

Research Article

Analysis of Fibronectin and TGF- β 1 Immunoexpression to Determination of Wound Vitality in Wistar Rats (*Rattus Norvegicus*)

Nita Novita, Hasrayati Agustina, Bethy S. Hernowo, Abdul H. Hassan

*Pathology Anatomy Department
Faculty of Medicine Padjadjaran University/Hasan Sadikin Hospital Bandung
Jl. Pasteur No. 38 Bandung 40161 Indonesia
Email: ade_nov97@yahoo.com*

Abstract

Wound examination is indispensable in forensic practice. The scientific field of wound age determination has advanced progressively during recent years. The purpose of this study was to determine the differences of fibronectin and TGF- β 1 expression in both antemortem and postmortem wounds. This study was an experimental with completely randomized design. The skin wounds (vital and postmortem) were taken from forty Wistar rats and divided into 10 groups of rats. Immunohistochemical staining was performed to determine the differences between antemortem and postmortem wounds. The result showed that in 30 minutes after antemortem wound infliction, all of samples showed weak reactivity for fibronectin and TGF- β 1 (100%). In first hour after wound infliction, 3 samples (75%) showed weakly positive and 1 sample (25%) strongly positive for fibronectin and TGF- β 1. In 2 hour after wound infliction, 1 sample (25%) showed weakly positive and 3 sample (75%) strongly positive for fibronectin and TGF- β 1. In 3 and 4 hour after wound infliction, all of samples strongly positive for fibronectin and TGF- β 1. In postmortem wound, all of samples showed negativity for fibronectin and TGF- β 1. In conclusion, fibronectin and TGF- β 1 may be useful in the determination of wound vitality.

Keywords: wound, fibronectin, TGF- β 1, vitality

Research Article

Analisis Imunohistokimia Fibronectin dan TGF- β 1 dalam Menentukan Vitalitas Luka pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Galur Wistar

Nita Novita, Hasrayati Agustina, Bethy S. Hernowo, Abdul H. Hassan

*Departemen Patologi Anatomi
Fakultas Kedokteran Unpad/RS Hasan Sadikin Bandung
Jl. Pasteur No. 38 Bandung 40161 Indonesia
Email: ade_nov97@yahoo.com*

Abstrak

Penilaian vitalitas luka merupakan permasalahan medikolegal yang penting dalam kedokteran forensik. Fibronectin dan TGF- β 1 dapat digunakan sebagai *marker* karena merupakan salah satu mediator yang muncul lebih awal pada saat terjadi luka. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui perbedaan imunoekspresi fibronectin dan TGF- β 1 pada luka antemortal dan posmortal sehingga dapat untuk menentukan vitalitas luka. Penelitian ini merupakan penelitian analisis kategorik tidak berpasangan menggunakan desain eksperimental. Penelitian menggunakan sampel dari jaringan luka antemortal dan posmortal yang diperoleh dari 40 ekor tikus putih galur Wistar, diwarnai dengan HE dan imunohistokimia. Hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan imunoekspresi fibronectin dan TGF- β 1 pada luka antemortal dan posmortal, dan terdapat perbedaan imunoekspresi fibronectin dan TGF- β 1 pada luka antemortal berdasarkan waktu, dengan p value <0.05. Imunoekspresi positif lemah terhadap fibronectin dan TGF- β 1 terdapat pada seluruh luka (100%) antemortal 30 menit; 75% imunoreaksi positif lemah dan 25% positif kuat pada luka antemortal 1 jam, 25% positif lemah dan 75% positif kuat pada luka antemortal 2 jam; sedangkan pada luka antemortal 3 jam dan 4 jam seluruhnya memberikan reaksi positif kuat. Hasil penelitian menunjukkan imunoekspresi fibronectin dan TGF- β 1 yang negatif pada seluruh luka *postmortem*. Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa fibronectin dan TGF- β 1 dapat digunakan untuk menentukan vitalitas luka.

Kata kunci: luka, *fibronectin*, TGF- β 1, vitalitas

Research Article

Pendahuluan

Luka atau trauma didefinisikan sebagai suatu kerusakan pada setiap bagian tubuh yang disebabkan oleh kekuatan mekanik. Definisi luka dalam konteks hukum adalah suatu cedera atau trauma yang menyebabkan hilangnya integritas atau kontinuitas kulit.¹⁻²

