

DERLEME / REVIEW ARTICLE

doi: 10.17986/blm.2016323753

Yara Yaşı ve Canlılık Değerlendirmesinde Güncel Yaklaşım The Current Approach to Determine Wound Age and Vitality

Işıl Pakiç

Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi

Adli Tıp Anabilim Dalı, İstanbul

Özet

Yara yaşı ve canlılık değerlendirilmesi adli tıbbın temel alanlarından biridir. Yaralanmanın kişi canlı iken mi, öldükten sonra mı oluştuğu adli tıbbın önemli sorunlarından biridir. Kesici ya da künt travmalar, yanıklar, boğulmalar gibi travmatik olgularda travma ile ilişkiyi sağlar. Canlılık kanıtlanırsa bu travmanın kişi yaşarken olduğunun kanıtıdır. Literatürde yara yaşı tahmini ve canlılık ile ilgili yapılmış çok sayıda araştırma bulunsa da yapılacak çok sayıda araştırmaya ve araştırmalardan elde edilen bilginin günlük uygulamalara aktarılmasına ihtiyaç vardır. Çalışmada amaç yara yaşı ve canlılık değerlendirmesinde güncel uygulamalar ışığında kullanılan yöntem ve maddeleri adli tıp pratiği açısından değerlendirmektir.

Anahtar Kelimeler: Yara yaşı; Canlılık; Adli patoloji.

Abstract

Research on vitality and wound age estimation are the classic fields in forensic medicine. Vitality as one of the basic issues in forensic practice deals with the question, whether injuries were caused during lifetime of an individual. It plays a role in connection with traumatic deaths due to sharp and blunt force injuries, burns or drowning. In relation to the vitality of wounds it must be asserted that an injury of the body was caused during lifetime. In spite of large literature data there is still considerable demand of further research and practical transfer of knowledge and techniques to daily casework. The study aims to classify current methods and materials used in evaluation of wound age and viability and determine their practical application in forensic medicine.

Keywords: Wound Age; Vitality; Forensic Pathology.

1. Giriş

Adli tıp uygulamalarının ana konularından biri olan yaralar, kişiler canlı iken, ölüm sırasında ve ölüm sonrası gelişebilmektedir. Yaralanmanın kişi canlı iken mi, öldükten sonra mı oluştuğu adli tıbbın önemli sorunlarından biridir. Kesici ya da künt travmalar, yanıklar, boğulmalar gibi travmatik olgularda canlılığın gösterilmesi travma ile ilişki sağlar. Canlılık kanıtlanırsa bu travmanın kişi yaşarken olduğunun kanıtıdır (1,2).

Travma ile ölüm arasındaki geçen sürenin belirlenmesi yani yara yaşı tayini de adli tıbbın temel çalışma alanlarından biridir. Bu süre dakikalardan aylara hatta yıllara uzayabilmektedir. Çok erken dönemlerde yara yaşı tayini canlılıkla eş değerdir. Travmadan sonraki ilk 30 dakikadaki değişimler hem canlılık bulgusu, hem de yara iyileşmesinin işaretleri olarak kabul edilebilir. En zor soru

ölümden hemen önce ya da hemen sonra oluşan yaraların ayrımıdır (1).

Ölüm olgularında olduğu gibi yaşayan olgularda da yara yaşının değerlendirilmesi adli tıp çalışma alanının içindedir. Travma sonucu gelişen yaralarda travma ile oluşan zarar arasındaki nedenselliğin saptanmasında yara yaşı değerlendirilmesi yapılmaktadır. Özellikle şiddet olgularında farklı yaşlardaki yaraların varlığının saptanması, olayın sürekliliğini gösterme açısından da önemlidir.

Yara yaşı tahmini olay yerinin yeniden yapılandırılmasında da önemli bilgiler sağlar (3).

Literatürde yara yaşı tahmini ve canlılık ile ilgili yapılmış çok sayıda araştırma bulunsa da yapılacak çok sayıda araştırmaya ve araştırmalardan elde edilen bilginin günlük uygulamalara aktarılmasına ihtiyaç vardır (2). Bu alandaki çalışmaların çoğu cilt örneklerinde ve keskin cisimlerle olan yaralanmalarda yapılmıştır (1).

2. Yara Oluşumu ve Yara İyileşmesi

Yara dokunun morfolojik ve fonksiyonel yapısının devamlılığının bozulmasıdır. Travma yaşam sırasında vi-

Sorumlu Yazar: Doç.Dr. Işıl Pakiç

Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi

Adli Tıp Anabilim Dalı, İstanbul

E-posta: isilpakis@gmail.com

Geliş: 20.08.2015 Düzeltme: 25.11.2015 Kabul: 02.12.2015

tal reaksiyonları tetikler. Ancak ölümden sonra bu durum görülmez (2).

