

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

УНИВЕРЗИТЕТ "Св. КИРИЛ И МЕТОДИЈ" - СКОПЈЕ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

Институт за медицинска хистологија и ембриологија



ПОСТМОРТАЛНО ОДРЕДУВАЊЕ НА СТАРОСТА НА КРВНИТЕ ПОДЛИВИ

-ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА-

Автор:
Ас. д-р Ирена Костадинова-Петрова

Ментор:
Проф. д-р Биљана Јанеска

Скопје, 2021

СОДРЖИНА

АПСТРАКТ	5
ABSTRACT	9
1. ВОВЕД.....	12
1.1.Макроскопска презентација на крвните подливи.....	12
1.2. Фактори кои влијаат на појавата на крвните подливи.....	13
1.3. Фактори кои можат да ја модифицираат појавата на крвните подливи.....	15
1.4. Медицинско-правно значење на крвните подливи.....	16
1.5. Микроскопска презентација на крвните подливи.....	17
1.6. Методи за одредување на староста на крвните подливи.....	19
2. МОТИВ	25
3. ХИПОТЕЗА	27
4. ЦЕЛИ	29
5. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ.....	31
5.1. Дизајн на студијата	
5.2. Селекција на материјал за истражување	
5.2.1. Инклузиони критериуми	
5.2.2. Ексклузиони критериуми	

5.3. Метод на обсервација	
5.4. Материјал за истражувањето	
5.5. Класификација на материјалот за истражување	
5.6. Хистолошка обработка на материјалот	
5.6.1. Применети боења	
5.7. Микроскопска анализа на материјалот	
5.7.1. Протокол на активностите при анализата на секој поединечен крвен подлив	
5.7.2. Податоци кои се очекува да се добијат од микроскопската анализа	
5.8. Методи за квантитативна анализа хистолошкиот материјал	
5.9. Статистичка обработка на квалитативните и квантитативните податоци	
6. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА	47
7. РЕЗУЛТАТИ	49
8. ДИСКУСИЈА	106
9. ЗАКЛУЧОЦИ	125
10. ЛИТЕРАТУРА	127

АПСТРАКТ

Вовед: Крвните подливи се чести повреди кои се среќаваат кај лицата починати од насилна смрт и особено важни во судската медицина. Во праксата се јавуваат случаи кога е од особен интерес да се одреди со сигурност староста на крвните подливи. Познавањето и анализата на биолошките процеси асоцирани со репарирањето на крвните подливи би можеле да дадат посигурни информации за нивната старост.

Цели: Одредување на карактеристиките на крвните подливи со различна старост преку примена на повеќе методи е главната цел на оваа студија. Бидејќи мноштво фактори влијаат на настанувањето и презентирањето на крвните подливи, секој метод кој се применува во интерпретацијата на староста на крвните подливи има свои предности и ограничувања. Како

дополнителни цели на студијата се потенцирани предностите и ограничувањата на овие методи во секојдневната форензична пракса, како и конципирање на општа шема за одредување на староста на крвните подливи, со комбинирање на неколку методи.

Материјал и методи: Материјалот за анализа опфаќа 120 ткивни исечоци, од кои 60 исечоци се примероци од нормална хумана кожа, како контролна група и 60 исечоци од кожа со присутни крвни подливи во неа, како испитувана група, со 4 подгрупи, добиени при рутинските обдукции на Институтот за Судска медицина на Медицинскиот факултет во Скопје. Заедно со материјалот беа анализирани и обдукционите протоколи поради толкување во резултатите, како дополнување на хистолошката анализа. Во рамките на испитуваната група предвидени се подгрупи на крвни подливи со различно време на настанување на повредата. Сите примероци беа анализирани со метод на визуелна опсервација, со што се анализира промена во бојата, местоположбата и големината на крвните подливи. Потоа следеше хистолошка анализа на ткивото, со метод на боење со хематоксилин и еозин, како првична хистолошка анализа за потврдување на крварењето, како и дополнително боење со метод по Perl's Prussian Blue, за докажување на хемосидерин во макрофагите во полето на крварење. Имунохистохемиски, со употреба на анти хем-оксигеназа-1 [HO-1] антители, бише изведено докажување на ензимот хем-оксигеназа кај макрофагите во полето на крварење.