Pemeriksaan luka adalah hal yang penting dalam kedokteran forensik sehingga penilaian vitalitas (apakah trauma terjadi semasa hidup) dan perkiraan usia luka merupakan permasalahan medikolegal yang penting dan mendasar.²⁻¹² Penilaian yang tepat dalam menentukan interval luka sangat membantu dalam penyelidikan kasus kriminal sehingga sangat penting membedakan luka antemortal dan luka posmortal.^{9, 12} Apabila diketahui bahwa luka atau trauma terjadi antemortal maka harus ditentukan pula waktu terjadinya luka sebelum kematian.^{2, 8, 12-13} Diagnosis banding antara luka antemortal dan posmortal dapat dengan mudah dibedakan secara makroskopis ataupun melalui pemeriksaan histopatologi apabila waktu antara terjadinya luka dengan interval kematian cukup lama. Namun, penilaian vitalitas luka menjadi sulit jika luka terjadi terlalu dekat dengan waktu kematian dan dapat memberikan hasil positif palsu atau negatif palsu.^{5, 8, 12, 14} Hal ini disebabkan karena perubahan morfologi yang terjadi sangat minimal.¹²⁻¹³ Jadi, pertanyaan yang paling sulit adalah bagaimana membedakan antara luka yang terjadi sesaat sebelum dan sesaat setelah kematian.^{5, 8, 10, 13}

Secara umum, luka antemortal akan menimbulkan reaksi inflamasi di sekitar luka dan pada kasus yang menyebabkan kerusakan pembuluh darah akan menimbulkan perdarahan yang lebih hebat dibandingkan dengan luka posmortal.^{3, 15} Tahapan penyembuhan luka dijadikan pedoman dalam menentukan vitalitas dan usia luka di kedokteran forensik. Proses penyembuhan luka di kulit dimulai segera setelah terjadi trauma atau jejas dan terdiri atas tiga fase yaitu fase inflamasi, fase proliferasi, dan fase maturasi. Selama proses penyembuhan luka banyak sitokin, glikoprotein, faktor pertumbuhan, dan matriks ekstraseluler yang terlibat. Berdasarkan hal tersebut maka pemeriksaan *marker* dalam penyembuhan luka dapat digunakan untuk menentukan vitalitas dan usia luka.^{4, 8, 12-14, 16-23}

Fibronectin merupakan suatu glikoprotein dengan berat molekul yang tinggi di dalam plasma darah dan matriks ekstraseluler, berfungsi sebagai regulator dalam proses seluler dan protein penting dalam mempertahankan ikatan jaringan dan komposisi matriks ekstraseluler. *Fibronectin* terlibat dalam adhesi sel, migrasi, dan diferensiasi. *Fibronectin* berperan penting dalam proses penyembuhan luka dan merupakan salah satu *marker* yang muncul segera dan paling banyak pada saat terjadi cedera kulit. *Fibronectin* paling banyak ditemukan di membran basal jaringan dewasa dan akan tersebar luas pada jaringan yang mengalami inflamasi.^{3, 5, 7-9, 13-14,}

24-25

Research Article

Transforming growth factor (TGF) terdiri atas TGF- α dan TGF- β . TGF- β 1 merupakan tipe yang paling banyak dan tampak pada sebagian besar trombosit, dan reseptor TGF- β 1 juga terdapat pada hampir seluruh sel termasuk kulit. TGF- β 1 disekresi dalam bentuk laten dan akan menjadi aktif ketika TGF- β 1 matur dikeluarkan dari bentuk latennya melalui peptida dimer akibat adanya reaksi inflamasi. TGF- β 1 berperan dalam inhibisi dan stimulasi proliferasi sel, mengontrol sintesis dan degradasi matriks ekstraseluler, dan memperantarai respons sel dan jaringan terhadap cedera. Secara umum fungsi TGF- β 1 dalam regenerasi jaringan adalah sebagai faktor kemotaksis dan menstimulasi migrasi sel-sel monosit, limfosit, netrofil, dan fibroblas. TGF- β 1 juga merangsang sintesis matriks ekstraseluler seperti kolagen, *fibronectin*, *tenascin*, dan sebagainya. TGF- β 1 muncul dalam tiga fase utama proses penyembuhan luka sebagai mediator dan berperan dalam fase akhir pembentukan matriks dengan menstimulasi terbentuknya fibrosis.^{3, 5-6, 8, 26-27}

Penelitian ini bertujuan mengetahui perbedaan imunoekspresi *fibronectin* dan TGF- β 1 pada luka antemortal dan posmortal, serta mengetahui peran *fibronectin* dan TGF- β 1 dalam menentukan vitalitas luka.

Metode

Bahan penelitian ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar, berumur 8-12 minggu dengan berat badan antara 200-250 gram. Sampel hewan percobaan yang digunakan pada penelitian ini dibagi menjadi 10 kelompok, terdiri atas 5 kelompok luka antemortal dan 5 kelompok luka posmortal.