Yara iyileşmesi sürecinde 3 tip reaksiyon görülür:

1-Kan hücresi reaksiyonu: Yara oluşumundan sonra kan hücreleri (nötrofiller, monositler ve lenfositler) yara yerine göç ederler. Kesici aletler ya da künt travmatik yaralar ciltte yırtık, zedelenme ve kan damarı yırtılmasına neden olabilir. Kan hücreleri perivasküler alanda asidik bir ortamda toplanırlar. İlk erken vital reaksiyon nötrofil göçüdür. Çoğu olguda 1-2 saatte görülür. Nötrofillerden sekonder doku zararına yol açan serbest radikaller salgılanır. İkinci kan hücre reaksiyonu monosit göçü ve monositlerin makrofajlara dönüşümüdür. Makrofajlar çöpçü görevi görür ve travmadan 7 saat sonra görülürler. 1-2 günde pik yaparlar. Bu hücreler fagosite ettiği hücre tipine göre de, lipofaj, eritrofaj, siderofaj, myelofaj şeklinde adlandırılırlar.

2-Biyokimyasal reaksiyon: Yaralanma sonrası çok erken dönemde proteinler biokimyasal yöntemlerle ölçülebilir. Pek çok molekül partikülü lökosit, fibroblast, trombosit, makrofaj ve mast hücreleri gibi inflamatuvar hücrelerden salgılanır. Biogenik aminler olan histamin, serotonin yanısıra sitokin, kemokin (kemotaktik sitokinler) ve adezyon molekülleri salgılanır (4).

3-Fokal doku reaksiyonu: Kollagen salgılayan fibroblastlar, endotelial hücreler ve organ spesifik hücrelerin proliferasyonu ile fokal doku reaksiyonu gelişir. Yaşam süresi uzadıkça epidermal hücre proliferasyonunun da gösterilebileceği belirtilmiştir. İntrasellüler olarak fibroblastlar tarafından salgılanan farklı kollagen tipleri yara iyileşmesinin değişik dönemlerinde görülmektedir (2). Bu tanımlanan süreç steril bir yara iyileşmesindeki süreçtir.

3. Yara iyileşmesi dönemleri

Yara iyileşmesi yara oluşumundan hemen sonra başlamakta ve üç fazdan oluşmaktadır: İnflamasyon, proliferasyon, maturasyon (5,6,7).

İnflamatuvar faz sürecinde yara bölgesinde trombosit kümeleşmesinin ardından, nötrofil, makrofaj ve T lenfositleri yara bölgesine gelmektedir.

Proliferatif fazda onarım amacıyla yeniden epiteliyasyon ve yeni oluşan granülasyon dokusu yara alanını doldurmaya başlar. Bu dönemde angiogenezis granülasyon dokusunun sürdürülebilmesi için gereklidir. İleri düzey biyolojik hücre çalışmaları pek çok sitokin, büyüme faktörü, ve proteazların yara iyileşmesi sürecinde etkin olduğunu göstermiştir. Kollagen sentezi de bu dönemde görülmektedir (6,7). Maturasyon döneminde sentez edilen kollagen yeniden düzenlenmektedir. Matris metalloproteazlar tarafından yıkılmakta, kollagen yapımı ve

yıkımı arasında denge oluşmaktadır.

Bu süreçte sırayla ortaya çıkan değişik hücreler, proteinler ve mediatörler kimyasal, immunhistokimyasal ve moleküler biyolojik yöntemler kullanılarak gösterilmektedir. Bu yöntemler kullanılarak yara iyileşmesi sürecindeki maddelerin belirlenmesi, yara yaşı değerlendirilmesinde adli tıp pratiğinde rutin değerlendirme yöntemlerine ile birlikte kullanılarak uygulamaya yansıtılabilir (8).

4. Yara iyileşmesi sürecinde yer alan maddeler

Kollagenler: Kollagenler derinin başlıca ekstrasellüler komponentidir. Proliferatif faz boyunca salgılanan kollagen alt tipleri nekrotik dokunun yerini almaktadır. Bunlar immun histokimyasal yöntemlerle gösterilebilir. Betz ve ark. değişik kollagen tiplerinin immunhistokimyasal yöntemle incelenmesine dayalı çeşitli çalışmalar yapmıştır (Tablo 1) (9,10,11,12).

Tablo 1: Yara yaşı ve ekstrasellüler matris elemanları.