Резултати: Методот на визуелна опсервација, односно макроскопската анализа, ја потврди промената на бојата од првичната презентација на крвните подливите со црвена боја, преку виолетова, сина, зелена и на крај појавата на жолтата боја кај старите подливи, во одреден временски интервал. Хистолошката анализа потврди присуство на воспалителни клетки, неутрофилни гранулоцити и макрофаги, во полето на крварењето, како и присуство на хемосидерин, пигмент кој е продукт на метаболирањето на хемоглобинот, во самите макрофаги. Имунохистохемиската анализа потврди присуството и активност на ензимот хем оксигеназа 1 во макрофагите, наод што сугерира репараторен процес во полето на

крварењето. Инфилтрацијата со воспалителни клетки е карактеристична за секоја од експерименталните групи. Во групата А беше забележана инфилтрација со неутрофилни гранулоцити (неутрофили), клетки кои по морфолошките карактеристики претставуваат полиморфонуклеарни клетки. Овој наод е карактеристичен за свежите крвни подливи, не постари од 24 часа. Веќе во следната експериментална група Б, кај крвните подливи со старост од 1 до 3 дена, во полето на крварење беше забележана почетна минимална инфилтрација со макрофаги, клетки кои според морфолошките карактеристики претставуваат моноклеарни клетки. Нивната нумеричка застапеност (густина) прогредираше во следните експериментални групи, В и Г, односно кај крвните подливи со старост од 3 до 7 дена и од 7 до 14 дена соодветно. Добиените резултати беа обработени статистички со IBM SPSS statistics v.26 софтвер и покажаа сигнификантни вредности во споредуваните групи, обработени со Student`s t test (paired groups). Имено, како статистички сигнификантна се покажа густината на неутрофилите во експерименталната група А споредено со густината на неутрофилите во групата Б, со $p < 0.0001$. Како статистички сигнификантна се покажа и густината на макрофагите кај сите четири експериментални групи, А, Б, В, Г ($p < 0.0001$), споредени една со друга, при што беше добиена статистички сигнификантна вредност на $p < 0,0001$ при споредба на густината на макрофагите во групата Б споредено со густината на макрофагите во групата А, како и при споредба на густината на макрофагите во групата В споредено со густината на макрофагите во групата Б, и споредба на густината на макрофагите во групата В споредено со густината на макрофагите во групата Г. Имено густината на макрофагите покажува поголеми вредности во секоја наредна група, каде што крвните подливи се со поголема старост.

Заклучок: Во биолошкиот процес на репарирање на крвните подливи во различна временска инстанца се активни различни клетки на имунолошкиот систем. Веднаш по настанувањето на подливот се активираат неутрофилните гранулоцити, за по неколку часови да бидат заменети со макрофаги кои по неколку дена почнуваат активно да го

метаболираат железото од полето на крварењето, со продукција на ензимот НО-1. Употребата на неколку методи кои се надополнуваат ни даде можност за конципирање на едноставен алгоритам во толкувањето на староста на крвните подливи.

Клучни зборови: крвни подливи, одредување на староста, опсервација, хистолошка анализа, имунохистохемија.

ABSTRACT

Introduction: Bruises are common injuries found in people who die from violent death and are particularly important in forensic medicine. In practice there are cases where it is of particular interest to determine with certainty the age of bruises. Knowing and analyzing the biological processes associated with the healing of bruises could provide more reliable information on their age.

Objectives: The main purpose of this study was to determine the characteristics of different age-matched bruises. Because many factors influence the occurrence and presentation of bruise, each method used to interpret their age has its advantages and limitations. Further aims of the study will highlight the advantages and limitations of these methods in daily forensic practice, as well as

the conceptualization of a general scheme for determining the age of bruises, by combining several methods.

Material and methods: The assessed material comprises 120 tissue sections, 60 of which are normal human skin specimens as a control group and 60 bruised skin sections as an experimental group, with 4 subgroups, obtained during routine autopsies at the Institute for forensic medicine and deontology, at the Faculty of Medicine in Skopje. Along with the material, autopsy protocols are also analyzed for interpretation of results, in addition to histological analysis. Within the study group, subgroups of bruises with different time of injury were predicted. All samples were analyzed using a visual observation method, which assesses the color, location and size of the bruises. Subsequently, histological analysis of the tissue followed, with the hematoxylin and eosin staining method, as the initial histological analysis to confirm the bleeding, as well as additional staining with the Perl's Prussian Blue method, Giemsa method, Masson Goldner, Alcian blue SCHIFF and Elastica van Gieson method, to prove presence of macrophages in the area of bleeding, as well as the localisation of the bruises in the skin. Immunohistochemically, with the use of an anti heme-oxygenase-1 [anti HO-1] antibody, presence of heme oxygenase enzyme in macrophages in the bleeding area was demonstrated.

