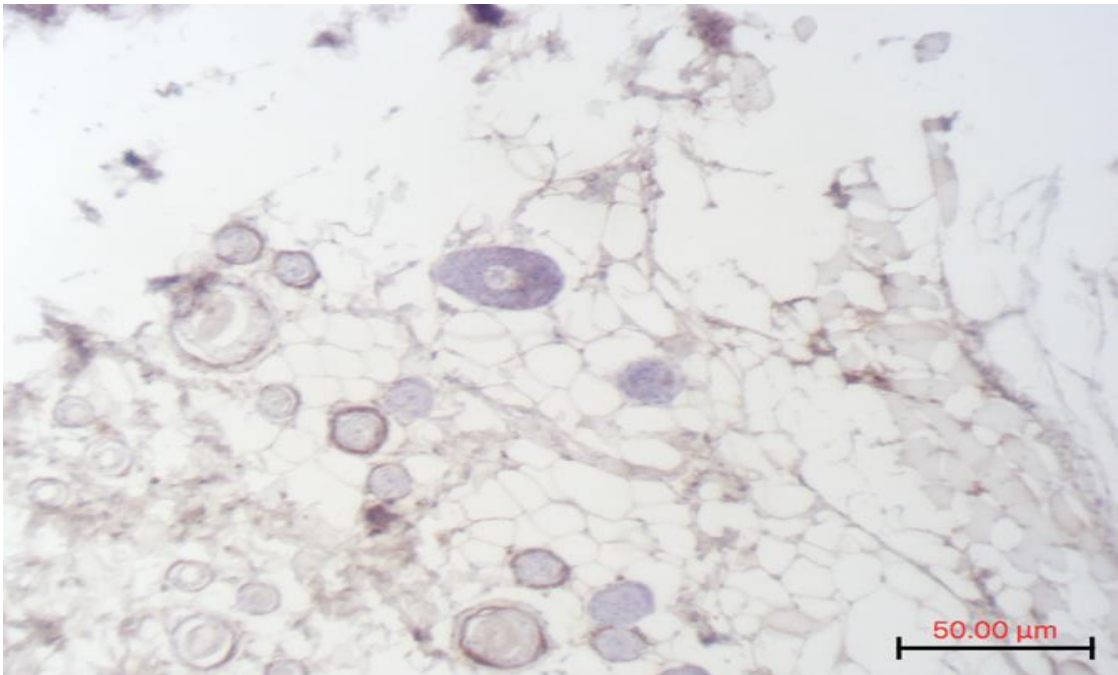
الشكل (4-12) الفحص الكيميائي النسجي المناعي للكشف عن الخلايا المعبرة عن سي دي 15، يلاحظ وجود خلايا معبرة عن سي دي 15 (السهم الاسود) داخل الأوعية الدموية في مجموعة الجروح الحيوية بعمر 30 دقيقة IHC μm 10.



الشكل (4-13) الفحص الكيميائي النسجي المناعي للكشف عن الخلايا المعبرة عن سي دي 15، يلاحظ ازدياد في عدد العدلات المعبرة عن سي دي 15 (السهم الاسود) حول الوعاء الدموي في مجموعة الجروح الحيوية بعمر 180 دقيقة IHC μm 10.

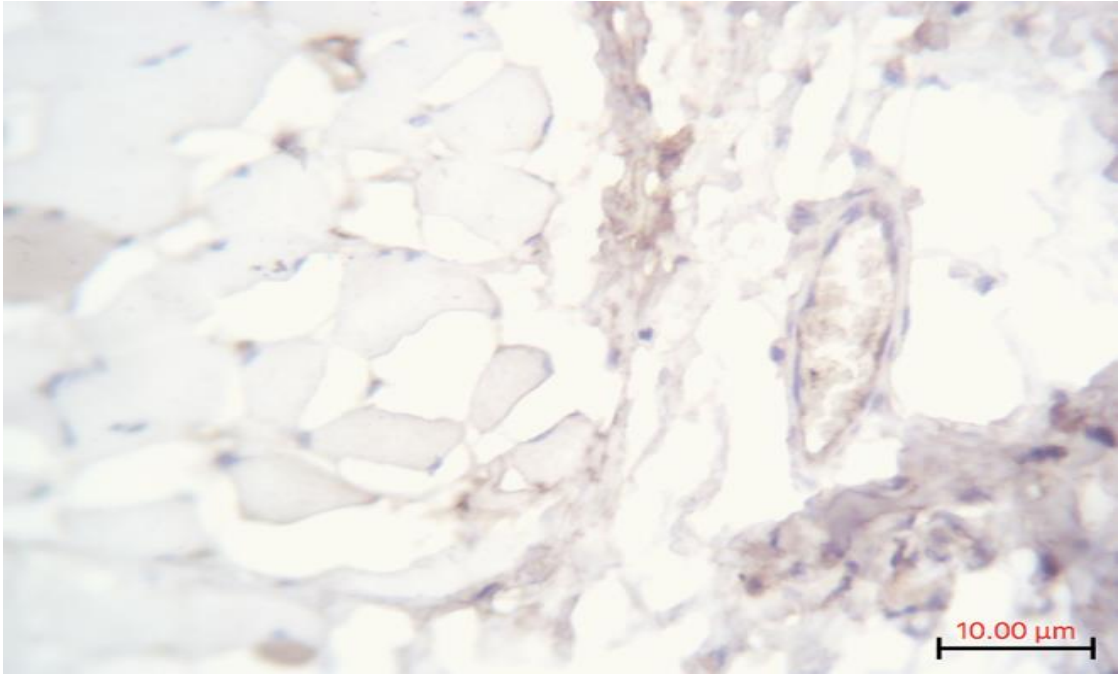


الشكل (4-14) الفحص الكيميائي النسجي المناعي للكشف عن الخلايا المعبرة عن سي دي 15. يلاحظ ارتشاح كثيف للعدلات المعبرة عن سي دي 15 (السهم الاسود) في جميع طبقات الجلد في مجموعة الجروح الحويوية بعمر 360 μm IHC.

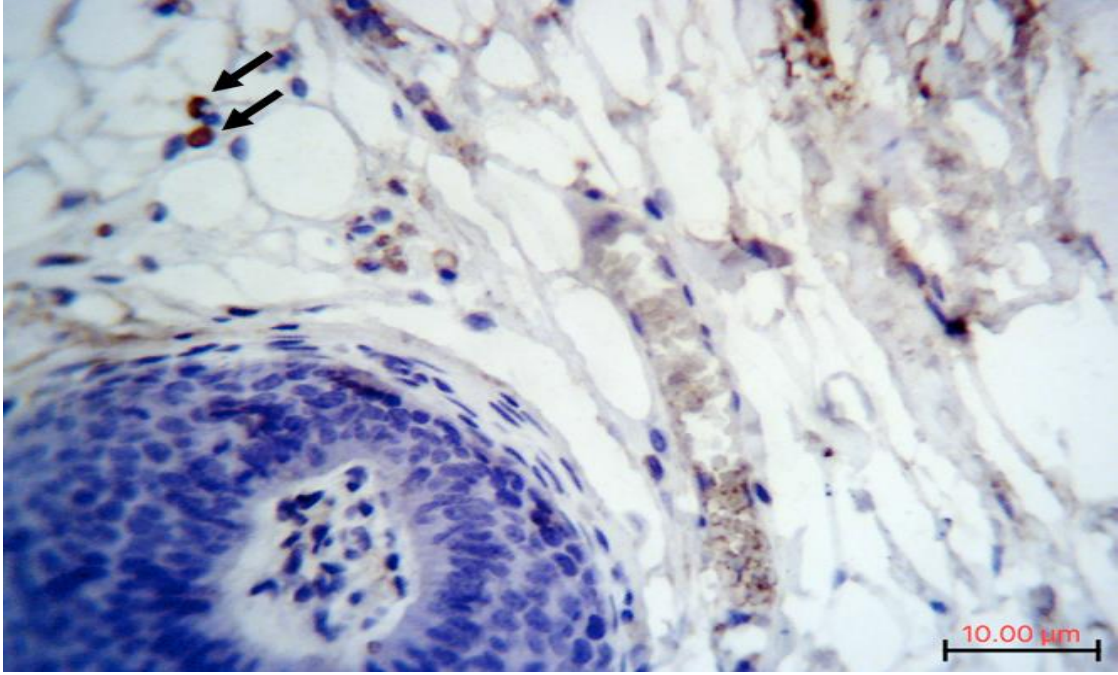


الشكل (4-15) الفحص الكيميائي النسجي المناعي للكشف عن الخلايا المعبرة عن سي دي 15. لوحظ عدم وجود ارتشاح للخلايا المعبرة عن سي دي 15 في مجاميع الجروح غير الحويوية 50 μm IHC.

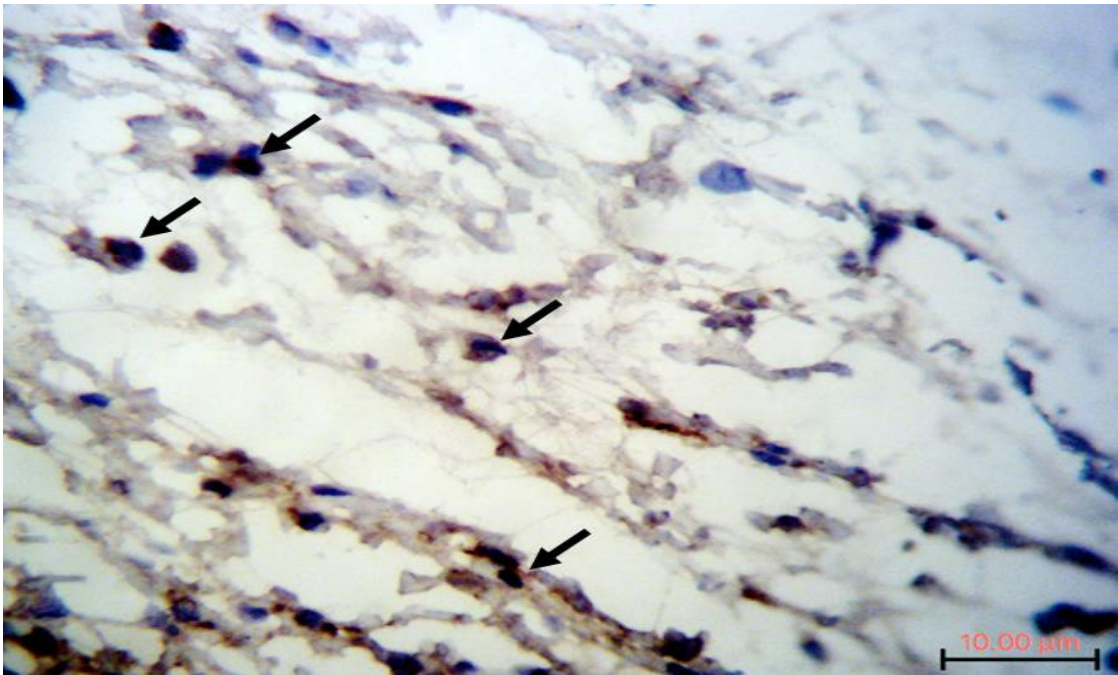
وأظهر الفحص الكيميائي النسجي المناعي للكشف عن الخلايا المعبرة عن سي دي 68 (CD68) عدم وجود اي ارتشاح للخلايا المعبرة عن سي دي 68 في مجموعة السيطرة بدون جروح كما في الشكل (4-16)، فيما شوهدت أعداد قليلة جداً ومحدودة في مجموعة الجروح الحيوية بعمر 30 دقيقة حيث شوهدت بالقرب من الأوعية الدموية القريبة للجرح كما في الشكل (4-17)، في الدقيقة 180 من عمر الجروح الحيوية لوحظت زيادة نسبية للخلايا البلعمية المعبرة عن سي دي 68، حيث لوحظ عدد من الخلايا البلعمية المعبرة عن سي دي 68 خارج الأوعية الدموية بالقرب من منطقة الجرح، فيما لوحظ وجود زيادة كثيفة في الخلايا البلعمية المعبرة عن سي دي 68 في مجموعة الجروح الحيوية بعمر 360 دقيقة التي تواجدت في جميع طبقات الجلد القريبة من موقع الجرح الشكل (4-18)، في مجاميع الجروح غير الحيوية التي شملت الفترات الزمنية 30، 60، 180، 360 دقيقة لم يلاحظ وجود للخلايا البلعمية المعبرة عن سي دي 68 في جميع الفترات الزمنية للجروح كما في الشكل (4-20).