Markerlar	En erken	Ortalama	En geç
Fibronektin	10-20 dk	4 saat	aylar
Kollagen III	2-3gün	6 gün	aylar
Kollagen V	3 gün	6 gün	aylar
Kollagen VI	3 gün	6 gün	aylar
Kollagen I	5 gün	6 gün	aylar

Fibroblast, Myofibroblastlar: Bu hücreler granülasyon dokusu oluşumunda etkindir. Betz ve ark. (13) insanda travmatik cilt yaralarından alınan biyopsi örneklerinde immunhistokimyasal yöntemle alfa-SMA ve desmin uygulayarak granülasyon dokusu oluşumundaki hücre tipi ve zamanını değerlendirmiştir. 5 günden önceki deri örneklerinde granülasyon dokusu saptamadıkları ve alfa-SMA pozitif miyofibroblastik hücre bulunmadığını bildirmişlerdir. Miyofibroblastlar ilk olarak travma sonrası 5. günde görülmüştür. Bu alfa-SMA pozitif miyofibroblastların bazı olgularda 2 aya kadar görüldüğü bildirilmiştir.

Wang ve ark. (3) yara yaşı değerlendirmesinde fibroblasttan miyofibroblast, fibrositten miyofibroblast transformasyon oranlarını araştırmıştır. Fibroblast-miyofibroblast transformasyonunun en yüksek oranda 7-10 günde görüldüğü, fibrositlerin ilk olarak 3 günde saptandığı, fibrosit-miyofibroblast transformasyonunun da en yüksek oranda 10.günde görüldüğünü saptamıştır. Bunların kombinasyonlarının yara yaşı değerlendirmesinde kullanılabileceğini vurgulamışlardır.

Fibronektin: Fibronektin kanda ve çeşitli dokularda bulunan çok fonksiyonlu bir hücre adezyon proteindir. Yapılan çalışmalarda birkaç dakikadan fazla yaşayan olgularda fibronektinin canlılık tespitinde kullanılabileceği belirtilmiştir (14). Ancak Grellner postmortem yaralanmada da domuz derisinde fibronektin pozitif reaksiyonu göstermiştir (15).

Adezyon Molekülleri: Yara iyileşmesinin inflamatuvar döneminde nötrofil gibi lökositler ve makrofajlar da yara bölgesinde toplanırlar. Lökositlerin göçü için, lökositlerle endotel hücreleri arasındaki etkileşim en önemli olaydır (5,6). Bu etkileşim adezyon molekülleri aracılığı ile sağlanır. Dressler ve ark (Tablo 2) adezyon moleküllerinin yara yaşı değerlendirmesinde hassas markerlar olduğunu vurgulamışlardır (16,17,18). Örneğin P-Selektin güçlü immunpozitif reaksiyon şeklinde en erken 3 dk. da görülmekte ve yaralanmadan 7 saat sonraya kadar görülebilmektedir.

Tablo 2: Yara yaşı ve adezyon molekülleri.

Markerlar	En erken	En geç
P-selektin	3 dk	7 saat
E-Selektin	1 saat	17 gün
ICAM-1	1.5 saat	3.5 gün
VCAM-1	3 saat	3.5 gün

İnflamatuvar Sitokinler: Aktive olmuş lenfositler ve makrofajlar başta olmak üzere, birçok hücreden sentezlenen sitokinler çok fonksiyonlu glikoproteinlerdir. IL-1, IL-6, TNF- alfa proinflamatuvar sitokinlerdir. Bunlar ter bezlerinde ve keratinositlerde hasarlı olmayan ciltte de tespit edilmiştir (19). Farelerin kullanıldığı deneysel çalışmalarda yara bölgesinde pro-inflamatuvar sitokinler tarafından düzenlenen protein ve mRNA seviyelerinin belirlenmesinin, yara yaşı değerlendirmesinde kullanılması önerilmiştir (19,20,21,22). İnflamatuvar sitokinler ile ilgili yapılmış çalışmalar Tablo 3’de özetlenmiştir (23).

Tablo 3: İnflamatuvar sitokinler ve yara yaşı.

Markerlar	%	Yara yaşı
IL-1 α	>30	4 saat-1gün
IL-8	>50	1-4 gün
MCP-1	>30	1-7 gün
MIP-1 α	>40	1-9 gün
VEGF	>50	7-14 gün
Ubiquitin	>30	7-21 gün
c-Fos	>20	>1 gün
c-Jun	>10	>1 gün

Kemokinler: Lökositlerin yara bölgesine göçü kemokinler adı verilen kemotaktik sitokinler aracılığı ile düzenlenmektedir. IL-8,/CXCL8’in nötrofil, T lenfosit, keratinositlere karşı kemotaktik aktivitesi bulunmakta ve aynı zamanda da epidermal proliferasyona etkisi bulunmaktadır. MCP-1/CCL2 ve MIP-1 α öncelikle makrofajların yara bölgesine göçünde etkilidir. Yara yaşı değerlendirilmesinde 3 kemokinin birlikte kullanılmasının objektivite ve doğruluğu artırıcı faktör olduğu vurgulanmıştır (4, 23, 24, 25, 26, 27).