Results: Visual observation method confirmed the color change from the initial presentation of red to purple, blue, green and finally yellow in old bruises, over a period of time. Histological analysis confirmed presence of inflammatory cells, neutrophil granulocytes (neutrophils) and macrophages in the area of bleeding, as well as presence of hemosiderin, a pigment that is a product of hemoglobin metabolism, in the macrophages themselves. Immunohistochemical analysis confirmed the presence and activity of the heme oxygenase 1 enzyme [HO-1] in macrophages, a finding that suggests a reparative process in the area of bleeding. In group A, infiltration with neutrophils was observed in the area of bleeding, along with extravasated red blood cells. This finding is characteristic for fresh bruises, not older than 24 hours. In the next experimental group, B, in bruises aged 1 to 3 days, in the area of bleeding was observed initial minimal infiltration with macrophages. Their numerical representation (density) progressed in the

following experimental groups, B and Г, ie in bruises aged 3 to 7 and 7 to 14 days. The obtained results were statistically processed and showed significant values in the compared groups, evaluated by Student`s t test (paired groups). Results showed that density of neutrophils in group A compared to density of neutrophils in group B, proved to be statistically significant with $p < 0,0001$. Evaluation of density of macrophages in group A and Б showed statistically signification in favor of group B, with $p < 0,0001$. The same statistically findings were evaluated for group Б and B, and B and Г, when these groups were tested with paired groups Student`S t test, with statistically significans of $p < 0,0001$. These findings suggest that density of macrophages rise in older bruises, ie in in bruises aged 3 to 7 and 7 to 14 days. The use of several complementary methods has given us the opportunity to design a simple algorithm in interpreting the age of bruises.

Conclusion: In the biological process of repairing in bruises, different cells of the immune system are active in different time instance. Neutrophil granulocytes are activated as soon as the bruise occur. They are replaced with macrophages within a few hours, which, after a few days, begin to actively metabolize the iron from the bleeding area, producing enzyme HO-1.

Keywords: bruises, age determination, observation, histological analysis, immunohistochemistry.

1. ВОВЕД

1.1. Макроскопска презентација на крвните подливи

Крвните подливи претставуваат повреди предизвикани од руптура на малите крвни садови во кожата, кои доведуваат до нејзина дисколорација, но кожата е со зачуван интегритет. Интензитетот на формирање на подливите кореспондира со интензитетот на силата која ги предизвикува, личните особини на организмот или особините на ткивата. Формата на крвните подливи можно е да биде слична на предметот со кој е предизвикан самиот подлив, како на пример за метални шипки, дрвени палки, камења, отпечатоци од тупаници или прсти. Поради оштетување на малите крвни садови крвта се излева во сврзното ткиво на кожата и макроскопски

предизвикува промена на бојата на кожата. Крвните подливи можат да се јават и како резултат на повреда на подлабоките ткива, како на мускулите или при кршење на коските. Ова често се случува при сообраќајните незгоди. Во тие случаи крвните подливи се лоцирани подлабоко, во меките ткива под кожата. Длабоките крвни подливи може да не се презентираат на кожата и за нивно докажување треба да се применуваат длабоки инцизии во ткивата при обдукција [1].

Формирањето на крвниот подлив во кожата предизвикува едем и дисколорација, како и сукцесивна промена во бојата на самиот подлив за време на неговото здравеење. Овие промени се асоцирани со присуство на пигменти од екстравазираните еритроцити во полето на крварење како и метаболирањето на тие пигменти. Промената на бојата е асоцирана со староста на самиот подлив и се случува најпрво на периферијата на подливот, потоа кон неговите централни делови. Имено, иницијалната боја со која се презентираат крвните подливи е црвена. Во наредните 3 дена бојата се менува во пурпурна-виолетова или модро-црна, за во следните денови да премине во зелена. Зелената боја е карактеристична за подливи стари 5-6 дена. Од 7-11 ден подливот добива жолта боја која постепено до 14 ден исчезнува од кожата. Промената на бојата на крвниот подлив зависи од крвната циркулација. Кај здрави индивидуи запазена е оваа временска рамка на промени во бојата и здравеењето на крвните подливи, додека кај индивидуи со пореметена циркулација, болни и стари индивидуи потребно е повеќе време за да настане репарација на подливите. Овие промени се условени и од јачината на силата која ги предизвикала подливите, како и големината на повредените крвни садови. Послабата сила ќе предизвика помал крвен подлив поповршински на кожата што ќе овозможи побрза репарација на крвните подливи. Длабоките подливи не ги презентираат овие промени во бојата во тек на нивната репарација, додека пак крварењето и подливот во конјуктивата се презентира иницијално со црвена боја која подоцна преминува во жолта.