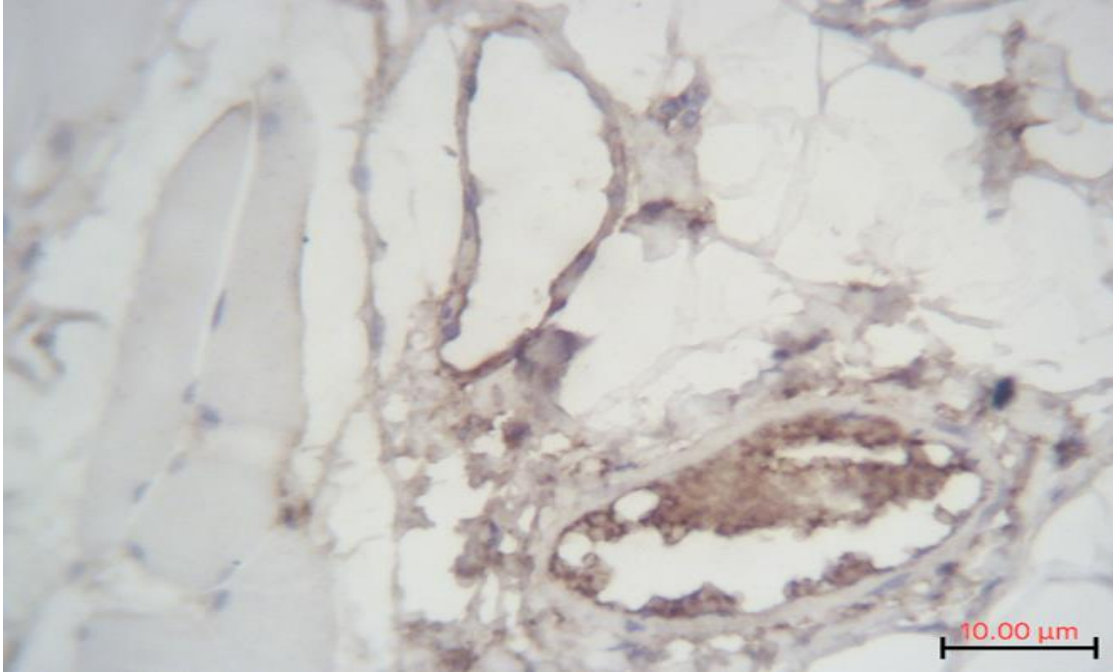
الشكل (4-16) الفحص الكيميائي النسجي المناعي للكشف عن الخلايا المعبرة عن سي دي 68. يوضح الشكل عدم وجود خلايا بلعمية معبرة عن سي دي 68 في مجموعة السيطرة بدون جروح 10 μm IHC.



الشكل (4-17) الفحص الكيميائي النسجي المناعي للكشف عن الخلايا المعبرة عن سي دي 68، يوضح الشكل ارتشاح قليل جداً للخلايا البلعمية المعبرة عن سي دي 68 في مجموعة الجروح الحيوية بعمر 30 دقيقة (السهم الاسود)، IHC $\mu\text{m}10$.

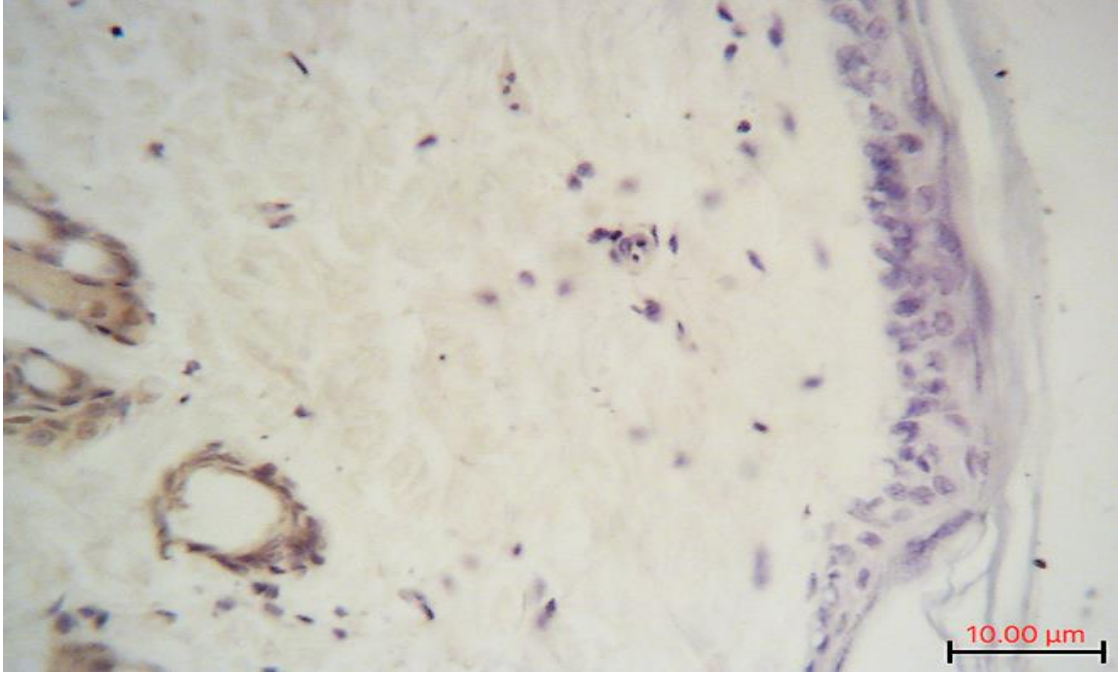


الشكل (4-18) الفحص الكيميائي النسجي المناعي للكشف عن الخلايا المعبرة عن سي دي 68، يوضح الشكل زيادة الكثافة العددية للخلايا البلعمية المرتشحة والمعبرة عن سي دي 68 (السهم الاسود) في مجموعة الجروح الحيوية بعمر 360 دقيقة IHC $\mu\text{m}10$.

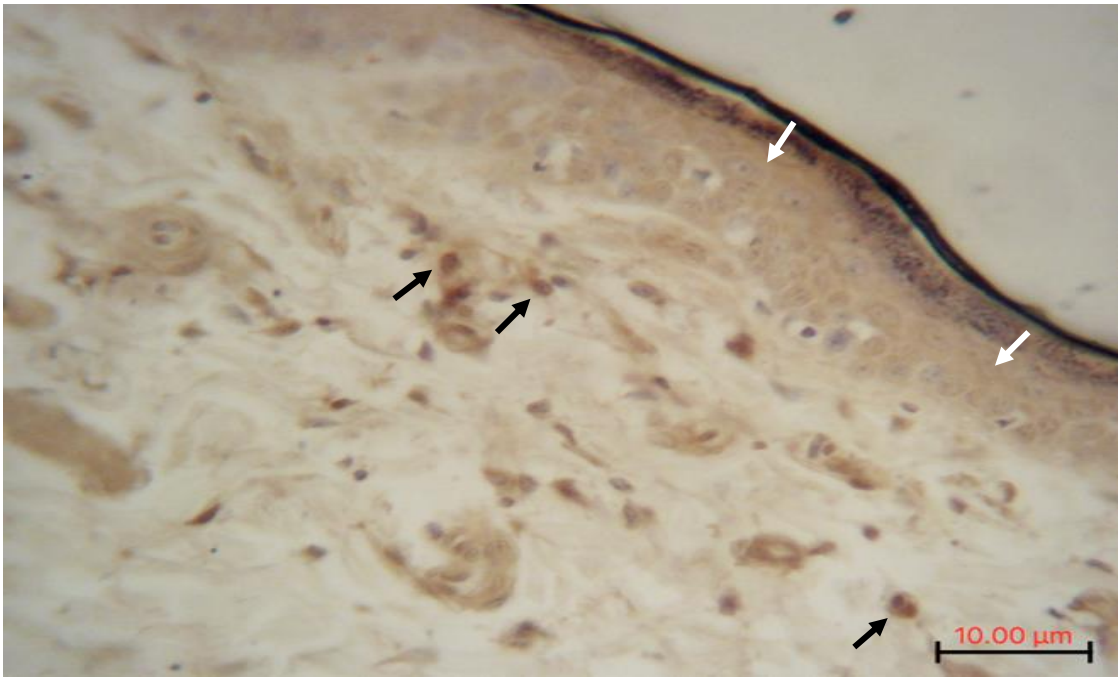


الشكل (4-19) الفحص الكيميائي النسجي المناعي للكشف عن الخلايا المعبرة عن سي دي 68، يوضح الشكل عدم وجود ارتشاح للخلايا البلعمية المعبرة عن سي دي 68 في مجاميع الجروح غير الحيوية 10 μm IHC.

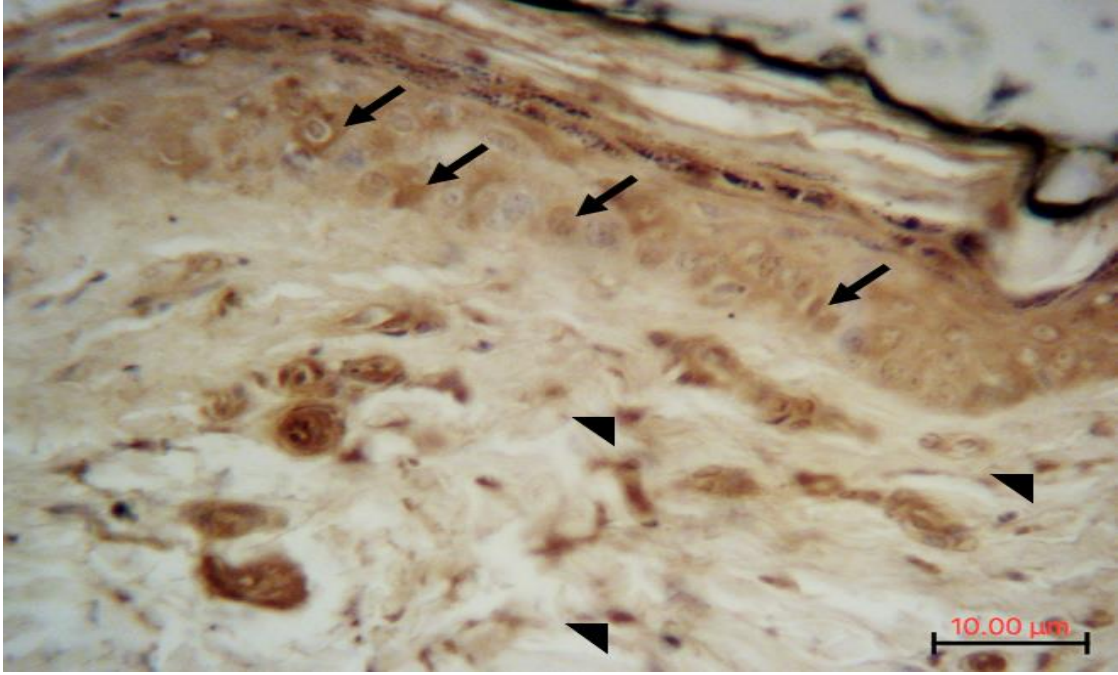
كما أظهر الفحص الكيميائي النسجي المناعي للكشف عن وجود الانترلوكين-6 (IL-6) في النسيج عدم وجود أي تعبير للساييتوكين في مجموعة السيطرة بدون جروح قبل الموت الشكل (4-20)، فيما أظهر الفحص وجود تعبير ضعيف للانترلوكين-6 في مجموعة الجروح الحيوية بعمر 30 دقيقة، حيث لوحظ وجود الانترلوكين-6 في خلايا طبقة البشرة المتمثلة بالخلايا الكيراتينية، فضلاً عن وجود تعبير للساييتوكين حول الأوعية الدموية والخلايا الالتهابية كما في الشكل (4-21)، كما لوحظ زيادة في مستوى التعبير عن الانترلوكين-6 في مجموعة الجروح الحيوية بعمر 180 دقيقة، ليصل الى أعلى مستوى للتعبير عن الساييتوكين في مجموعة الجروح الحيوية بعمر 360 دقيقة، حيث لوحظ التعبير عن الانترلوكين-6 في طبقة البشرة والطبقات الأخرى للجلد، فضلاً عن وجوده حول الأوعية الدموية والخلايا الالتهابية كما في الشكل (4-22)، فيما أظهر الفحص الكيميائي النسجي المناعي للكشف عن تعبير الانترلوكين-6 في مجاميع الجروح غير الحيوية بعد الموت وجود تعبير ضعيف جداً للساييتوكين في خلايا طبقة البشرة للجلد في مجموعة الجروح غير الحيوية بعمر 30 دقيقة الشكل (4-23). فيما لم يتم التعبير عن الساييتوكين في مجاميع الجروح غير الحيوية بعمر 180 و 360 دقيقة بعد الموت الشكل (4-24).