Jaringan luka antemortal diambil pada waktu 30 menit, 1 jam, 2 jam, 3 jam, dan 4 jam setelah perlukaan pada saat hidup, sedangkan jaringan luka posmortal diambil setelah perlukaan pada saat mati dengan interval waktu 30 menit, 1 jam, 2 jam, 3 jam, dan 4 jam posmortal. Setelah tikus dianestesi menggunakan *ketamine* dengan dosis 45 mg/kg secara intramuskuler, dibuat luka insisi di daerah punggung sepanjang 5 cm dengan kedalaman 1 mm (sampai ke lapisan dermis), kemudian luka dibersihkan menggunakan larutan fisiologis. Setelah waktu yang ditentukan, jaringan luka diambil menggunakan skalpel steril dengan memotong luka secara melintang sepanjang 3 cm dengan kedalaman mencapai lapisan subkutan. Luka ditutup dengan kassa dan tikus dimasukkan ke kandang yang bersih. Pada kelompok posmortal, luka diambil setelah dilakukan terminasi pada tikus dengan cara dislokasi servikal.

Selanjutnya sediaan blok parafin dibuat masing-masing sebanyak 3 buah, yang pertama diberi pewarnaan *Haematoxylin-Eosin* (H&E) dan dilihat di bawah mikroskop untuk melihat

Research Article

gambaran histopatologis jaringan luka. Preparat ke-dua dan ke-tiga masing-masing diberi pulasan imunohistokimia *fibronectin* dan TGF- β 1 dan dilihat di bawah mikroskop.

Imunohistokimia *fibronectin* dan TGF- β 1 dilihat berdasarkan terpulusnya matriks ekstraseluler dan jaringan ikat menjadi berwarna coklat. Kontrol positif untuk *fibronectin* adalah jaringan ginjal normal sedangkan untuk TGF- β 1 adalah karsinoma payudara.

Penilaian intensitas pewarnaan diberi skor 0 untuk hasil imunoreaksi negatif, skor 1 untuk intensitas lemah, skor 2 untuk intensitas sedang, dan skor 3 untuk intensitas kuat. Distribusi positif dinilai berdasarkan pembagian skor 0 apabila tidak ada daerah yang terwarna, skor 1 apabila hanya terwarna di daerah tepi luka saja, dan skor 2 apabila terwarna di tepi luka dan daerah sekitarnya. Skor akhir dikelompokkan menjadi skor 0 jika negatif, skor 1–2 dikatakan positif lemah, dan skor akhir 3–6 dikatakan positif kuat.

Data penelitian berupa data kategorik tidak berpasangan menggunakan uji statistik *Chi Square Test*, dan uji alternatif *Kolmogorov Smirnov*.

Hasil

Jaringan luka dinilai secara histopatologis dengan melihat reaksi yang terjadi di daerah luka dan sekitarnya. Pada luka terlihat berbagai perubahan yang terjadi sebagai akibat reaksi inflamasi.

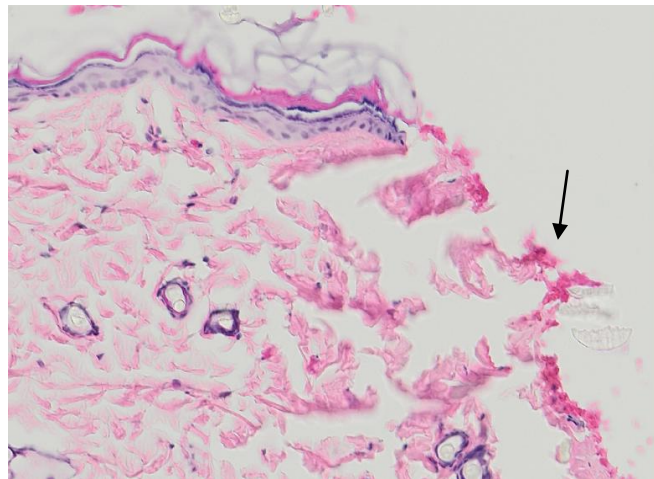
Pada Tabel 1 dan Gambar 1 terlihat bahwa pada luka antemortal terjadi reaksi jaringan sejak 30 menit pertama. Sel-sel inflamasi belum terlihat pada luka antemortal 30 menit dan 1 jam, sedangkan pada luka yang lebih lama sudah mulai terlihat adanya sel-sel radang di sekitar luka dan semakin masif pada luka antemortal 4 jam (Tabel 1 dan Gambar 2). Pada luka posmortal juga masih ditemukan perdarahan pada luka 30 menit (Gambar 3), sedangkan pada luka yang lebih lama tidak ditemukan adanya perdarahan (Tabel 1). Pada luka posmortal tidak ditemukan sel-sel inflamasi pada seluruh interval luka. Pada luka posmortal sudah dapat dijumpai sel-sel yang mulai mengalami lisis dengan *shrunken nuclei* dan ditemukan pula *ballooned cells* (Gambar 4).