1.2. Фактори кои влијаат на појавата на крвните подливи

Скоро секоја индивидуа во текот на животот има искуство со крвните подливи, меѓутоа некои индивидуи се повеќе склони кон формирање на крвни подливи [2]. Во ризик фактори за појава на подливите се вклучуваат:

- Работа при која незабележително се добиваат удари од тврда површина на кои се навикнуваме и затоа поминуваат незабележано и воопшто не се сеќаваме на ударот
- При некои заболувања на крвта како тромбоцитопенија, леукемија; акутна бубрежна слабост
- Потенка кожа и пофрагилни крвни садови кај повозрасните индивидуи
- Земање на лекови како aspirin или ibuprofen (Advil, Motrin IB) како и земање на антикоагулантни лекови како warfarin (Coumadin), кои влијаат на коагулацијата на крвта [3,4,5]
- Болести поврзани со крварење (болести на сврзното ткиво и крвните садови) [6]
- Дефицит од витамин Ц при скорбут [7]
- Заболувања на дигестивниот систем кои доведуваат до намалување на витаминската апсорпција [8]

Петехиите (petechiae) и екхимозата (ecchymosis) заради својата презентација на кожата најчесто се заменуваат како состојба со крвните подливи. Петехиите и екхимозата се еден вид на хематоми, односно станува збор за крварење предизвикано од патолошка состојба, додека крвниот подлив е резултат на траума или повреда. Петехиите и екхимозата најчесто се јавуваат на кожата и лигавиците при случаи на асфиксија, поради хипоксија и хиперкапнија со последователно оштетување на сидот на капиларите кое доведува до нивна зголемена пермеабилност [9,10]

Петехии на лицето и конјунктивата може да бидат знак на смрт со асфиксија, особено кога се работи за намалено венско враќање на крвта од

главата. Се смета дека петехиите се резултат на зголемување на притисокот во вените на главата и хипоксично оштетување на ендотелот на крвните садови. Петехиите како последица на давење можат да бидат релативно мали (со дијаметар <0.3 милиметри) и светли по боја. Петехии може да се видат на лицето, во белите дробови или во внатрешноста на очните капаци [9].

Екхимозата е поткожно крварење со дијаметар поголем од 1 сантиметар. Таа е слична на крвните подливи и честопати не се разликува од нив. Најчесто е предизвикана од патофизиолошка клеточна функција и некои болести како што е болеста на Марбург вирусот [10].

1.3. Фактори кои можат да ја модифицираат појавата на крвните подливи

- Видот и подлогата на повреденото ткиво
Подливите ќе бидат поекстензивни и полесно ќе се формираат во оние делови на телото каде има поголема количина на ретко сврзно ткиво [околу очите, во скротумот или вулвата]. Во деловите каде кожата налегнува директно на коските [на пример кај дланките или стапалата] крвните подливи поретко се јавуваат поради слабата васкуларизираност на тие делови. Modi [2] посочува дека во некои случаи со трауми на абдоменот при сообраќајните незгоди, крвни подливи на кожата во таа регија може и да не се формираат, а при тоа дури и да постои руптура на внатрешните органи со опсежно внатрешно крварење
- Возраста на повредениот
Кај децата и старите луѓе подливите се јавуваат полесно, бидејќи кај децата компонентите на кожата се со понежна структура, додека кај старите луѓе кожата покажува знаци на стареење и истенчување како и намалено обновување на колагенот што го редуцира нејзиниот еластичитет. Кај старите

луѓе дополнително се среќаваат патолошки промени во крвната циркулација поради промените од стареењето на сврзното ткиво [6,11].