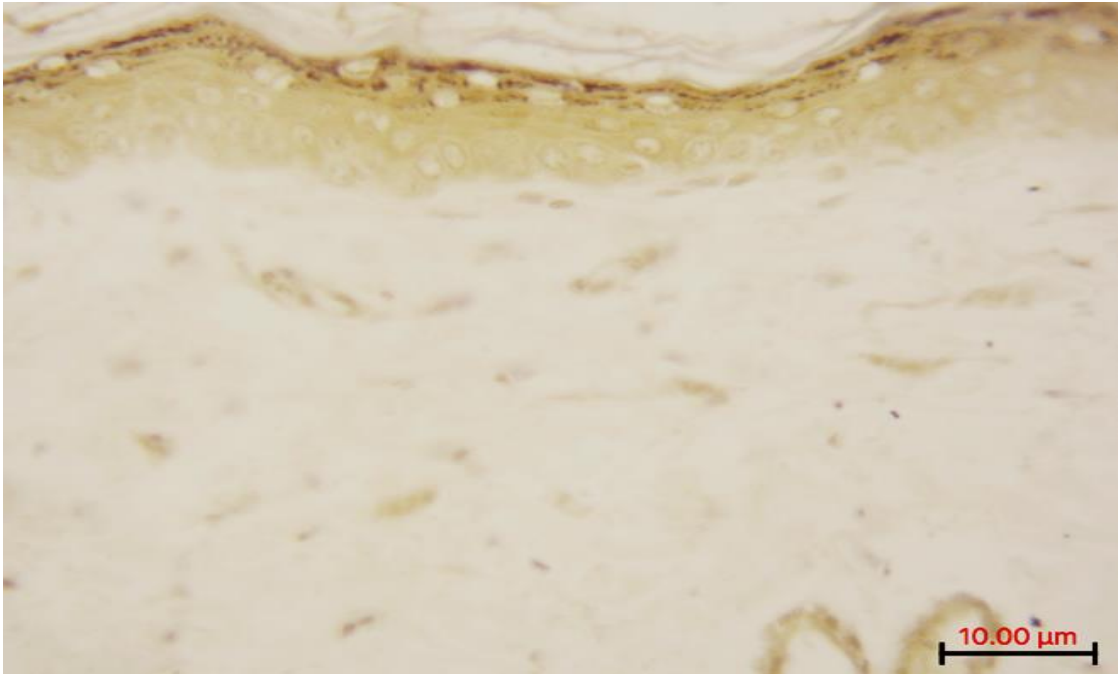
الشكل (4-20) الفحص الكيميائي النسيجي المناعي للكشف عن الانترلوكين-6 في النسيج في مجاميع الجروح الحيوية. يوضح عدم وجود تعبير للانترلوكين-6 في مجموعة السيطرة بدون جرح 10µm IHC.



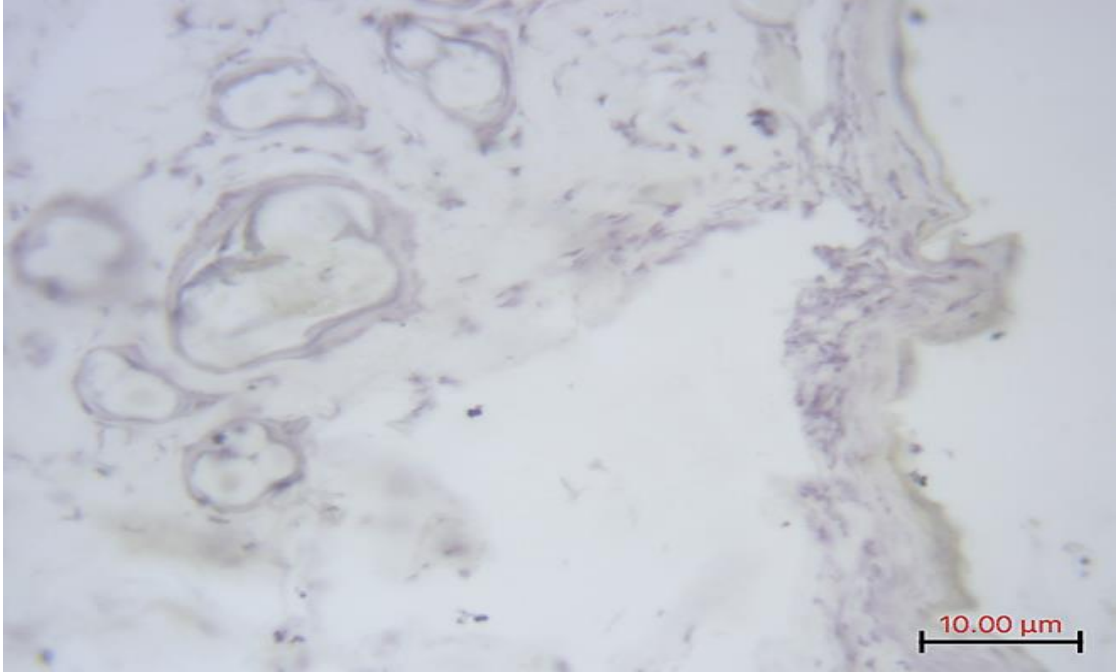
الشكل (4-21) الفحص الكيميائي النسيجي المناعي للكشف عن الانترلوكين-6 في النسيج في مجاميع الجروح الحيوية، لوحظ في مجموعة الجروح بعمر 30 دقيقة وجود تعبير متوسط للانترلوكين-6 في خلايا البشرة (السهم الاسود) بالإضافة الى الخلايا الالتهابية في الادمة (السهم الابيض) 10µm IHC.



الشكل (4-22) الفحص الكيميائي النسيجي المناعي للكشف عن الانترلوكين-6 في النسيج في مجاميع الجروح الحيوية، لوحظ في الشكل أعلى شدة للتعبير عن الانترلوكين-6 في مجاميع الجروح الحيوية بعمر 360 دقيقة خلايا البشرة (السهم الاسود) الخلايا الالتهابية (رأس السهم). IHC $\mu\text{m}10$.

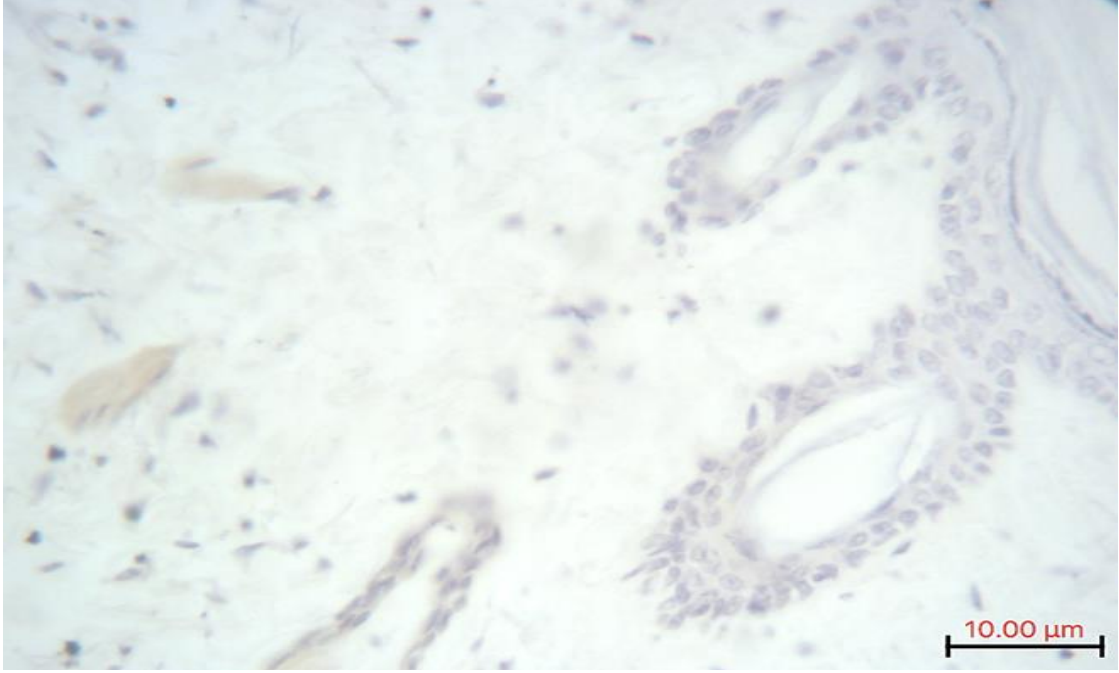


الشكل (4-23) الفحص الكيميائي النسيجي المناعي للكشف عن الانترلوكين-6 في النسيج في مجاميع الجروح غير الحيوية، يوضح وجود تعبير ضعيف جداً للانترلوكين-6 في البشرة لمجموعة الجروح غير الحيوية بعمر 30 دقيقة بعد الموت IHC $\mu\text{m}10$.

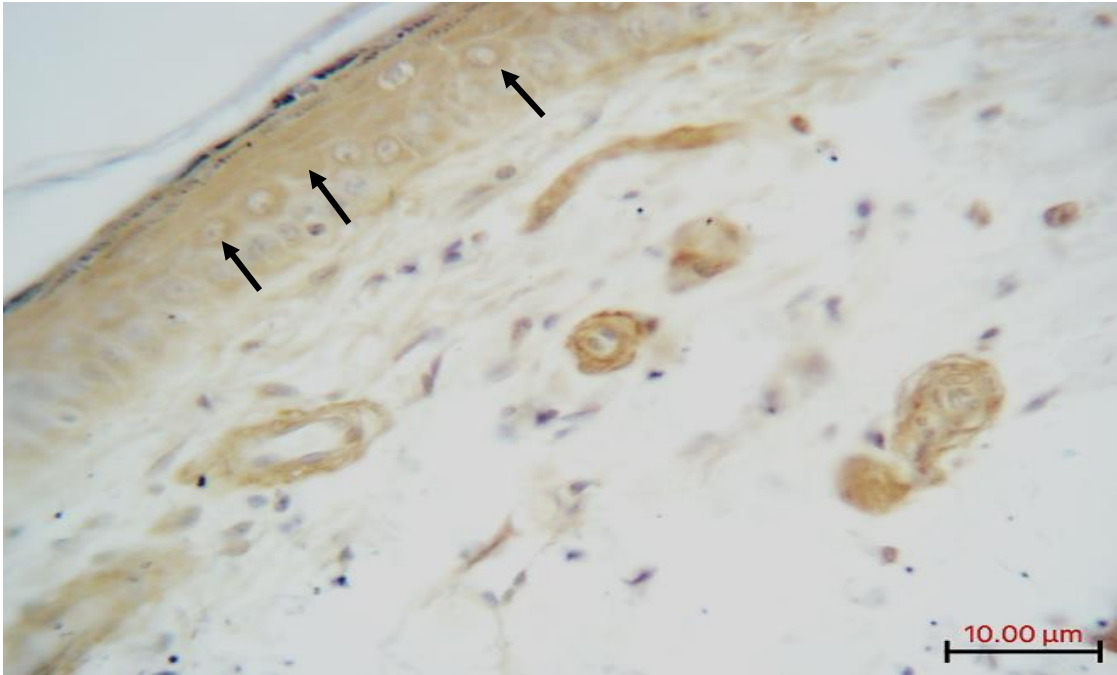


الشكل (4-24) الفحص الكيميائي النسيجي المناعي للكشف عن الانترلوكين-6 في النسيج في مجاميع الجروح غير الحيوية، يوضح الشكل عدم وجود تعبير للانترلوكين-6 في مجموعة الجروح غير الحيوية بعد الموت بعمر 360 دقيقة IHC μm 10.