Research Article

Tabel 1 Gambaran Histopatologi Luka Antemortal dan Posmortal

| Histopatologi | Waktu | | | | | | | | | |
|-----------------------|----------|----|-------|----|-------|----|-------|----|-------|----|
| | 30 menit | | 1 jam | | 2 jam | | 3 jam | | 4 jam | |
| | AM | PM | AM | PM | AM | PM | AM | PM | AM | PM |
| Perdarahan | ++ | + | + | - | + | - | + | - | + | - |
| Edema | ± | - | ++ | - | + | - | ± | - | - | - |
| Netrofil | - | - | - | - | + | - | + | - | ++ | - |
| Limfosit | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| <i>Ballooned cell</i> | - | - | - | - | - | - | - | + | - | + |
| Sel yang lisis | - | - | - | - | - | - | - | + | - | + |
| Nekrosis | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

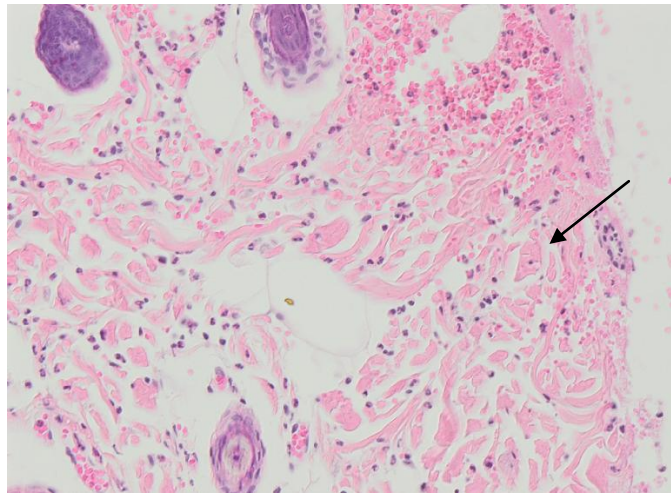
Keterangan: AM= antemortal, PM= posmortal



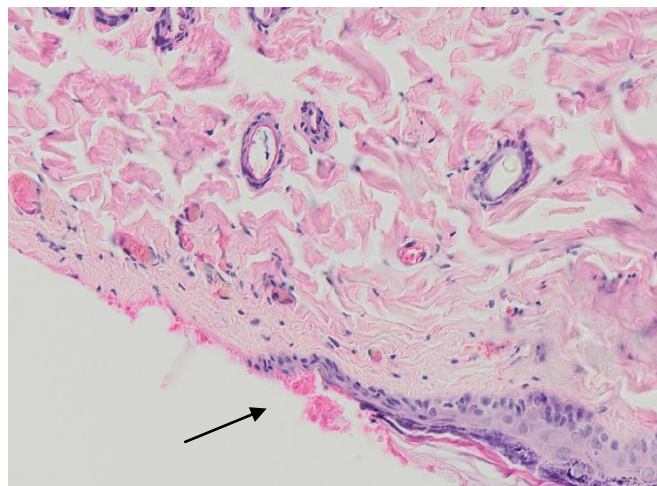
Gambar 1 Histopatologi Luka Antemortal, 30 Menit Setelah Perlukaan (Pembesaran 200x)

Ket.: tanda panah menunjukkan perdarahan pada tepi luka

Research Article

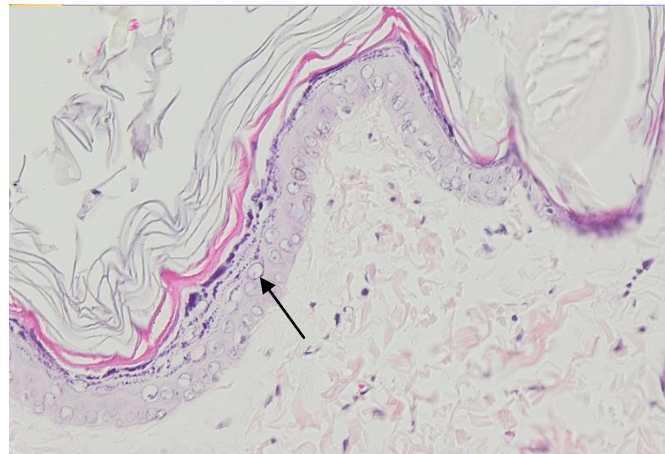


Gambar 2 Histopatologi Luka Antemortal, 4 Jam Setelah Perlukaan (Pembesaran 200x)
Ket.: tanda panah menunjukkan akumulasi sel-sel radang netrofil



Gambar 3 Histopatologi Luka 30 Menit Posmortal (Pembesaran 200x)
Ket: tanda panah menunjukkan perdarahan pada tepi luka

Research Article



Gambar 4 Histopatologi Luka Posmortal 4 Jam (Pembesaran 200x)
Ket.: tanda panah menunjukkan *ballooned cell*

Hasil imunoekspresi *fibronectin* dan TGF- β 1 pada luka antemortal dan posmortal dapat dilihat pada tabel 2 dan 3. Hasil analisis statistik menggunakan uji *Chi-Square* alternatif uji *Kolmogorov Smirnov* menunjukkan terdapat hubungan antara imunoekspresi *fibronectin* pada luka antemortal dan posmortal (P value $<0,05$), juga terdapat hubungan antara imunoekspresi TGF- β 1 pada luka antemortal dan posmortal (P value $<0,05$). Pulasan imunohistokimia *fibronectin* negatif dan intensitas kuat ditampilkan pada Gambar 5 dan 6, sedangkan untuk pulasan TGF- β 1 negatif dan intensitas kuat ditampilkan pada Gambar 7 dan 8.