Angiogenetik sitokinler: Yara iyileşmesinde proliferatif dönemde yeni granülasyon dokusu oluşur. Burada angiogenez temel olaydır (5,6). VEGF ve bFGF güçlü angiogenetik faktörlerdir. Takayami ve ark. fare derisinde VEGF ve bFGF’ün zamanla ilişkili ekspresyonunu göstererek yara yaşı değerlendirmesinde bu markerların yararlı olduğunu vurgulamışlardır (28,29). Hayashi (30) VEGF’ün makrofaj ve fibroblastlardan eksprese edildiğini göstermiştir. Bu çalışmada morfolometrik analizle VEGF’nin %50 üzerinde gösterilmesinin yara iyileşme sürecinde 7-21 güne karşılık geldiğini saptamışlardır.

Transforming büyüme faktörü (TGF): TGF-alfa ve TGF-beta 1 yara iyileşmesinde rol alırlar. TGF-alfa EGF ‘ü uyararak epidermal hücre proliferasyonunu sağlarken, TGF-beta 1 kuvvetli bir fibrogenik büyüme faktörüdür ve kollagen lifleri gibi ekstrasellüler makriks depolanması için gereklidir (5,6). Yara iyileşmesi sürecinde TGF- alfa ve TGF- beta 1’in ilk bir saatte eksprese edildiği gösterilmiştir. Bu da hem canlılık ham de yara yaşı değerlendirilmesinde kullanılabileceklerini göstermektedir (31).

Stres proteinleri: Ubiquitin ısı şok protein ailesinden bir protein olup, hipertermi, kimyasal ve mekanik strese hızla ortaya çıkar. Yara yaşı değerlendirilmesinde proliferatif fazda daha etkin olduğu gösterilmiştir. %30 ekspresyonunun yara iyileşme sürecinin 7-14 günler arasına denk geldiği gösterilmiştir (32).

Yara İyileşmesini etkileyen faktörler lokal ve sistemik olarak iki grupta incelenebilir (1).

Lokal faktörler

- Travmanın tipi ve ağırlığı
- Lokalizasyonu
- Yaygınlığı
- Dokunun tipi
- Isı
- Sirkülasyon

Sistemik Faktörler

- Heredite
- Yaş
- Cins
- Beslenme durumu

- Hastalıklar
- Endokrinopati
- Metabolik bozukluklar

Eksojen

- İlaçlar

5. Yaranın canlılığı ve yara yaşı değerlendirilmesinde kullanılan yöntemler (1)

Hüresel Yapıların Değerlendirilmesi

Rutin histoloji

Özel boyama yöntemleri

➤ Protein/antijenlerin Değerlendirilmesi

İmmunhistokimya

Biyokimyasal yöntemler

➤ mRNA

İnsitu hibridizasyon

RT-PCR

Rutin histoloji ve özel boyalar: Bu yöntemlerle hücre tipleri ve dokunun yapısı değerlendirilir, lökosit, makrofaj veya fibroblastlar kolaylıkla görülür. Konnektif doku ve siderofajlar için histokimyasal boyalar kullanılabilir. Bu yöntemler diğer incelemelere uygun vakaları seçmek için ön inceleme yöntemidir (1).

Enzim histokimyasal yöntemler: Enzim aktivitesi inflammatuar hücre infiltrasyonundan önce görülür. En erken 1 saatte adenzin trifosfataz görülür. Adenzin trifosfataz, esteraz, aminopeptidaz, asit fosfataz, alkalifosfataz gibi enzimler erken dönem lezyonları tanımak amaçlı kullanılır, ancak çok güvenilir değildir, travmadan saatler sonra bile negatif olgular bildirilmiştir (1).

Biyokimyasal yöntemler: Vücut sıvıları ve dokularından bakılabilir, ELISA gibi immünolojik testler yapılır. Bu yöntemle proinflammatuar sitokinler analiz edilebilir (33).