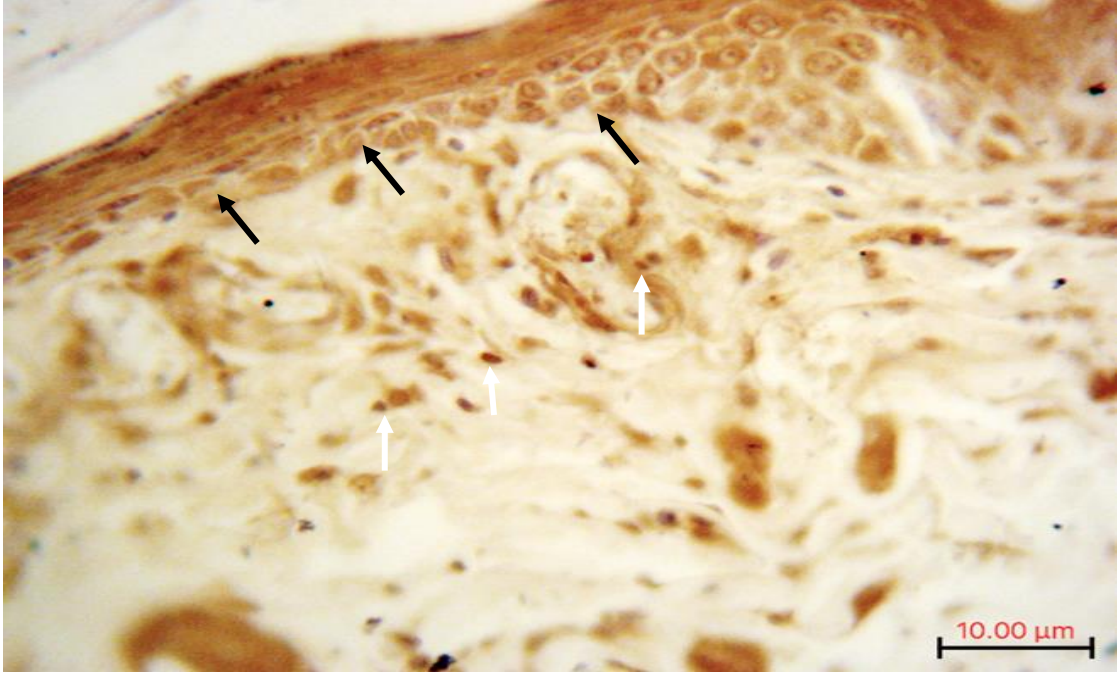
فيما كان التعبير عن عامل نخر الورم-الفا (TNF-a) مشابهاً للتعبير عن الانترلوكين-6، حيث لم يلاحظ أيّ تعبير في مجموعة السيطرة كما في الشكل (4-25)، فيما وجد تعبير ضعيف لعامل نخر الورم-الفا في مجموعة الجروح الحيوية للجلد بعمر 30 دقيقة كما في الشكل (4-26)، كما شوهدت أيضاً زيادة تدريجية لعامل نخر الورم الفا في مجموعة الجروح الحيوية بعمر 180 دقيقة ، حتى وصول أقصى حدّ لشدة التعبير عن السابتوكين في مجموعة الجروح الحيوية بعمر 360 دقيقة الشكل (4-27)، كما شوهد تعبير ضعيف جداً لعامل نخر الورم الفا في مجاميع الجروح غير الحيوية بعد الموت بعمر 30 و 180 دقيقة (4-28).



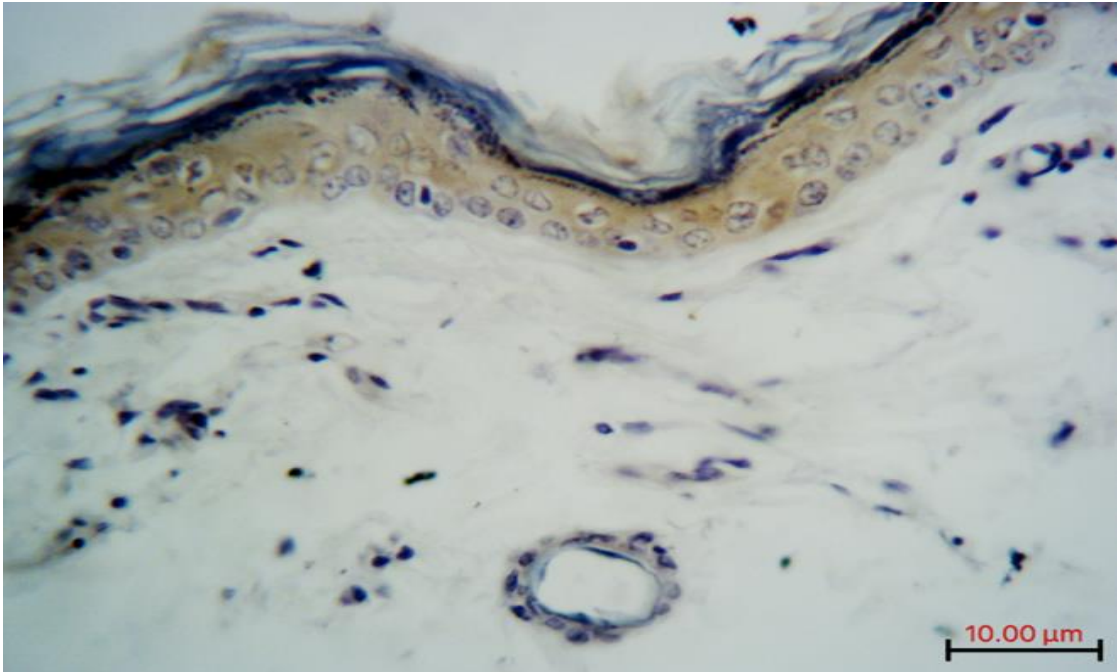
الشكل (4-25) الفحص الكيميائي النسيجي المناعي للكشف عامل نخر الورم ألفا في مجاميع الجروح الحيوية، يوضح الشكل عدم وجود تعبير عن عامل نخر الورم ألفا في مجموعة السيطرة بدون جروح 10 μm IHC.



الشكل (4-26) الفحص الكيميائي النسيجي المناعي للكشف عامل نخر الورم ألفا في مجاميع الجروح الحيوية، لوحظ تعبير متوسط لعامل نخر الورم ألفا في مجموعة الجروح الحيوية بعمر 30 دقيقة في خلايا طبقة البشرة للجلد (السهم الاسود) 10 μm IHC.



الشكل (4-27) الفحص الكيميائي النسجي المناعي للكشف عامل نخر الورم ألفا في مجاميع الجروح الحيوية، أظهر فحص مجموعة الجروح بعمر 360 دقيقة أعلى مستوى للتعبير عن عامل نخر الورم ألفا في خلايا البشرة (السهم الاسود) والخلايا الالتهابية في طبقة الأدمة (السهم الابيض) IHC $\mu\text{m}10$.



الشكل (4-28) الفحص الكيميائي النسجي المناعي للكشف عامل نخر الورم ألفا في مجاميع الجروح غير الحيوية، يلاحظ وجود تعبير ضعيف جداً لعامل نخر الورم ألفا في مجموعة الجروح غير الحيوية بعد الموت بعمر 30 دقيقة IHC $\mu\text{m}10$.

فيما أكد نظام التسجيل على أنه من الممكن تحديد عمر الجروح وحيويتها من خلال الاعتماد على العدد المتزايد للخلايا المعبرة عن البروتينات سي دي 15 و سي دي 68، حيث كان عدد الخلايا المعبرة عن البروتين سي دي 15 (خلية / الحقل) في الفترات الزمنية 30، 180، 360 دقيقة لجروح قبل الموت و على التوالي 5-9، 23-28، 50-70، مع عدم وجود خلايا معبرة عن البروتين 15 في مجاميع الجروح بعد الموت، فيما كان عدد الخلايا المعبرة عن البروتين سي دي 68 في الفترات الزمنية 30، 180، 360 لجروح قبل الموت 2-3، 3-7، 9، 20-22 خلية / للحقل على التوالي مع عدم وجود خلايا معبرة عن البروتين سي دي 68 في جميع الفترات الزمنية في مجاميع الجروح بعد الموت.

فيما كان التعبير عن السايبتوكينات (الانترلوكين-6 و عامل نخر الورم-الفا) ضعيفاً نسبياً في مجموعة الجروح قبل الموت بعمر 30 دقيقة مع وجود زيادة نسبية في التعبير عن السايبتوكينات في مجموعة الجروح قبل الموت بعمر 180 دقيقة وصولاً الى أعلى نسبة تمت ملاحظتها في مجموعة الجروح قبل الموت بعمر 360 دقيقة ، فيما رُصد وجود تعبير ضعيف جداً للسايبتوكينات في مجاميع الجروح بعد الموت التي شملت 30، 180 دقيقة بعد الموت، كما موضح في الجدول (1-4).

الجدول (1-4) شدة التعبير عن سي دي 15، سي دي 68، الانترلوكين-6 وعامل نخر الورم ألفا في مجاميع الجروح الجلدية قبل الموت وبعده.

المؤشر	الوقت	مجاميع الجروح قبل الموت	مجاميع الجروح بعد الموت
سي دي 15 (CD15)	30 دقيقة	1	0
	180 دقيقة	2	0
	360 دقيقة	3	0
سي دي 68 (CD68)	30 دقيقة	1	0
	180 دقيقة	1	0
	360 دقيقة	2	0
الانترلوكين-6 (IL_6)	30 دقيقة	1	1
	180 دقيقة	2	0
	360 دقيقة	3	0

1	1	30 دقيقة	عامل نخر الورم
1	2	180 دقيقة	الفا
0	3	360 دقيقة	(TNF-a)

شمل التعبير عن مؤشرات الخلايا الالتهابية بحسب التدرج الرقمي (0 = غير موجود)
 (1 = ضعيف > 10 خلية/حقل) (2 = متوسط > 30 خلية/حقل) (3 = قوي > 30
 خلية/حقل). تم الفحص باستخدام قوة تكبير عالية

فيما شمل التعبير عن السايٲوكينات و حسب التدرج الرقمي (0 = لا يوجد) (1 =
 ضعيف) (2 = متوسط) (3 = قوي)

الفصل الخامس

المناقشة

Discussion

1-5 العلامات النسجية المرضية للجروح المحدثة

يُعدّ تحديد عمر الجروح وحيويتها إحدى أهم القضايا الرئيسية والحاسمة لأخصائي الطب العدلي، فهناك حاجة مستمرة وضرورية لأخصائي علم الأمراض في تحديد الفترة الزمنية للجروح الحيوية والجروح غير الحيوية بشكل مناسب ودقيق (Uemura *et al.*, 2008). في الدراسات السابقة أكد الباحثون (Casse *et al.*, 2016) على أنه لا يمكن الاعتماد على الفحص المرضي النسجي في تحديد عمر الجروح وحيويتها وما إذا كانت قد حدثت قبل الموت أو بعده، ولاسيما في الدقائق والساعات الأولى من عمر الجرح، لم تتفق هذه الدراسة مع آراء الباحثين (Yu *et al.*, 2014) حيث اعتمدت هذه الدراسة على الخصائص و التغيرات المرضية النسجية الحاصلة في الجروح، لأنها طريقة يمكن من خلالها التعبير عن التغيرات الحاصلة واعتمادها كمؤشرات للجروح الحيوية من غير الحيوية، فضلاً عن تحديد المدّة الزمنية المنقضية للجروح، حيث تعدّ هذه الطريقة منخفضة التكاليف، بالإضافة إلى سهولة تطبيقها من خلال أخصائي علم الأمراض في الطب العدلي، ويمكن من خلال الفحص النسجي التمييز بين أنواع الخلايا المرتشحة ومتابعة هجرة الخلايا الحبيبية والتغيرات النسجية الحاصلة اثناء عملية التئام الجروح واستخدامها في عملية تحديد عمر الجروح وحيويتها (Grellner & Madea, 2007). وتعدّ عملية تحديد عمر الجروح وحيويتها مهمة ومطلوبة دائماً، وذلك لتوضيح العلاقة بين الجرح وسبب الموت، حيث تبدأ عملية التئام الجروح بعد الإصابة مباشرة وتتكون من ثلاث مراحل هي: الالتهابية، الانتشار، ومرحلة النضج (Cecchi, 2010). وأكد الباحثون (Sorg *et al.*, 2017). أنّ التفاعلات الحيوية للجروح تبدأ بعد الإصابة مباشرة والتي تتألف من سلسلة من التفاعلات المنظمة تنظيمياً جيداً.