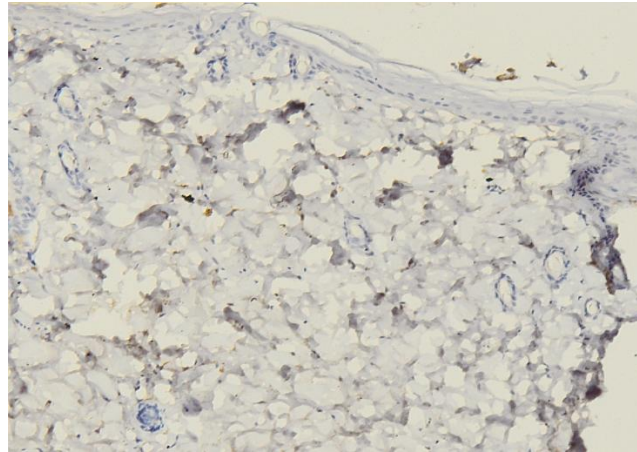
Tabel 2 Imunoekspresi *Fibronectin* pada Luka Antemortal dan Posmortal

| Luka | Imunoekspresi <i>Fibronectin</i> | | | P Value |
|------------|----------------------------------|---------------|--------------|----------|
| | Negatif | Positif Lemah | Positif Kuat | |
| Antemortal | 0 | 8(40,0%) | 12(60,0%) | 0,0001** |
| Posmortal | 20(100%) | 0 | 0 | |

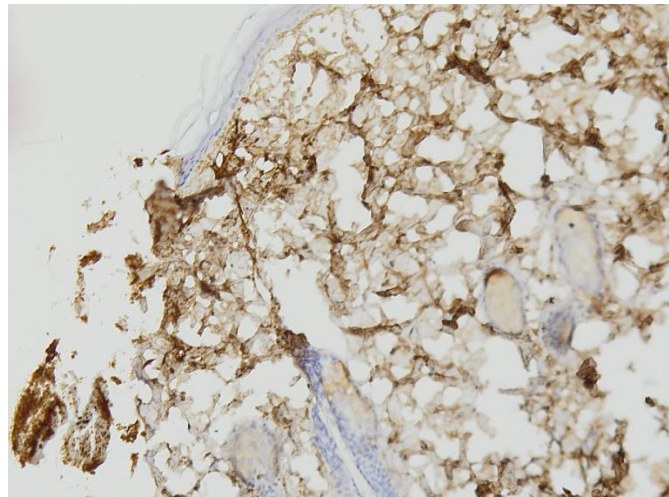
Tabel 3 Imunoekspresi TGF- β 1 pada Luka Antemortal dan Posmortal

| Luka | TGF- β 1 | | | P Value |
|------------|----------------|---------------|--------------|----------|
| | Negatif | Positif Lemah | Positif Kuat | |
| Antemortal | 0 | 8(40,0%) | 12(60,0%) | 0,0001** |
| Posmortal | 20(100%) | 0 | 0 | |

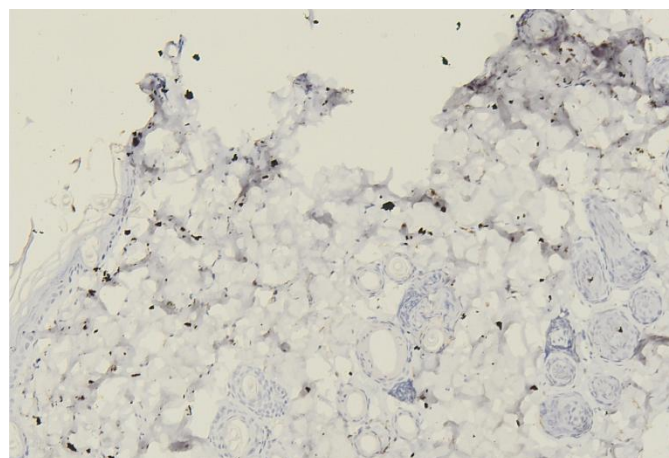
Research Article



Gambar 5 Pulasan Fibronectin Negatif (Pembesaran 100x)