İmmunhistokimya: Dokudaki antijenle dışarıdan verilen antikorun reaksiyonu esasına dayanır, literatüre bakıldığında fibronektin ve tenaskin, kollagenler gibi ekstrasellüler matriks proteinleri, P-selektin, E-selektin, ICAM, VCAM gibi adezyon molekülleri, TGF- α , TGF- β 1 gibi büyüme faktörleri, IL-1 α , IL- β gibi proinflammatuar sitokinler bu yöntemle en çok araştırılan maddelerdir (33,34,35,36). Bu çalışmaların büyük kısmı hayvan deneyleri ve otopsi materyalinde yapılmıştır. Fronczek ve ark. yaşayan kişilerden yara bölgesinden alınan yüzeysel deri biopsi materyallerinde inflammatuar hücreleri (MPO, CD45, CD68) ve inflammatuar mediatörleri (MIP-1, IL-8, CML, vitronektin) değerlendirilerek yara yaşı değerlendirmesinde kullanılabilir bir skorlama sistemi önermişlerdir (37,38). Yagi ve ark (2016) ise transmembran

proteini olan ve inflammatuar hücrelerden sentezlenen CD14'ün erken dönem yara iyileşmesinde (1-5) etkin olduğu, en yüksek seviyeyi 12-24 saatte yaptığını saptamıştır (39). Van de Goot ve ark ise (2014) erken dönem markerlardan olan fibronektin, CD62p ve faktör 8'i immunhistokimyasal yöntemle belirleyip bir skorlama sistemi oluşturmuştur. Bu çalışmada vitalite bulgusu saptanmayan, birkaç dakika ve 15-30 dakikadaki yara yaşını doğru olarak saptadıklarını belirtmişlerdir (40). Literatürde yara yaşı değerlendirmesinde ilgili moleküllerin yerini belirleme ve uygulama kolaylığı açısından en değerli yöntem olarak immunhistokimya işaret edilmektedir (41).

Moleküler patolojik yöntemler: Son yıllarda yara yaşı değerlendirilmesinde RNA'yı inceleyen çalışmalar yapılmaktadır (42). Erken dönemde M-RNA seviyesi de saptanabilmekte, insitu hibridizasyon ve RT-PCR gibi moleküler biyolojik teknikler bu amaçla kullanılmaktadır (43,44). İnflamatuar sitokinler için RT-PCR ve in-situ hibridizasyon teknikleri ile mRNA ekspresyonları gösterilebilmektedir. Bu yöntem ile IL-6'nın 6 saat, IL-1 α ve IL-1 β ile TNF- α 'nın 48-72 saat arasında artmış ekspresyonu gösterilmiştir. Tüm sitokin ekspresyonlarında 240 saat sonra normale dönüş gözlemlendiği belirtilmiştir (45,46). IL-10 ekspresyonunun 0-180 dakika arasında artış gösterdiği ve postmortem ilk 5 günde kullanılabilirliği bildirilmektedir (45,47) Takamaya ve ark. ise doku plazminojen aktivatörü (tPA) ve fibroblast büyüme faktörü (bFGF)'nin mRNA ekspresyonlarına dayanarak yara yaşı tespitine yönelik çalışmalar yapmışlardır (48,49). Farelerde çeşitli genlerde mRNA analizine yönelik çalışmalarda c-fos, fos-B ve MKP-1'in erken dönemlerde yara yaşı tayininde yararlı olabileceği bulunmuştur (50,51). Literatürde RNA'nın en büyük üstünlüğünün zamana bağlı olarak eksprese edilebilmesi olduğu, bu şekilde yara yaşı tahmininde güvenli sonuçlar elde edilmesini sağladığı bildirilmektedir. (52)

6. Çalışmalarda Kullanılan Olgu Materyeli

Yapılan çalışmalarda hayvan deneyleri, yaşayan kişilerden doku örnekleri ve otopsi materyeli kullanılmıştır (1).

A-Hayvan deneyleri: Bu deneylerin avantajı kontrolü olarak çalışılmasıdır. Posttravmatik süreyi standardize ederek inceleme yapılabilir. Genellikle ardışık biopsiler alınmaktadır. Yaş, lezyonun yeri ve ölüm nedeni gibi faktörler sorun oluşturmamaktadır. Ancak çıkan sonuçların insana uyarlanmasında sorunlar olabilmektedir. Hayvanların küçük olması ve yara iyileşme süreçlerinin daha hızlı olması nedeni ile insandaki iyileşme sürecinden farklı sonuçlar elde edilebilmektedir.