حيث لوحظ في هذه الدراسة تباين في التغيرات المرضية النسجية في الجروح بين كل مجموعة من مجاميع الجروح الحيوية و مجاميع الجروح غير الحيوية، ففي مجموعة الجروح الحيوية بعمر 30 دقيقة امتازت بوجود استجابة حيوية ، فيما لم تلاحظ هذه الاستجابة في مجموعة الجروح غير الحيوية ، وتمثلت هذه الاستجابة الحيوية في الجروح الحيوية بوجود تجمع لخلايا الدم البيض على الجدران الداخلية للأوعية الدموية فضلاً عن احتقان و توسع في الأوعية الدموية والشعيرات الموجودة على حافة الجرح، وتشير هذه التغيرات المرضية النسجية الى إمكانية تمييز الجروح الحيوية عن الجروح غير الحيوية، وتعد هذه التفاعلات مهمة جداً في تحديد عمر الجروح . (Niedecker *et al.*, 2021)

وأشارت العديد من الدراسات إلى ان ارتشاح الخلايا الالتهابية يبدأ بعد وقت قصير من إحداث الجروح في جلد الجرذان الحية وذلك في الدقائق الأولى من المرحلة الالتهابية لعملية التئام الجروح وجاءت هذه الدراسة متفقة مع (Nishio *et al.*, 2008; Oehmichen *et al.*, 2001; Swift *et al.*, 2004). إذ لاحظت هذه الدراسة وجود تجمع للخلايا الالتهابية على السطح الداخلي لجدار الأوعية الدموية، فضلاً عن ارتشاح أعداد منها خارج الأوعية الدموية في منطقة الجرح في مجموعة الجروح الحيوية بعمر 60 دقيقة ، فيما لم يلاحظ وجود ارتشاح وتجمع للخلايا الالتهابية في مجموعة الجروح غير الحيوية بعمر 60 دقيقة، حيث اقتصرت التغيرات المرضية النسجية على وجود نزف دموي بالإضافة الى بدأ ظهور علامات التحلل الذاتي للنسيج التي لم تلاحظ في مجموعة الجروح بعمر 30 دقيقة بعد الموت.

فيما شهدت مجموعة الجروح الحيوية بعمر 180 دقيقة زيادة سريعة في أعداد الخلايا الالتهابية المرتشحة خارج الأوعية الدموية المتمثلة في بالعدلات بالإضافة الى تواجد أعداد قليلة من الخلايا البلعمية في المنطقة المصابة، ويمكن استخدام نسبة الخلايا الالتهابية المرتشحة المتمثلة بالعدلات والخلايا البلعمية في تحديد عمر الجروح الحيوية في الاوقات القصيرة (Eming *et al.*, 2007; Tarran *et al.*, 2006) .

واتفقت هذه الدراسة مع (Delavary *et al.*, 2011) حيث أشار إلى إمكانية ارتشاح الخلايا البلعمية في وقت مبكر 5-6 ساعات من عمر الجروح الحيوية و تبلغ ذروتها في اليوم الثاني من عمر الجروح. كما أشار الباحثون (Barrington *et al.*, 2018) إلى ان ارتشاح الخلايا البلعمية يبدأ في الساعة العاشرة من عمر الجروح الحيوية، ومع ذلك أظهرت هذه الدراسة تواجد أعداد قليلة من الخلايا البلعمية المرتشحة في الساعة الثالثة من عمر الجروح الحيوية،

وبالتالي فإن ارتشاح خلايا العدلات والخلايا البلعمية قد يسمح بتقدير عمر الجروح الحيوية خلال الساعات الأولى من عمر الإصابة، وفي الوقت ذاته اقتصررت التغيرات في الجروح المحدثة بعد الموت على وجود النزف، بالإضافة الى تنكس وتحلل ذاتي في النسيج تمثل بوجود وذمة فضلاً عن وجود تنكس فجوي في خلايا الغدد العرقية و خلايا الغدد الدهنية في نسيج الجلد.

وبعد مرور 360 دقيقة على عمر الجروح الحيوية شوهد ارتشاح كثيف للخلايا في جميع طبقات الجلد المتمثلة في البشر، الأدمة والطبقة الدهنية حيث اتفقت هذه الدراسة مع الدراسات السابقة في الفئران والخنازير (Randeberg et al., 2007; Takamiya et al., 2005). علاوة على ذلك لوحظ ازدياد في عدد الخلايا البلعمية المرتشحة في هذه المدة الزمنية في نسيج الجلد المجروح، حيث لاحظ الباحثان (Van der et al., 2001; Betz, 1994). تواجد الخلايا البلعمية في الساعة السابعة من عمر الجروح الحيوية، وفي المدة نفسها لمجموعة الجروح غير الحيوية لوحظ ازدياد التحلل الذاتي ليشمل جميع أجزاء الجلد وجاءت هذه النتائج مطابقة لنتائج الباحثين (Khalaf et al., 2019; Vinay et al., 2017).

إنّ تحديد عمر الجروح هو محطّ اهتمام أخصائي الطب العدلي، إذ يمكن استخدامه في الكشف عن القضايا الجنائية، لذلك اصبح التحليل المرضي النسيجي طريقة جيدة لتقييم عمر الجروح من خلال الحصول على النتائج في فترات زمنية قصيرة وبتكلفة منخفضة،

2-5 التحليل الكيميائي النسيجي المناعي للجروح المحدثة

إنّ تقدير عمر الجرح وحيويته يعد أحد أهمّ المهام في أبحاث الطب العدلي (Li et al., 2020). لذلك استعمل علماء الطب العدلي العديد من التقنيات في تحديد عمر الجروح، مثل علم الأمراض النسيجي و الأحياء الجزيئية و تقنية الكيمياء النسجية المناعية لحل هذه المشكلة في الطب العدلي (Ohshima, 2000). تم من خلال هذه الدراسة إجراء دراسة كيميائية نسيجية مناعية لتحديد عمر الجروح في أوقات مختلفة للتمييز بين الجروح الحيوية وغير الحيوية حيث استخدمت لفحص التعبير عن كل من مؤشرات الخلايا الالتهابية (سي دي 15، سي دي 68) و الوسائط الالتهابية (الانترلوكين-6، عامل نخر الورم الفا) في الجروح المحدثة في جلد الجرذان ومناقشة التوافر العملي لهذه المؤشرات. وتعدّ الكيمياء النسجية

المناعية من أكثر التقنيات استخداماً وذلك لسهولة تطبيقها على الأنسجة المظمورة بالبارافين، بالإضافة الى قدرتها على تحديد موقع ودرجة التعبير عن المؤشرات المراد الكشف عنها في النسيج (Bacci et al., 2014).

ويُعدّ سي دي 15 مؤشراً مهماً للخلايا العدلة والخلايا وحيدة النواة، حيث يمكن ملاحظتها على البطانة الداخلية للأوعية الدموية في الدقائق الأولى من المرحلة الالتهابية في عملية التئام الجروح (Hausmann et al., 1999). ويُسهم سي دي 15 في التصاق كريات الدم البيض من خلال تفاعله مع السلكتين selectin الموجود على البطانة الداخلية للأوعية الدموية (Lo et al., 1997).

وأشارت نتائج هذه الدراسة الى وجود الخلايا العدلة المعبرة عن سي دي 15 داخل الأوعية الدموية في الدقيقة 30 من عمر الجروح الحيوية، وتواجدها خارج الأوعية الدموية لتصل الى أعلى نسبة ارتشاح للخلايا العدلة المعبرة عن سي دي 15 في الدقيقة 360 من عمر الجروح الحيوية، فيما لم يلاحظ أيّ ارتشاح للخلايا المعبرة عن سي دي 15 في الجروح غير الحيوية (جروح بعد الموت)، وقد جاءت هذه النتائج مطابقة للدراسات السابقة للباحثين (Hausmann et al., 1999) الذين أشاروا الى تواجدها للخلايا العدلة المعبرة عن سي دي 15 في وقت مبكر من إصابة الدماغ. كما اشار الباحثون (Turillazzi et al., 2010) إلى تواجدها للخلايا المعبرة عن سي دي 15 في الجروح الجلدية الناتجة عن عملية الشق، فيما لم يلاحظ وجود خلايا معبرة في الجروح غير الحيوية، كذلك أكد الباحثين (Gauchotte et al., 2013) إنّ ارتشاح الخلايا المعبرة عن سي دي 15 يبدأ في الدقيقة التاسعة من عمر جرح الطعنة قبل الموت، فيما لم يلاحظ وجود للخلايا المعبرة عن سي دي 15 في جروح بعد الموت.

ويُعدّ سي دي 68 بروتيناً سكرياً تُعبّر عنه الخلايا البلعمية النسيجية مثل خلايا لانكرهانز والخلايا البلعمية التي تؤدي دوراً مهماً في العديد من الوظائف في عملية التئام الجروح، مثل الدفاع عن المضيف من الأجسام الغريبة وتعزيز الالتهاب وإزالة الخلايا التي تعاني من الموت المبرمج (Koh and DiPietro, 2011). وعلى الرغم من أنّ وظيفة سي دي 68 غير واضحة، إلا انها قد ترتبط بالتفاعلات الحيوية للخلايا (Kunisch et al., 2004). وأشارت نتائج الدراسة الى أن نسبة الخلايا البلعمية المرتشحة المعبرة عن سي دي 68 في

الدقيقة 360 من عمر الجروح الحيوية أعلى نسبياً من نسبة الخلايا المرتشحة في الدقيقة 180 من عمر الجروح الحيوية فيما لم يلاحظ وجود ارتشاح للخلايا المعبرة عن سي دي 68 في مجاميع الجروح غير الحيوية، ولم تتفق هذه النتائج مع الدراسات السابقة في تحديد عمر الجروح باستخدام سي دي 68 كمؤشر حيوي، حيث أشار الباحث (Yeh et al., 2010) إلى إمكانية ملاحظة ارتشاح الخلايا البلعمية المعبرة عن سي دي 68 في اليوم الثالث من عمر الجروح الحيوية، فيما لم يلاحظ وجود ارتشاح للخلايا المعبرة عن سي دي 68 في جميع مجاميع الجروح غير الحيوية لذلك يمكن استخدام هذه المؤشر للتمييز بين الجروح الحيوية والجروح غير الحيوية.

كذلك أشار الباحثون (O'Neill and Bowie, 2001) إلى ان السايبتوكينات تؤدي دوراً مهماً في عملية التئام الجروح، ولاسيما الانترلوكين-6 و عامل نخر الورم الفا والتي تلعب دوراً مهماً في المرحلة الالتهابية حيث تسهم في تكوين الأوعية الدموية الجديدة و تكوين الأنسجة الحبيبية، بالإضافة الى دورها في الجذب الكيميائي للخلايا الالتهابية، واعتمد العديد من الباحثين في الطب العدلي، ومنهم (Kondo et al., 2002) على استعمال هذه المواد البيولوجية لتحديد عمر الجروح وحيويتها من خلال الكشف عن تعبيرها في نسيج الجلد المجروح.