- Полот на повредениот
Кај женските индивидуи крвните подливи полесно се јавуваат поради присуство на потенок дермис, помал волумен на колагенот, понежна структура на колагенот и поголема количина на поткожно масно ткиво, карактеристики кои овозможуваат побрзо формирање на крвниот подлив [12].
- Боја на кожата
Кај индивидуите со светла кожа крвните подливи полесно се јавуваат и се забележуваат, поради опалесцентноста на кожата и помало количество на меланин во неа [13,14].
- Присутни заболувања
Некои заболувања на кардио-васкуларниот систем доведуваат до полесна појава на крвните подливи (автоимуни заболувања на сврзното ткиво, коагулопатии, хипертензија) [6,15,16].

1.4. Медицинско-правно значење на крвните подливи

Во правните процеси кога се работи за случаи каде настапила насилна смрт и притоа задолжително се бара судско-медицинско вештачење, при толкувањето на крвните подливи се посветува големо внимание на описот на овие повреди бидејќи можно е да соодветствуваат со средството со кое настанала повредата, како и со механизмот на повредата. Во нотирање на подливите понекогаш треба да се направи уште една проценка на истите, по околу 24 часа, особено ако е проценката направена непосредно после настанување на повредата, доколку се анализираат крвни подливи кај живи индивидуи. Внимание се посветува на разликување на

крвните подливи од мртовечките дамки (livores mortis) и притоа се бара детален опис на крвните подливи [17,18].

Во форензиката крвните подливи се посебно значајни повреди бидејќи можат да доведат до смрт ако се екстензивни [19,20,21]. Тие се доста чести повреди и одредувањето на нивната старост е еден од често бараните податоци во форензичките вештачења, особено кога се работи за случаи со насилна смрт и злоупотреба кај жени и деца [6], кога треба да се наведат причините за смртта и временската рамка на јавување на повредите.

Постои разлика помеѓу крвните подливи настанати заживотно и промените настанати посмртно. Кај првите постои едем во полето на крвниот подлив, промена на бојата на кожата и коагулација на екстравазираната крв во поткожното ткиво. Овие знаци не се присутни доколку промената се појавила посмртно [3].

Терминот крвен подлив, како повреда подразбира морфо-функционално нарушување на интегритетот на ткивото. Заживотно настанатата повреда се карактеризира со започнување на низа витални реакции кои не се случуваат при постморталните евентуални повреди. Бидејќи виталните реакции се случуваат со одреден временски редослед и динамика, дозволуваат процесот во кој се наоѓа заздравувањето на една повреда да го одреди и времето на настанување на повредата [21].

1.5. Микроскопска презентација на крвните подливи

Микроскопски, крвните подливи претставуваат повреди кои се презентираат со излевање на крв во сврзното ткиво на кожата, или подлабоко во подлежаечките ткива под кожата [12,22]. Најчесто крвта се излева во сврзното ткиво на дермисот и хиподермисот, онаму каде каде што има поголема количина на ретко сврзно или адипозно ткиво и помал отпор на ткивото. При настанување на крвните подливи се раскинуваат помалите крвни садови во кожата кои одговараат на границите на подливот, додека пак околното ткиво е со интактна структура. Раскинувањето на крвните садови предизвикува активирање на процесот на коагулација при што на

местото каде е оштетен крвниот сад се формира фибринска мрежа проткаена со тромбоцити (127). Покрај првичните знаци на повредата, како што е едемот во близина на хеморагијата кој резултира со проширување на фиброзните септи, безјадрените еритроцити надвор од крвните садови го активираат воспалителниот одговор на организмот, по што во полето на крварење набрзо доаѓа до инфилтрација со воспалителни клетки најпрво со гранулоцити, а потоа со макрофаги [22]. Во здравото ткиво на кожата, околу крвниот подлив, нормално не се наоѓаат гранулоцити. Ретко може да се забележи по некој макрофаг во сврзното ткиво на дермисот, но со соодветен метод на хистохемиско боење може да се интерпретира неговото значење и поврзаност со крвните подливи [29,30].

Крвните подливи настануваат заживотно, додека постморталното крварење се опишува како хипостаза. За да настане подливот треба да се исполнети три критериуми. Прв критериум е силата која делува на кожата, треба да биде тапа сила која ќе предизвика раскинување на крвните садови во неа, но притоа да не биде нарушен нејзиниот интегритет. Втор критериум е крвниот притисок, кој треба да биде доволно висок за да овозможи екстравазација на крвта во сврзното ткиво на кожата. Трет критериум е местоположбата на излеаната крв. Крвта треба да се излеа доволно близу до површината на кожата за да може да биде забележана како крвен подлив [23]. Крвниот подлив настанат заживотно може да не биде видлив поради опалесцентноста на кожата [23,24], но посмртно ќе биде откриен поради појавата на рефлексивна во неа [25]. Раната манифестација на крвните подливи е зависна од два фактори: екстравазација на крвта од крвните садови во околното ткиво и длабочината во кожата каде што е излеана крвта [26,27,28].