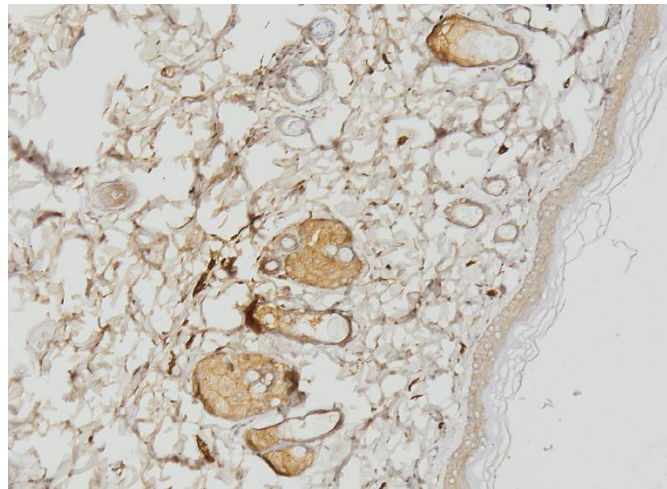


Gambar 6 Pulasan Fibronectin dengan Intensitas Kuat (Pembesaran 100x)



Gambar 7 Pulasan TGF- β 1 Negatif (Pembesaran 100x)

Research Article



Gambar 8 Pulasan TGF-β1 dengan Intensitas Kuat (Pembesaran 100x)

Hasil perhitungan statistik untuk menilai hubungan antara imunoekspresi *fibronectin* dan TGF-β1 pada luka antemortal berdasarkan waktu dapat dilihat pada Tabel 4 dan 5.

Luka antemortal 30 menit seluruhnya memberikan reaksi positif lemah terhadap *fibronectin*. Pada luka 1 jam antemortal sebanyak 3 sampel (75%) memberikan reaksi positif lemah dan 1 sampel (25%) positif kuat. Pada luka 2 jam antemortal sebanyak 1 sampel (25%) memberikan reaksi positif lemah dan 3 sampel (75%) positif kuat. Pada luka 3 jam dan 4 jam antemortal seluruhnya memberikan reaksi positif kuat (masing-masing 100%).

Hasil analisis statistik menggunakan uji *Chi-Square* alternatif uji *Kolmogorov Smirnov* menunjukkan terdapat hubungan antara imunoekspresi *fibronectin* pada luka antemortal berdasarkan waktu ($P\ value < 0,05$).

Tabel 4 Hubungan Imunoekspresi *Fibronectin* dengan Luka Antemortal Berdasarkan Waktu

| Luka | Imunoekspresi Fibronectin | | | P Value |
|----------|---------------------------|---------------|--------------|---------|
| | Negatif | Positif Lemah | Positif Kuat | |
| 30 menit | 0 | 4(100%) | 0 | 0.008** |
| 1 jam | 0 | 3(75%) | 1(25%) | |
| 2 jam | 0 | 1(25%) | 3(75%) | |
| 3 jam | 0 | 0 | 4(100%) | |
| 4 jam | 0 | 0 | 4(100%) | |

Research Article

Tabel 5 Hubungan Imunoekspresi TGF-β1 dengan Luka Antemortal Berdasarkan Waktu

| Luka | Imunoekspresi TGF-β1 | | | P Value |
|----------|----------------------|---------------|--------------|---------|
| | Negatif | Positif Lemah | Positif Kuat | |
| 30 menit | 0 | 4(100%) | 0 | 0.008** |
| 1 jam | 0 | 3(75%) | 1(25%) | |
| 2 jam | 0 | 1(25%) | 3(75%) | |
| 3 jam | 0 | 0 | 4(100%) | |
| 4 jam | 0 | 0 | 4(100%) | |

Berdasarkan Tabel 5 pada luka antemortal 30 menit seluruhnya memberikan reaksi positif lemah terhadap TGF-β1. Pada luka 1 jam antemortal sebanyak 3 sampel (75%) memberikan reaksi positif lemah dan 1 sampel (25%) positif kuat. Pada luka 2 jam antemortal sebanyak 1 sampel (25%) memberikan reaksi positif lemah dan 3 sampel (75%) positif kuat. Pada luka 3 jam dan 4 jam antemortal seluruhnya memberikan reaksi positif kuat (masing-masing 100%).

Hasil analisis statistik menggunakan uji *Chi-Square* alternatif uji *Kolmogorov Smirnov* menunjukkan terdapat hubungan antara imunoekspresi TGF-β1 pada luka antemortal berdasarkan waktu (*P value* <0,05).