وأشارت نتائج هذه الدراسة إلى انه يمكن الاعتماد على كل من الانترلوكين-6 و عامل نخر الورم الفا كمؤشرات مهمة لتحديد حيوية الجروح المبكرة وتقدير المدة الزمنية المنقضية للجرح، حيث وجد أن التعبير عن الانترلوكين-6 وعامل نخر الورم الفا غير موجود في مجموعة السيطرة بدون جروح ، فيما لوحظ وجود تعبير للسايبتوكينات في الخلايا الكيراتينية في طبقة البشر، بالإضافة الى الخلايا الالتهابية المرتشحة في طبقة الأدمة في المناطق القريبة من الجرح في الجروح الحيوية بعمر 30 دقيقة، كما لوحظت زيادة في التعبير عن الانترلوكين-6 وعامل نخر الورم الفا في الجروح الحيوية بعمر 180 دقيقة، ليصل إلى أعلى نسبة تعبير في الدقيقة 360 من عمر الجروح الحيوية ، وجاءت هذه النتائج متفقة مع الباحثين (Elzahed et al., 2020) إذ اشاروا الى امكانية ملاحظة التعبير عن الانترلوكين-6 و عامل نخر الورم ألفا في طبقة البشرة والخلايا الالتهابية في المناطق القريبة للجروح الحيوية بعمر 30 دقيقة أو اقل ليزداد مستوى التعبير في الساعة الاولى من عمر الجرح حتى الساعة الثالثة من عمر الجروح الجلدية في الإنسان، كذلك اتفقت الدراسة مع الباحثين

(Birincioglu *et al.*, 2016) إذ وجد أنّ التعبير عن السايبتوكينات في المناطق غير المجروحة من جلد الانسان يكون ضعيف جداً ويعتبر نتيجة سلبية للتعبير عن السايبتوكينات، فيما لوحظ وجود زيادة نسبية للتعبير عن السايبتوكينات في الدقائق الاولى من عمر الجروح الحيوية وتستمر هذه الزيادة عن التعبير لعدة ساعات من عمر الجروح الحيوية، وخلصت هذه النتائج إلى إمكانية الاعتماد على الانترلوكين-6 و عامل نخر الورم الفا بمثابة مؤشرات مهمة في تحديد عمر الجروح الحيوية،

فيما رُصد تعبير ضعيف جداً للانترلوكين-6 وعامل نخر الورم الفا في مجاميع الجروح غير الحيوية و جاءت هذه النتائج متفقة مع الباحثين (Sun *et al.*, 2019) الذين أشاروا إلى أنّ التعبير الضعيف للسايبتوكينات في الجلد بدون جروح والجروح المحدثة بعد الموت يعد نتيجة سالبة للتعبير عن السايبتوكينات.

الفصل السادس

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions and Recommendation

1-6 الاستنتاجات Conclusions

1. تُعدّ الاستجابة الالتهابية المتمثل بارتشاح الخلايا الالتهابية مؤشراً مهماً للجروح الحيوية.
2. إنّ وجود النزف في النسيج لا يدل على حيوية الجروح، حيث وجد النزف الدموي في الجروح غير الحيوية أيضاً.
3. يبدأ ارتشاح خلايا العدلات في الدقائق الأولى من عمر الجرح، فيما تتواجد الخلايا البلعمية بعد عدة ساعات من عمر الجروح الحيوية.
4. يمكن للوسيطات الالتهابية (الانترلوكين-6، عامل نخر الورم ألفا) الاعتماد عليها بوصفها مؤشرات دقيقة في تحديد عمر الجروح المبكرة وحيويتها، ولاسيما في المرحلة الالتهابية من عملية التئام الجروح.
5. يمكن استخدام علامات الخلايا الالتهابية (سي دي 15، سي دي 68) في تحديد نوع الخلايا الالتهابية المشاركة في عملية التئام الجروح، واعتمادها كمؤشرات عالية الدقة في عملية تحديد عمر الجروح الحيوية وتمييزها عن الجروح غير الحيوية.

2-6 التوصيات Recommendations

- 1- ضرورة إجراء دراسات أكثر، للتحقق من هذه النتائج من خلال دراسة مجموعات أكبر وعينات مستقلة لغرض الموافقة على دقتها في الطب العدلي.
- 2- اجراء مزيد من الأبحاث والدراسات حول التغيرات النسيجية والتغيرات الكيميائية النسجية المناعية للجروح المستحدثة خلال فترات أطول ومواقع مختلفة من الجسم، لزيادة النتائج الأولية لهذه الدراسة.
- 3- اختيار انواع أخرى من السايبتوكينات، لإزالة الاختلافات التي من الممكن الكشف عنها في الجروح المستحدثة لاستخدام هذه التحليلات كدليل في المحكمة.
- 4- دراسة التغيرات العيانية للجروح المبكرة ومقارنتها بنتائج الدراسة النسجية المرضية و نتائج الكيمياء النسجية المناعية لمؤشرات محددة.
- 5- اجراء دراسات مستقبلية على انواع اخرى من الحيوانات المختبرية.

المصادر

References

- Al-Ghamdi, T.H. and Atta, I.S., 2020. Efficacy of interleukin-6 in the induction of liver cell proliferation after hemi-hepatectomy: histopathologic and immunohistochemical study. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 13(7), p.1540.
- Amisten, S., Neville, M., Hawkes, R., Persaud, S.J., Karpe, F. and Salehi, A., 2015. An atlas of G-protein coupled receptor expression and function in human subcutaneous adipose tissue. *Pharmacology & Therapeutics*, 146, pp.61-93.
- Bacci, S., Defraia, B., Cinci, L., Calosi, L., Guasti, D., Pieri, L., Lotti, V., Bonelli, A. and Romagnoli, P., 2014. Immunohistochemical analysis of dendritic cells in skin lesions: correlations with survival time. *Forensic science international*, 244, pp.179-185.
- Bancroft, J., Stevens, A. and Turner, D., 1996. *Theory and practice of histological techniques* 4th Ed Churchill Living Stone, New York Edinburgh. Madrid, Sanfrancisco, 20.
- Barington, K., Dich-Jørgensen, K. and Jensen, H.E., 2018. A porcine model for pathomorphological age assessment of surgically excised skin wounds. *Acta veterinaria scandinavica*, 60(1), pp.1-7.
- Berg, S., 1972. Die Altersbestimmung von Hautverletzungen. *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, 70(3), pp.121-135.
- Bergfeld, Wilma F. and Summers, Pamela. "laceration". *Encyclopedia Britannica*, 12 Feb. 2014

- Betz, P., 1994. Histological and enzyme histochemical parameters for the age estimation of human skin wounds. *International Journal of Legal Medicine*, 107(2), pp.60-68.
- Betz, P., 1995. Immunohistochemical parameters for the age estimation of human skin wounds. A review. *The American journal of forensic medicine and pathology*, 16(3), pp.203-209.
- Betz, P., Nerlich, A., Wilskel, J., Tübel, J., Wiest, I., Penning, R. and Eisenmenger, W., 1992. Immunohistochemical localization of fibronectin as a tool for the age determination of human skin wounds. *International journal of legal medicine*, 105(1), pp.21-26.
- Birincioğlu, İ., Akbaba, M., Alver, A., Kul, S., Özer, E., Turan, N., Şentürk, A. and İnce, İ., 2016. Determination of skin wound age by using cytokines as potential markers. *Journal of forensic and legal medicine*, 44, pp.14-19.
- Bolzinger, M.A., Briançon, S., Pelletier, J. and Chevalier, Y., 2012. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. *Current opinion in colloid & interface science*, 17(3), pp.156-165.
- Bonizzi, G. and Karin, M., 2004. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in immunology*, 25(6), pp.280-288.
- Brahme, A., 2014. *Comprehensive biomedical physics*. Newnes.
- Brooks, E., Simmons-Arnold, L., Naud, S., Evans, M.F. and Elhosseiny, A., 2009. Multinucleated giant cells' incidence, immune markers, and significance: a study of 172 cases of papillary thyroid carcinoma. *Head and neck pathology*, 3(2), pp.95-99.

- Brown, T.M. and Krishnamurthy, K., 2021. Histology, dermis. In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing.
- Cañedo-Dorantes, L. and Cañedo-Ayala, M., 2019. Skin acute wound healing: a comprehensive review. *International journal of inflammation*, 2019.
- Casse, J.M., Martrille, L., Vignaud, J.M. and Gauchotte, G., 2016. Skin wounds vitality markers in forensic pathology: an updated review. *Medicine, Science and the Law*, 56(2), pp.128-137.
- Cecchi, R., 2010. Estimating wound age: looking into the future. *International journal of legal medicine*, 124(6), pp.523-536.
- Chalaris, A., Garbers, C., Rabe, B., Rose-John, S. and Scheller, J., 2011. The soluble Interleukin 6 receptor: generation and role in inflammation and cancer. *European journal of cell biology*, 90(6-7), pp.484-494.
- Chistiakov, D. A., Killingsworth, M. C., Myasoedova, V. A., Orekhov, A. N., & Bobryshev, Y. V. (2017). CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Laboratory Investigation*, 97(1), 4-13.
- Civin, C.I., Mirro, J. and Banquerigo, M.L., 1981. My-1, new myeloid-specific antigen identified by a mouse monoclonal antibody.
- Conner, R., 1999. The "Year 2000" bug; OR storage; ultraviolet light use; wound classification. *AORN Journal*, 69(2), pp.438-439.
- Crosby, K., Simendinger, J., Grange, C., Ferrante, M., Bernier, T. and Stanen, C., 2014. Immunohistochemistry protocol for paraffin-embedded tissue sections-ADVERTISEMENT. *JoVE, Cambridge, MA*.

- De Siqueira, A., Cuevas, S.C., Salvagni, F.A. and Maiorka, P.C., 2016. Forensic veterinary pathology: sharp injuries in animals. *Veterinary pathology*, 53(5), pp.979-987
- Delavary, B.M., van der Veer, W.M., van Egmond, M., Niessen, F.B. and Beelen, R.H., 2011. Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology*, 216(7), pp.753-762.
- Dettmeyer, R.B., 2018. Vitality, injury age, determination of skin wound age, and fracture age. In *Forensic Histopathology* (pp. 241-263). Springer, Cham.
- Dinulos, J. G., Chapman, M. S., Werchniak, A. E., Barton, D. T., & Habif, T. P. (2019). *Dermatology DDX Deck E-Book*. Elsevier Health Sciences
- Dreifke, M.B., Jayasuriya, A.A. and Jayasuriya, A.C., 2015. Current wound healing procedures and potential care. *Materials Science and Engineering: C*, 48, pp.651-662.
- Eisenmenger, W., Nerlich, A. and Glück, G., 1988. Die Bedeutung des Kollagens bei der Wundaltersbestimmung. *Zeitschrift für Rechtsmedizin*, 100(2), pp.79-100.
- Elghetany, M.T., Ge, Y., Patel, J., Martinez, J. and Uhrova, H., 2004. Flow cytometric study of neutrophilic granulopoiesis in normal bone marrow using an expanded panel of antibodies: correlation with morphologic assessments. *Journal of clinical laboratory analysis*, 18(1), pp.36-41.
- Elzahed, E.S.E.D., Ahmed, S.M. and Alaa El-Din, E., 2020. Role of Interleukin 6 And Tumor Necrosis Factor Alpha In Determination Of Skin Wound Age In Human Cadavers: Histopathological And

- Immunohistochemical Study. Zagazig Journal of Forensic Medicine, 18(1), pp.92-107.
- Eming, S.A., Krieg, T. and Davidson, J.M., 2007. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(3), pp.514-525.
- Feldmann, M., 2002. Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Immunology*, 2(5), pp.364-371.
- Ferenbach, D. and Hughes, J., 2008. Macrophages and dendritic cells: what is the difference?. *Kidney international*, 74(1), pp.5-7.
- Fernandez, P., Bermejo, A.M., Lopez-Rivadulla, M. and Concheiro, L., 1994. Biochemical diagnosis of the intravital origin of skin wounds. *Forensic science international*, 68(2), pp.83-89.
- Fronczek, J., Lulf, R., Korkmaz, H.I., Witte, B.I., van de Goot, F.R., Begieneman, M.P., Krijnen, P.A., Rozendaal, L., Niessen, H.W. and Reijnders, U.J., 2015. Analysis of morphological characteristics and expression levels of extracellular matrix proteins in skin wounds to determine wound age in living subjects in forensic medicine. *Forensic science international*, 246, pp.86-91.
- Fronczek, J., Lulf, R., Korkmaz, H.I., Witte, B.I., van de Goot, F.R., Begieneman, M.P., Schalkwijk, C.G., Krijnen, P.A., Rozendaal, L., Niessen, H.W. and Reijnders, U.J., 2015. Analysis of inflammatory cells and mediators in skin wound biopsies to determine wound age in living subjects in forensic medicine. *Forensic Science International*, 247, pp.7-13.
- Fukube, S., Hayashi, T., Ishida, Y., Kamon, H., Kawaguchi, M., Kimura, A., & Kondo, T. (2008). Retrospective study on suicidal cases by

- sharp force injuries. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 15 (3), 163–7.
- Fukuda, M., 1991. Lysosomal membrane glycoproteins: structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *The Journal of biological chemistry (Print)*, 266(32), pp.21327-21330.
- Gantwerker, E.A. and Hom, D.B., 2012. Skin: histology and physiology of wound healing. *Clinics in plastic surgery*, 39(1), pp.85-97.
- Gauchotte, G., Wissler, M.P., Casse, J.M., Pujo, J., Minetti, C., Gisquet, H., Vigouroux, C., Plénat, F., Vignaud, J.M. and Martrille, L., 2013. FVIIIra, CD15, and tryptase performance in the diagnosis of skin stab wound vitality in forensic pathology. *International journal of legal medicine*, 127(5), pp.957-965.
- Gottfried, E., Kunz-Schughart, L.A., Weber, A., Rehli, M., Peuker, A., Müller, A., Kastenberger, M., Brockhoff, G., Andreesen, R. and Kreutz, M.(2008). Expression of CD68 in Non-Myeloid Cell Types. *Scandinavian Journal of Immunology*, 67: 453-463.
- Gougerot-Pocidallo, M., 2002. Human polymorphonuclear neutrophils. *Rev Fr Lab*, 340, pp.44-51.
- Green, E.M., Mansfield, J.C., Bell, J.S. and Winlove, C.P., 2014. The structure and micromechanics of elastic tissue. *Interface focus*, 4(2), p.20130058.
- Grellner, W. and Madea, B., 2007. Demands on scientific studies: vitality of wounds and wound age estimation. *Forensic science international*, 165(2-3), pp.150-154.