B-İnsan doku örnekleri:

a. Canlı kişilerden alınan doku örnekleri: Yaşayan kişilerden cerrahi sırasında örnek alınabilir. İnsan örnekleri olması nedeni ile avantajlıdır. Ancak kişide hayatı tehdit eden hemorajik şok veya solunum yetmezliği gibi faktörler yoksa sonuçlar gerçeği yansıtmayabilir (1).

b. Otopside alınan doku örnekleri: Otopsi örnekleri gerçeği en yüksek oranda yansıtır. Kişi yaşamını tehdit eden ağır bir olay sonucu ölmüştür. Yaşam sırasındaki stres, solunum yetmezliği ve hemorajik şok gibi durumların etkisi değerlendirilebilir. Otopsi çalışmalarındaki en önemli problem çürümenin varlığıdır. Bu, yara yaşının doğru olarak tespit edilmesini engeller. Bu nedenle çalışmalarda olgu grubu çok dikkatli seçilmelidir (1,53). Otopsi çalışmalarında dikkat edilmesi gereken diğer önemli faktörler; yara yaşının kesin bilindiği bir kontrol grubunun bulunması, çalışma grubunda farklı zamanlarda ki yaraların değerlendirilmesi ve bunların istatistiksel değerlendirme için yeterli sayıda olması, aynı zamanda yara bölgesi dışından alınan örneklerin de parametreler açısından değerlendirilmesidir. Ayrıca canlılık çalışmaları agonal yaralanmaları ve erken postmortem yaralanmaları da kapsamalıdır (36,53).

7. Sonuç

Yara yaşı ve canlılık bulgularının saptanması adli tıp uygulamalarında büyük bir öneme sahiptir. Adli tıp uygulamalarında yara iyileşme süreci dakikalardan aylara, hatta yıllara uzayan dönemlerde görülebilir. Yukarıda tanımlanan birçok maddenin yara iyileşme sürecinin değişik dönemlerinde etkin olduğu ortaya konulmuştur. Uygulamada makroskobik değerlendirme ve rutin histopatolojik yöntemler diğer değerlendirmeleri yapabilmek için bir ön inceleme yöntemi olarak ele alınmalıdır. Bunlardan elde edilen bulgular doğrultusunda seçilecek immünhistokimyasal ve moleküler yöntemler belirlenmelidir. Özellikle travma sonrası ilk dakikalar ve saatlerde rutin histopatolojik yöntemler premortem ya da postmortem yaralanmanın ayırımını yapamamaktadır. Bu nedenle immünhistokimyasal yöntemlerle süreçte etken maddelerin gösterilmesi değerlendirilmede yol gösterici olacaktır. Yapılan literatür değerlendirmesinde immünhistokimyasal yöntemlerin kolay uygulama ve moleküllerin saptanması açısından en kullanışlı yöntem olduğu vurgulanmıştır. Moleküler yöntemlere yönelik araştırmalar da her geçen gün artan sayılarda yapılmaktadır. Bu yöntemlerin uygulamada kullanımını önümüzdeki günlerde bu alana daha katkı sağlayacaktır.