Diskusi

Pada tahun 1960 Raekallio telah melakukan penelitian mengenai aktivitas berbagai enzim pada luka dengan menggunakan histokimia. Beberapa tahun kemudian Berg dkk menilai level serotonin dan histamin pada tepi luka yang dapat menjadi tanda adanya reaksi intravital. Selanjutnya, pemeriksaan imunohistokimia mulai berkembang dalam menilai usia luka yang dipelopori oleh Eisenmenger dkk pada tahun 1988 dan Oehmichen pada tahun 1990.^{2-5, 7-11, 13, 16, 24} Selama beberapa tahun terakhir penentuan usia luka menjadi tema yang paling populer dalam penelitian ilmu kedokteran forensik, khususnya dengan menilai faktor pertumbuhan, sitokin, dan matriks ekstraseluler.^{3-5, 7-9, 11-13, 16, 28}

Hasil penelitian ini, pada luka antemortal 30 menit tampak perdarahan dan edema namun belum ditemukan sel-sel radang dan reaksi inflamasi semakin jelas terlihat dalam waktu kurang dari 4 jam. Pada penelitian ini didapatkan gambaran luka antemortal 30 menit dan luka posmortal 30 menit sulit untuk dibedakan secara histopatologi, namun secara imunohistokimia dengan menggunakan *fibronectin* dan TGF-β1 jelas terlihat perbedaan yaitu pada luka antemortal 30 menit memberikan reaksi positif sedangkan pada luka posmortal 30 menit

Research Article

memberikan reaksi negatif. Hal ini sesuai dengan pernyataan bahwa penilaian vitalitas luka menjadi sulit jika luka terjadi terlalu dekat dengan waktu kematian dan dapat memberikan hasil positif palsu atau negatif palsu, sehingga diperlukan pemeriksaan khusus seperti pemeriksaan imunohistokimia.^{3, 5, 8, 12, 14-16}

Pada luka antemortal, imunoekspresi positif *fibronectin* dan TGF- β 1 mulai terlihat pada luka 30 menit. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Sheta (2009) dengan menggunakan metode ELISA, terdapat peningkatan level *fibronectin* dalam 30 menit setelah luka insisi, dan selanjutnya akan mencapai nilai maksimum pada jam ke-6 dan bertahan pada jam ke-24 setelah luka.¹² Pada penelitian yang dilakukan oleh Fieguth dkk (2003) sebagian besar sampel luka vital memberikan reaksi positif kuat terhadap *fibronectin* dalam 20 menit pertama dan reaksi semakin masif setelah 3,5 jam.^{12, 24} Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Rey dkk (2002), sebanyak 39,4% luka antemortal menunjukkan ekspresi positif *fibronectin* pada tepi luka dan dapat terlihat hanya dalam beberapa menit setelah luka, sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Betz dkk (2002) yang menjelaskan bahwa ekspresi *fibronectin* pada tepi luka terlihat dalam beberapa menit setelah luka.^{14, 29}

Pada penelitian yang dilakukan oleh Grellner dkk (2005) didapatkan hasil reaksi positif TGF- β 1 muncul beberapa menit setelah luka dan pada 90% kasus ditemukan ekspresi yang memuncak setelah 30–60 menit. Reaktivitas TGF- β 1 menetap dalam beberapa hari sampai minggu. Pada luka yang lebih dari 90 menit sebanyak 50% kasus memberikan hasil positif.⁶ TGF- β 1 akan terdeteksi pada seluruh fase penyembuhan luka.^{6, 26-27}

Seluruh kasus luka posmortal pada penelitian ini, yaitu sebanyak 20 sampel didapatkan hasil imunoekspresi negatif terhadap *fibronectin* dan TGF- β 1. Berdasarkan penelitian yang pernah dilakukan sebelumnya oleh Rey dkk (2002) untuk menilai ekspresi *fibronectin* pada luka posmortal didapatkan hasil bahwa *fibronectin* negatif pada luka posmortal walaupun luka tersebut berupa luka yang luas dan terjadi segera setelah posmortal. Penelitian yang dilakukan oleh Betz dkk (2002) didapatkan hasil yang sama yaitu *fibronectin* memberikan reaksi negatif pada seluruh luka posmortal. Demikian pula dengan ekspresi TGF- β 1 pada luka posmortal, hasil penelitian Grellner dkk (2005) menunjukkan reaksi negatif TGF- β 1 pada seluruh luka posmortal.^{3,}

8, 10, 12

Simpulan

Terdapat perbedaan imunoekspresi *fibronectin* dan TGF- β 1 antara luka antemortal dan posmortal sehingga *Fibronectin* dan TGF- β 1 dapat digunakan untuk menentukan vitalitas luka.