- Grellner, W., 2002. Time-dependent immunohistochemical detection of proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α) in human skin wounds. *Forensic science international*, 130(2-3), pp.90-96.
- Gupta, S., Manubhai, K.P., Kulkarni, V. and Srivastava, S., 2016. An overview of innovations and industrial solutions in Protein Microarray Technology. *Proteomics*, 16(8), pp.1297-1308.
- Hausmann, R., Kaiser, A., Lang, C., Bohnert, M. and Betz, P., 1999. A quantitative immunohistochemical study on the time-dependent course of acute inflammatory cellular response to human brain injury. *International journal of legal medicine*, 112(4), pp.227-232.
- Hieber, U. and Heim, M.E., 1994. Tumor necrosis factor for the treatment of malignancies. *Oncology*, 51(2), pp.142-153.
- Hunter, C.A. and Jones, S.A., 2015. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nature immunology*, 16(5), pp.448-457.
- Kang, S., Amagai, M., Bruckner, A., Enk, A., Margolis, D., McMichael, A. and Orringer, J., 2019. Trastornos psicossomáticos. *Fitzpatrick's Dermatology*.
- Kanitakis, J., 2002. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *European journal of dermatology*, 12(4), pp.390-401.
- Khalaf, A.A., Hassanen, E.I., Zaki, A.R., Tohamy, A.F. and Ibrahim, M.A., 2019. Histopathological, immunohistochemical, and molecular studies for determination of wound age and vitality in rats. *International Wound Journal*, 16(6), pp.1416-1425.
- Koh, T.J. and DiPietro, L.A., 2011. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert reviews in molecular medicine*, 13.

- Kolarsick, P.A., Kolarsick, M.A. and Goodwin, C., 2011. Anatomy and physiology of the skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association*, 3(4), pp.203-213.
- Kondo T., Ohshima T., Mori R., Guan D. W., Ohshima K. and Eisenmenger W. (2002): Immunohistochemical detection of chemokines in human skin wounds and its application to wound age determination. *International journal of legal medicine*, 116(2): 87.
- Kondo, T. and Ishida, Y., 2010. Molecular pathology of wound healing. *Forensic science international*, 203(1-3), pp.93-98.
- Kondo, T., 2007. Timing of skin wounds. *Legal Medicine*, 9(2), pp.109-114.
- Kondo, T., Tanaka, J., Ishida, Y., Mori, R., Takayasu, T. and Ohshima, T., 2002. Ubiquitin expression in skin wounds and its application to forensic wound age determination. *International journal of legal medicine*, 116(5), pp.267-272.
- Kothari, N., Bogra, J., Abbas, H., Kohli, M., Malik, A., Kothari, D., Srivastava, S. and Singh, P.K., 2013. Tumor necrosis factor gene polymorphism results in high TNF level in sepsis and septic shock. *Cytokine*, 61(2), pp.676-681.
- Kubo, H., Hayashi, T., Ago, K., Ago, M., Kanekura, T. and Ogata, M., 2014. Temporal expression of wound healing-related genes in skin burn injury. *Legal medicine*, 16(1), pp.8-13.
- Kunisch, E., Fuhrmann, R., Roth, A., Winter, R., Lungershausen, W. and Kinne, R.W., 2004. Macrophage specificity of three anti-CD68 monoclonal antibodies (KP1, EBM11, and PGM1) widely used for

- immunohistochemistry and flow cytometry. *Annals of the rheumatic diseases*, 63(7), pp.774-784.
- Langlois, N.E., 2007. The science behind the quest to determine the age of bruises—a review of the English language literature. *Forensic science, medicine, and pathology*, 3(4), pp.241-251.
- Li, L., 2012. Forensic pathology. In *Injury Research* (pp. 89-109). Springer, Boston, MA
- Li, N., Du, Q., Bai, R. and Sun, J., 2020. Vitality and wound-age estimation in forensic pathology: review and future prospects. *Forensic sciences research*, 5(1), pp.15-24.
- Lindquist, C.D., Evans, J.J. and Wictum, E.J., 2011. Developmental validation of feline, bovine, equine, and cervid quantitative PCR assays. *Journal of forensic sciences*, 56, pp.S29-S35.
- Lo, S.K., Golenbock, D.T., Sass, P.M., Maskati, A., Xu, H. and Silverstein, R.L., 1997. Engagement of the Lewis X antigen (CD15) results in monocyte activation. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 89(1), pp.307-314.
- Luna LG: *Histopathologic Methods and Color Atlas of Special Stains and Tissue Artifacts*. American HistoLabs, Inc., Gaithersburg, MD, 1992
- Luna, L.G., 1968. *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*.
- Ma, W.X., Yu, T.S., Fan, Y.Y., Zhang, S.T., Ren, P., Wang, S.B., Zhao, R., Pi, J.B. and Guan, D.W., 2011. Time-dependent expression and distribution of monoacylglycerol lipase during the skin-incised

- wound healing in mice. *International journal of legal medicine*, 125(4), pp.549-558.
- Maeno, Y., Takabe, F., Inoue, H. and Iwasa, M., 1990. A study on the vital reaction in wounded skin: simultaneous determination of histamine and polyamines in injured rat skin by high-performance liquid chromatography. *Forensic science international*, 46(3), pp.255-268.
- Majdan, M., Rusnak, M., Rehorcikova, V., Brazinova, A., Leitgeb, J. and Mauritz, W., 2015. Epidemiology and patterns of transport-related fatalities in Austria 1980–2012. *Traffic injury prevention*, 16(5), pp.450-455.
- Mao, S., Fu, F., Dong, X. and Wang, Z., 2011. Supplementary pathway for vitality of wounds and wound age estimation in bruises using the electric impedance spectroscopy technique. *Journal of forensic sciences*, 56(4), pp.925-929.
- Mori, R., Tanaka, K. and Shimokawa, I., 2018. Identification and functional analysis of inflammation-related miRNAs in skin wound repair. *Development, Growth & Differentiation*, 60(6), pp.306-315.
- Moss, M.L., Jin, S.L.C., Milla, M.E., Bickett, D.M., Burkhart, W., Carter, H.L., Chen, W.J., William, C., Didsbury, J.R., Hassler, D. and Hoffman, C.R., 1997. Erratum: Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- α . *Nature*, 386(6626), pp.738-738.
- Murphrey, M.B., Miao, J.H. and Zito, P.M., 2018. Histology, stratum corneum.

- Nakayama, F., Nishihara, S., Iwasaki, H., Kudo, T., Okubo, R., Kaneko, M., Nakamura, M., Karube, M., Sasaki, K. and Narimatsu, H., 2001. CD15 expression in mature granulocytes is determined by α 1, 3-fucosyltransferase IX, but in promyelocytes and monocytes by α 1, 3-fucosyltransferase IV. *Journal of Biological Chemistry*, 276(19), pp.16100-16106.
- Neri, M., Frati, A., Turillazzi, E., Cantatore, S., Cipolloni, L., Di Paolo, M., Frati, P., La Russa, R., Maiese, A., Scopetti, M. and Santurro, A., 2018. Immunohistochemical evaluation of aquaporin-4 and its correlation with CD68, IBA-1, HIF-1 α , GFAP, and CD15 expressions in fatal traumatic brain injury. *International journal of molecular sciences*, 19(11), p.3544.
- Niedecker, A., Huhn, R., Ritz-Timme, S. and Mayer, F., 2021. Complex challenges of estimating the age and vitality of muscle wounds: a study with matrix metalloproteinases and their inhibitors on animal and human tissue samples. *International journal of legal medicine*, 135(5), pp.1843-1853.
- Nishikai-Yan Shen, T., Kanazawa, S., Kado, M., Okada, K., Luo, L., Hayashi, A., Mizuno, H. and Tanaka, R., 2017. Interleukin-6 stimulates Akt and p38 MAPK phosphorylation and fibroblast migration in non-diabetic but not diabetic mice. *PloS one*, 12(5), p.e0178232.
- Nishio, N., Okawa, Y., Sakurai, H. and Isobe, K.I., 2008. Neutrophil depletion delays wound repair in aged mice. *Age*, 30(1), pp.11-19.
- Oehmichen, M., 2004. Vitality and time course of wounds. *Forensic science international*, 144(2-3), pp.221-231.

- Ohshima, T., 2000. Forensic wound examination. *Forensic science international*, 113(1-3), pp.153-164.
- O'Neill, L.A. and Bowie, A. eds., 2001. *Interleukin protocols*. Humana Press.
- Pasparakis, M., Alexopoulou, L., Episkopou, V. and Kollias, G., 1996. Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *The Journal of experimental medicine*, 184(4), pp.1397-1411.
- Peel, M., Hughes, J. and Payne-James, J.J., 2003. Postinflammatory hyperpigmentation following torture. *Journal of Clinical Forensic Medicine*, 10(3), pp.193-196.
- Peyron, P.A., Colomb, S., Becas, D., Adriansen, A., Gauchotte, G., Tiers, L., Marin, G., Lehmann, S., Baccino, E., Delaby, C. and Hirtz, C., 2021. Cytokines as new biomarkers of skin wound vitality. *International Journal of Legal Medicine*, 135(6), pp.2537-2545.
- Polson CJ, Gee DJ and Knight B. *The Essentials of Forensic Medicine*. 4th ed. Oxford: Pergamon Press, 1985; pp.125-127..
- Prahlow, J. A., Ross, K. F., Lene, W. J., & Kirby, D. B. (2001). Accidental sharp force injury fatalities. *American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 22 (4), 358–66.
- Prost-Squarcioni, C., Fraitag, S., Heller, M. and Boehm, N., 2008, January. Functional histology of dermis. In *Annales de dermatologie et de venereologie* (Vol. 135, No. 1 Pt 2, pp. 1S5-20).

- Randeberg, L.L., Winnem, A.M., Langlois, N.E., Larsen, E.L., Haaverstad, R., Skallerud, B., Haugen, O.A. and Svaasand, L.O., 2007. Skin changes following minor trauma. *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery*, 39(5), pp.403-413.
- Richardson, A. C. (1994). Cutaneous manifestations of abuse. In R. M. Reece (Ed.), *Child abuse: Medical diagnosis and management* (pp. 167–184). Philadelphia: Lea & Febiger
- Ritsu, M., Kawakami, K., Kanno, E., Tanno, H., Ishii, K., Imai, Y., Maruyama, R. and Tachi, M., 2017. Critical role of tumor necrosis factor- α in the early process of wound healing in skin. *Journal of Dermatology & Dermatologic Surgery*, 21(1), pp.14-19.
- Riviello, R.J. and Rozzi, H.V., 2018. Know the legal requirements when caring for sexual assault victims. *ACEP Now*, 37(11).
- Robson, M.C., 1997. Wound infection: a failure of wound healing caused by an imbalance of bacteria. *Surgical Clinics of North America*, 77(3), pp.637-650.
- Robson, M.C., Steed, D.L. and Franz, M.G., 2001. Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Current problems in surgery*, 38(2), pp.72-140.
- Rocchi, A., Chiti, E., Maiese, A., Turillazzi, E. and Spinetti, I., 2020. MicroRNAs: an update of applications in forensic science. *Diagnostics*, 11(1), p.32.
- Rodrigues, M., Kosaric, N., Bonham, C.A. and Gurtner, G.C., 2019. Wound healing: a cellular perspective. *Physiological reviews*, 99(1), pp.665-706.

- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D. and Rose-John, S., 2011. The pro-and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813(5), pp.878-888.
- Schwartz, A.J. and Ricci, L.R., 1996. How accurately can bruises be aged in abused children? Literature review and synthesis. *Pediatrics*, 97(2), pp.254-257.
- Sharma, M., Khajja, B.S., Hainendra, J.H.A., Mathur, G.K. and Mathur, V.N., 2011. Forensic interpretation of injuries/wounds found on the human body.
- Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*. 1999 Sep 2;341(10):738-46. doi: 10.1056/NEJM199909023411006
- Slominski, A.T., Zmijewski, M.A., Plonka, P.M., Szaflarski, J.P. and Paus, R., How ultraviolet light touches the brain and endocrine system through skin, and why. *Endocrinology*.
- Sorg, H., Tilkorn, D.J., Hager, S. and Hauser, J., 2017. Mirastschijski UJESR. Skin wound healing: an update on the current knowledge and concepts. *Eur Surg Res*, 58(1-2), pp.81-94.
- Stienstra, R., Dijk, W., van Beek, L., Jansen, H., Heemskerk, M., Houtkooper, R.H., Denis, S., van Harmelen, V., Willems van Dijk, K., Tack, C.J. and Kersten, S., 2014. Mannose-binding lectin is required for the effective clearance of apoptotic cells by adipose tissue macrophages during obesity. *Diabetes*, 63(12), pp.4143-4153.
- Sun, J.H., Nan, L.H., Gao, C.R. and Wang, Y.Y., 2012. Validation of reference genes for estimating wound age in contused rat skeletal

- muscle by quantitative real-time PCR. *International Journal of Legal Medicine*, 126(1), pp.113-120.
- Sun, J.H., Zhu, X.Y., Li, S.Q., Dong, T.N. and Du, Q.X., 2019. Measuring temporal expression, systematic response, and post-mortem stability to assess potential markers for estimating wound age: an example of *Fos11* in contused skeletal muscle. *Australian Journal of Forensic Sciences*, 51(2), pp.158-170.
- Swift, M.E., 2001. Burns AL, Gray KL, DiPietro LA. Age-related alterations in the inflammatory response to dermal injury. *J Invest Dermatol*, 11, pp.1027-1035.
- Takamiya, M., Fujita, S., Saigusa, K. and Aoki, Y., 2008. Simultaneous detection of eight cytokines in human dermal wounds with a multiplex bead-based immunoassay for wound age estimation. *International journal of legal medicine*, 122(2), pp.143-148.
- Takamiya, M., Saigusa, K., Kumagai, R., Nakayashiki, N. and Aoki, Y., 2005. Studies on mRNA expression of tissue-type plasminogen activator in bruises for wound age estimation. *International journal of legal medicine*, 119(1), pp.16-21.
- Tarran, S., Langlois, N.E., Dziewulski, P. and Szynda, T., 2006. Using the inflammatory cell infiltrate to estimate the age of human burn wounds: a review and immunohistochemical study. *Medicine, science and the law*, 46(2), pp.115-126.
- Turillazzi, E., Vacchiano, G., Luna Maldonado, A., Neri, M., Pomara, C., Rabozzi, R., Riezzo, I. and Fineschi, V., 2010. Tryptase, CD15 and IL-15 as reliable markers for the determination of soft and hard ligature marks vitality. *Histology and histopathology*.

- Uciechowski, P. and Dempke, W.C., 2020. Interleukin-6: a masterplayer in the cytokine network. *Oncology*, 98(3), pp.131-137.
- Uemura, K., Shintani-Ishida, K., Saka, K., Nakajima, M., Ikegaya, H., Kikuchi, Y. and Yoshida, K.I., 2008. Biochemical blood markers and sampling sites in forensic autopsy. *Journal of forensic and legal medicine*, 15(5), pp.312-317.
- Van de Goot FR, Korkmaz HI, Fronczek J, Witte BI, Visser R, Ulrich MM, Begieneman MP, Rozendaal L, Krijnen PA, Niessen HW. A new method to determine wound age in early vital skin injuries: a probability scoring system using expression levels of Fibronectin, CD62p and Factor VIII in wound hemorrhage. *Forensic Sci Int*. 2014 Nov;244:128-35. doi: 10.1016/j.forsciint.2014.08.015
- van der Laan, N., de Leij, L. and ten Duis, H.J., 2001. Local cellular inflammation as a result of elective standardized vascular surgery. *Acta histochemica*, 103(2), pp.139-149.
- Vinay, J., Harish, S., Mangala, G.S. and Hugar, B.S., 2017. A study on postmortem wound dating by gross and histopathological examination of abrasions. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 38(2), p.167.
- Wajant, H., 2009. The role of TNF in cancer. *Death Receptors and Cognate Ligands in Cancer*, pp.1-15.
- Wang, Y., Yamamoto, Y., Kuninaka, Y., Kondo, T. and Furukawa, F., 2015. Forensic Potential of MMP s and CC Chemokines for Wound Age Determination. *Journal of forensic sciences*, 60(6), pp.1511-1515.

- Warren, H.S., Altin, J.G., Waldron, J.C., Kinnear, B.F. and Parish, C.R., 1996. A carbohydrate structure associated with CD15 (Lewis x) on myeloid cells is a novel ligand for human CD2. *The Journal of Immunology*, 156(8), pp.2866-2873.
- Werner, S. and Grose, R., 2003. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological reviews*, 83(3), pp.835-870.
- Wright, H.L., Cross, A.L., Edwards, S.W. and Moots, R.J., 2014. Effects of IL-6 and IL-6 blockade on neutrophil function in vitro and in vivo. *Rheumatology*, 53(7), pp.1321-1331.
- Wu, C.Y., Huo, J.P., Zhang, X.K., Zhang, Y.J., Hu, W.M., Yang, P., Lu, J.B., Zhang, Z.L. and Cao, Y., 2017. Loss of CD15 expression in clear cell renal cell carcinoma is correlated with worse prognosis in Chinese patients. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 47(12), pp.1182-1188.
- Yadav, N., Parveen, S., Chakravarty, S. and Banerjee, M., 2019. Skin anatomy and morphology. In *Skin Aging & Cancer* (pp. 1-10). Springer, Singapore.
- Yang, R., Yang, S., Zhao, J., Hu, X., Chen, X., Wang, J., Xie, J. and Xiong, K., 2020. Progress in studies of epidermal stem cells and their application in skin tissue engineering. *Stem cell research & therapy*, 11(1), pp.1-13.
- Yeh, J.T., Yeh, L.K., Jung, S.M., Chang, T.J., Wu, H.H., Shiu, T.F., Liu, C.Y., Kao, W.Y. and Chu, P.H., 2010. Impaired skin wound healing in lumican null mice. *British Journal of Dermatology*, 163(6), pp.1174-1180.

- Yousef, H., Alhajj, M. and Sharma, S., 2017. Anatomy, skin (integument), epidermis.
- Yu, T.S., Guan, D.W., Zhao, R., Zhang, H.D. and Bai, R.F., 2014. Correlation between percentages of PMN, MNC, FBC and wound age after skeletal muscle injury in rats. *Fa yi xue za zhi*, 30(3), pp.166-168.
- Yu-Chuan, C., Bing-Jie, H., Qing-Song, Y. and Jia-Zhen, Z., 1995. Diagnostic value of ions as markers for differentiating antemortem from postmortem wounds. *Forensic science international*, 75(2-3), pp.157-161.
- Zaidi, Z. and Lanigan, S.W., 2010. Skin: structure and function. In *Dermatology in Clinical Practice* (pp. 1-15). Springer, London.
- <https://silkspa.wordpress.com/2016/10/25/the-5-skin-layers>
- <https://thesciencyfellow.wordpress.com/2016/08/04/fun-fact-7/skin-structure/>

Abstract

Determination of wound age and vitality is a critical problem in forensic medicine, where specialists rely on it to return to the crime scene and find the offender by identifying the time period of the wounds and determining their vitality if they occur before or after death. In this study, we planned to assess the histopathological changes in the experimental incisional wounds along the different periods of time related with ante-mortem or post-mortem times during the first minutes and hours. In addition, to find out the correlation between the degree of expression of inflammatory cells markers (CD15, CD68) and inflammatory mediators marker (IL-6, TNF- α) and the times of wounds in ante-mortem and post-mortem in rats.

Thirty-nine rats wound skin biopsies were studied.. Linear wounds were inflicted on the rats' skin, and samples were obtained after each group's time period expired and maintained in the 10% Neutral Buffered Formalin for histopathological evaluation and immunohistochemical examination. samples were taken in ante-mortem groups at the ages of 30, 60, 180, and 360 min and in post-mortem groups within 30, 60, 180, and 360 min with control samples (unwounded group)

The histopathological examination of the wound groups prior to death revealed vital reactions such as bleeding, congestion, and expansion of the diameter of blood vessels near the wound site. For the ante-mortem wounds in all time intervals examined, the number of neutrophil and macrophage in the wound was shown. neutrophil appeared at 30 min and sharply increased from 60 min until 360 minutes of the wound. In addition, there was an increased in macrophages from 180 min after the wound. The histopathological changes in wounds after death were restricted to hemorrhage, with symptoms of autolysis shown 180 minutes beyond the wounds' lifetime.

Immunohistochemical results showed that the number of stained cells with CD15 were significantly expressed in all time intervals of ante-mortem compare with post-mortem wounds. CD15-positive neutrophils were expressed in ante-mortem wound with a minimum interval time of 30 min. In addition, the ratio of CD15-positive neutrophils after 360 min from injury considerably exceeded those after 30 and 180 min from injury. Immunohistochemical results showed that the number of CD68-positive macrophages began at 30 minutes in ante-mortem wound, but very few began to increase at 180 minutes and reached the highest level at 360 minutes. Because the negative expression of CD15 and CD68 in all post-mortem groups, they could be a marker for comparing between the ant-mortem and post-mortem wounds.

Furthermore, the Immunoreactive findings of the current study showed that inflammatory mediators (IL-6 and TNF- α) were not expressed in unwounded skin samples and the periods after the induction wound produced an increase in the expression area of both markers. The earliest expression of both inflammatory mediators was noticed in 30 min ante-mortem wound time whereas the reactivity increased at 180 min and peaked at 360min. In this study, the expression of IL-6 and TNF- α were negative or low in areas far from wound margin in ante-mortem wounds, unwounded specimens and the post-mortem wounds.

This study suggests that it is feasible to use histopathological examination to estimate the age and vitality of the wound based on the appearance of inflammatory cells in the wound, which is an essential biomarker of vital wounds. In addition, immunohistochemical testing may be used to identify the levels of expression of inflammatory mediators and inflammatory cell markers, which can then be used to estimate the age and vitality of the wounds.

University of Mosul
College of Veterinary Medicine



**Evaluation of biological changes in rat skin
wounds and its use in wound age
estimation: Histopathological and
immunohistochemical study**

Mohammed Adnan Mohammed Saleh

M.Sc. / Thesis

Veterinary Medicine / Veterinary Pathology

Supervised by

Assist. Prof. Dr. Waseem Hanna Karoomi Al-Jameel

2022 A.D.

1444 A.H.

**Evaluation of biological changes in rat skin
wounds and its use in wound age
estimation: Histopathological and
immunohistochemical study**

A thesis submitted

By

Mohammed Adnan Mohammed Saleh

To

The Council of the College of Veterinary Medicine

University of Mosul

In

Partial Fulfillment of the Requirements

For the degree of Master of Science

In

Veterinary Medicine / Veterinary Pathology

Supervised by

Assist. Prof. Dr. Waseem Hanna Karoomi Al-Jameel

2022 A.D.

1444 A.H.