Kaynaklar

1. Grellner W, Madea B. Demands on scientific studies: vitality of wounds and wound age estimation. *Forensic Sci Int*. 2007;17;165 (2-3):150-4.
2. Oehmichen M. Vitality and time course of wounds. *Forensic Sci Int* 2004 :10;144(2-3):221-31.
3. Wang LL, Zhao R, Liu CS, Liu M, Li SS, Li JY, Jiang SK, Zhang M, Tian ZL, Wang M, Zhang MZ, Guan DW. A fundamental study on the dynamics of multiple biomarkers in mouse excisional wounds for wound age estimation. *J Forensic Leg Med* 2016;39:138-46.
4. Hernández-Cueto C1, Girela E, Sweet DJ. Advances in the diagnosis of wound vitality: a review. *Am J Forensic Med Pathol*. 2000;21(1):21-31.
5. Kondo T. Timing of skin wounds. *Leg Med (Tokyo)*. 2007 ;9(2):109-14.
6. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999; 2;341(10):738-46.
7. Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 1997;4;276(5309):75-81.
8. Pakiş I, Kaya EA. Adli Tıp Uygulamalarında Yara Yaşı ve Canlılık Bulgularının Değerlendirilmesi. *Adli Tıp Dergisi* 2011; 25(2):137-152.
9. Betz P, Nerlich A, Wilske J, Tübel J, Penning R, Eisenmenger W. Analysis of the immunohistochemical localization of collagen type III and V for the time-estimation of human skin wounds. *Int J Legal Med* 1993;105(6):329-32,
10. Betz P, Nerlich A, Wilske J, Tübel J, Penning R, Eisenmenger W. Immunohistochemical localization of collagen types I and VI in human skin wounds. *Int J Legal Med* 1993;106(1):31-4.
11. Betz P, Nerlich A, Wilske J, Tübel J, Wiest I, Penning R, Eisenmenger W. The time-dependent rearrangement of the epithelial basement membrane in human skin wounds-immunohistochemical localization of collagen IV and VII. *Int J Legal Med* 1992;105(2):93-7.
12. Betz P, Nerlich A, Wilske J, Tübel J, Wiest I, Penning R, Eisenmenger W. Time-dependent pericellular expression of collagen type IV, laminin, and heparan sulfate proteoglycan in myofibroblasts. *Int J Legal Med*1992;105(3):169-72.
13. Betz P1, Nerlich A, Wilske J, Tübel J, Penning R, Eisenmenger W. Time-dependent appearance of myofibroblasts in granulation tissue of human skin wounds. *Int J Legal Med*. 1992;105(2):99-103.
14. Betz P1, Nerlich A, Wilske J, Tübel J, Wiest I, Penning R, Eisenmenger W. Immunohistochemical localization of fibronectin as a tool for the age determination of human skin wounds. *Int J Legal Med*. 1992;105(1):21-6.
15. Grellner W, Dimmeler S, Madea B. Immunohistochemical detection of fibronectin in postmortem incised wounds of porcine skin. *Forensic Sci Int*. 1998; 9;97(2-3):109-16.
16. Dressler J, Bachmann L, Koch R, Müller E. Estimation of wound age and VCAM-1 in human skin. *Int J Legal Med* 1999;112(3):159-62.
17. Dressler J, Bachmann L, Koch R, Müller E. Enhanced expression of selectins in human skin wounds. *Int J Legal Med* 1999;112(1):39-44.
18. Dressler J, Bachmann L, Kasper M, Hauck JG, Müller E. Time dependence of the expression of ICAM-1 (CD 54) in human skin wounds. *Int J Legal Med*. 1997;110(6):299-304.
19. Kondo T, Ohshima T. The dynamics of inflammatory cytokines in the healing process of mouse skin wound: a preliminary study for possible wound age determination. *Int J Legal Med* 1996;108(5):231-6.