Research Article

Daftar Pustaka

1. The pathology of wound. In: Saukko P, Knight B, ed. Knight's forensic pathology. London: Arnold; 2004: p. 136-71.
2. Ohshima T. Forensic wound examination. *Forensic Sci Int.* 2002;113(1-3):153-64.
3. Vitality, injury age, determination of skin wound age, and fracture age. In: Reinhard BD, ed. *Forensic histopathology fundamentals and perspectives.* Berlin: Springer, 2011; p. 191-205.
4. Cecchi R. Estimating wound age: looking into the future. *IntJ of Legal Med.* 2010; 124(6):523-36.
5. Grellner W, Madea B. Demands on scientific studies: vitality of wounds and wound age estimation. *Forensic Sci Int.* 2007;165(2-3):150-4.
6. Grellner W, Vieler S, Madea B. Transforming growth factors (TGF-alpha and TGF-beta1) in the determination of vitality and wound age: immunohistochemical study on human skin wounds. *Forensic Sci Int.* 2005; 153(2-3):174-80.
7. Ishida Y, Kimura A, Takayasu T, Eisenmenger W, Kondo T. Detection of fibrocytes in human skin wounds and its application for wound age determination. *Int J of legal Med.* 2009; 123(4):299-304.
8. Kondo T. Timing of skin wounds. *Leg med (Tokyo).* 2007;9(2):109-14.
9. Liu N, Chen Y, Huang X. Fibronectin EIIIA splicing variant: a useful contribution to forensic wounding interval estimation. *Forensic Sci Int.* 2006;162(1-3):178-82.
10. Oehmichen M. Vitality and time course of wounds. *Forensic Sci Int.* 2004;144(2-3):221-31.
11. Sauvageau A, Racette S. Postmortem changes mistaken for traumatic lesions: a highly prevalent reason for coroner's autopsy request. *AmJ Forensic Med Pathol.* 2008;29(2):145-7.
12. Sheta AA, Suliman HS, Megahed HM. Antemortem and postmortem estimation of skin wound age in rats: biochemical study. *Bull Alex Fac Med.* 2009;45(1): 241-51.
13. Kondo T, Ishida Y. Molecular pathology of wound healing. *Forensic Sci Int.* 2010; 203(1-3):93-8.
14. Ortiz-Rey JA, Suarez-Penaranda JM, Da Silva EA, Munoz JI, San Miguel-Fraile P, De la Fuente-Buceta A, et al. Immunohistochemical detection of fibronectin and tenascin in incised human skin injuries. *Forensic Sci Int.* 2002;126(2):118-22.
15. Dolinak D, Matshes EW. Blunt Force Injury. In: Dolinak D, Matshes EW, Lew EO, ed. *Forensic pathology principles and practice.* London: Elsevier, 2005; p. 121-42.
16. Pathophysiology of wound healing. In: Jason P, Anthony B, William S, ed. *Forensic medicine clinical and pathological aspects.* London: Greenwich Medical Media, 2003; p. 81-8.
17. Tissue renewal, regeneration, and repair. In: Kumar, Abbas, Faustro, Aster, ed. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease.* Philadelphia: Saunders Elsevier, 2010;79-108.
18. Broughton G, Janis JE, Attinger CE. The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 2006;117(7 Suppl):12S-34S.
19. Gantwerker EA, Hom DB. Skin: histology and physiology of wound healing. *Clin Plast Surg.* 2012;39(1):85-97.
20. Heber-Katz E, Gourevitch D. The relationship between inflammation and regeneration in the MRL mouse: potential relevance for putative human regenerative (scarless wound healing) capacities? *Annals New York Acad Sci.* 2009;1172:110-4.
21. Leong M, Phillips LG. Wound healing. In: Townsend CM, Beauchamp RD, Evers BM, Mattox KL, ed. *Sabiston textbook of surgery the biological basis of modern surgical practice.* Philadelphia: Elsevier, 2004; p. 183-204.
22. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol.* 2007;25(1):9-18.
23. O'Toole EA, Mellere JE. Wound healing. In: Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C, ed. *Rook's textbook of dermatology.* Singapore: Blackwell, 2010; p. 417-43.
24. Fieguth A, Feldbrugge H, Gerich T, Kleemann WJ, Troger HD. The time-dependent expression of fibronectin, MRP8, MRP14 and defensin in surgically treated human skin wounds. *Forensic Sci Int.* 2003;131(2-3):156-61.
25. To WS, Midwood KS. Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair. *Fibrogenesis & tissue repair.* 2011; 4:21.
26. Sarahrudi K, Thomas A, Mousavi M, Kaiser G, Kottstorfer J, Kecht M, et al. Elevated transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) levels in human fracture healing. *Injury.* 2011;42(8):833-7.
27. Eslami A, Gallant-Behm CL, Hart DA, Wiebe C, Honardoust D, Gardner H, et al. Expression of integrin alphavbeta6 and TGF-beta in scarless vs scar-forming wound healing. *J Histochem Cytochem: Official J Histochem Soc.* 2009;57(6):543-57.
28. Assessment classification and documentation of injury. In: Jason PJ, Richard J, Steven BK, John M, ed. *Simpson's forensic medicine.* London: Hodder & Stoughton, 2011; p. 76-109.
29. Betz P, Nerlich A, Wilske J. Immunohistochemical localisation of fibronectin as a toll for the age determination of human skin wounds. *Int J of Legal Med.* 2002(105):21-6.