20. Ishida Y, Kondo T, Takayasu T, Iwakura Y, Mukaida N. The essential involvement of cross-talk between IFN-gamma and TGF-beta in the skin wound-healing process. *J Immunol* 2004;1;172(3):1848-55.
21. Mori R, Kondo T, Ohshima T, Ishida Y, Mukaida N. Accelerated wound healing in tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice with reduced leukocyte infiltration. *FASEB J.* 2002; 16(9):963-74.
22. Lin ZQ, Kondo T, Ishida Y, Takayasu T, Mukaida N. Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. *J Leukoc Biol.* 2003;73(6):713-21.
23. Kondo T, Ohshima T, Eisenmenger W. Immunohistochemical and morphometrical study on the temporal expression of interleukin-1alpha (IL-1alpha) in human skin wounds for forensic wound age determination. *Int J Legal Med.* 1999;112(4):249-52.
24. Matsushima K, Oppenheim JJ. Interleukin 8 and MCAF: novel inflammatory cytokines inducible by IL-1 and TNF. *Cytokine* 1989;1:2-13.
25. Michel G, Kemeny L, Peter RU, Beetz A, Reid C, Arenberger P, et al. Interleukin-8 receptor-mediated chemotaxis of normal human epidermal cells. *FEBS Lett* 1992;305:241-3
26. Larsen CG, Anderson AO, Appella E, Oppenheim JJ, Matsushima K. The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. *Science* 1989;243:1464-6
27. Kondo T, Ohshima T, Mori R, Guan DW, Ohshima K, Eisenmenger W. Immunohistochemical detection of chemokines in human skin wounds and its application to wound age determination. *Int J Legal Med* 2002;116:87-91.
28. Takamiya M, Saigusa K, Nakayashiki N, Aoki Y. Studies on mRNA expression of basic fibroblast growth factor in wound healing for wound age determination. *Int J Legal Med* 2003;117:46-50.
29. Takamiya M, Saigusa K, Aoki Y. Immunohistochemical study of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor expression for age determination of cutaneous wounds. *Am J Forensic Med Pathol* 2002;23:264-7.
30. Hayashi T, Ishida Y, Kimura A, Takayasu T, Eisenmenger W, Kondo T. Forensic application of VEGF expression to skin wound age determination. *Int J Legal Med* 2004;118:320-5.
31. Grellner W, Vieler S, Madea B. Transforming growth factors (TGFalpha and TGF-beta1) in the determination of vitality and wound age: immunohistochemical study on human skin wounds. *Forensic Sci Int* 2005;153:174-80.
32. Kondo T, Tanaka J, Ishida Y, Mori R, Takayasu T, Ohshima T. Ubiquitin expression in skin wounds and its application to forensic wound age determination. *Int J Legal Med* 2002;116:267-72.
33. Grellner W, Georg T, Wilske J. Quantitative analysis of proinflammatory cytokines (IL-1beta, IL-6, TNF-alpha) in human skin wounds. *Forensic Sci Int* 2000;11;113(1-3):251-64.
34. Hsu SM, Raine L, Fanger H. A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am J Clin Pathol* 1981;75(5):734-8.
35. Cordell JL, Falini B, Erber WN, Gosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, Pulford KAF, Stein H, and Mason DY. Immunoenzymatic labelling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 1984; 32: 219-229
36. Grellner W. Time-dependent immunohistochemical detection of proinflammatory cytokines (IL-1beta, IL-6, TNF-alpha) in human skin wounds. *Forensic Sci Int* 2002;4;130(2-3):90-6.
37. Fronczek J, Lulf R, Korkmaz HI, Witte BI, van de Goot FR, Begieneman MP, Schalkwijk CG, Krijnen PA, Rozendaal L, Niessen HW, Reijnders UJ. Analysis of inflammatory cells and mediators in skin wound biopsies to determine wound age in living subjects in forensic medicine. *Forensic Sci Int* 2015;247:7-13.
38. Fronczek J, Lulf R, Korkmaz HI, Witte BI, van de Goot FR, Begieneman MP, Krijnen PA, Rozendaal L, Niessen HW, Reijnders UJ. 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 Sci Int* 2015; 246:86-91.
39. Yagi Y, Murase T, Kagawa S, Tsuruya S, Nakahara A, Yamamoto T, Umehara T, Ikematsu K. Immunohistochemical detection of CD14 and combined assessment with CD32B and CD68 for wound age estimation. *Forensic Sci Int* 2016; 4;262:113-120.
40. 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;244:128-35
41. Casse JM, Martrille L, Vignaud JM, Gauchotte G. Skin wounds vitality markers in forensic pathology: An updated review. *Med Sci Law.* 2015;21. pii: 0025802415590175.
42. Bauer M. RNA in forensic science. *Forensic Sci Int Genet* 2007;1(1):69-74.
43. Maeda H, Ishikawa T, Michiue T. Forensic molecular pathology: its impacts on routine work, education and training. *Leg Med (Tokyo).* 2014;16(2):61-9,
44. Kondo T, Ishida Y. Molecular pathology of wound healing. *Forensic Sci Int* 2010;15;203(1-3):93-8
45. Ohshima T. Forensic Wound Examination. *Forensic Sci Int* 2000;113:153-164.
46. Sato Y, Ohshima T. The expression of mRNA of proinflammatory cytokines during skin wound healing in mice: a preliminary study for forensic wound age estimation (II). *Int J Legal Med* 2000;113(3):140-5.
47. Takamiya M, Fujita S, Saigusa K, Aoki Y. A study on mRNA expressions of interleukin 10 during fracture healing for wound age determination. *Leg Med (Tokyo).* 2008;10(3):131-7.
48. Takamiya M, Saigusa K, Nakayashiki N, Aoki Y. Studies on mRNA expression of basic fibroblast growth factor in wound healing for wound age determination. *Int J Legal Med.* 2003;117(1):46-50.
49. Takamiya M, Saigusa K, Kumagai R, Nakayashiki N, Aoki Y. Studies on mRNA expression of tissue-type plasminogen activator in bruises for wound age estimation. *Int J Legal Med.* 2005;119(1):16-21.
50. Kagawa S, Matsuo A, Yagi Y, Ikematsu K, Tsuda R, Nakasono I. The time-course analysis of gene expression during wound healing in mouse skin. *Leg Med (Tokyo).* 2009;11(2):70-75.
51. Sun JH, Wang YY, Zhang L, Gao CR, Zhang LZ, Guo Z. Time-dependent expression of skeletal muscle troponin I mRNA in the contused skeletal muscle of rats: a possible marker for wound age estimation. *Int J Legal Med.* 2010 ;124(1):27-33.
52. Açıkgöz NH, Kılınçarslan LE, Açıkgöz A, Bilge Y. Yara Yaşı Tahmininde RNA'nın Kullanımı. *Türkiye Kinikleri J Foren Med* 2012;9(1):37-41.
53. Wolfgang G, Burkhard M. Demands on scientific studies: Vitality of wounds and wound age estimation, *Forensic Sci Int.* 2007;17;165(2-3):150-154.