Откако ќе се формира крвниот подлив организмот реагира со активирање на инфламаторниот одговор и притоа на местото на подливот следи миграција на воспалителни клетки, најпрво неутрофилни гранулоцити и подоцна мононуклеарни макрофаги [31,32]. Нивната инфилтрација се јавува во одреден временски интервал што овозможува

преку специфичниот хистолошки наод да се толкува староста на крвните подливи [33].

1.6. Методи за одредување на староста на крвните подливи

Одредувањето на староста на крвните подливи започнува со дефинирање на макроскопскиот изглед на подливот со метод на опсервација, за подоцнежната анализа да опфати микроскопски и имунохистохемиски методи за детално утврдување на морфо-хистолошките промени во ткивото на крвниот подлив.

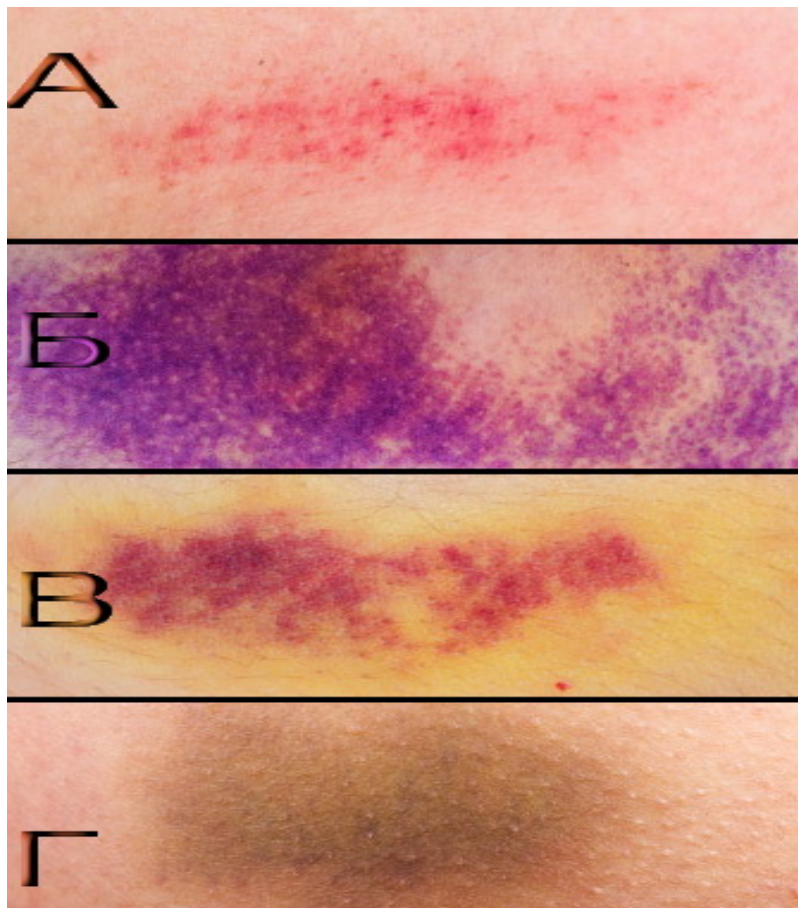
Во минатото главен метод за анализа на крвните подливи и утврдување на нивната старост бил опсервациониот метод [13,34,35]. Перцепцијата на бојата во крвните подливи при опсервацијата различни аналитичари може различно да ја толкуваат, особено појавата на жолтата боја, која се јавува неколку дена по иницијалното појавување на подливот. Субјективноста во толкувањето на колоритната карактеристика на крвниот подлив се смета за негативна страна во овој метод на анализа [14]. Повеќе автори, како Adelson, Camps, Rentoule, Poison, Spitz, даваат класификација на староста на крвните подливи според бојата, користејќи го макроскопскиот изглед на подливите, табела 1 [36]. На слика 1 е прикажана промената на бојата на крвните подливи, сукцесивно, која е првичен показател за проценката на староста на истите.

Табела 1: Класификација на староста на крвните подливи според бојата, според 5 публикувани шеми од различни автори

Боја	Adelson	Rentoule	Camps	Poison	Spitz
Иницијална боја	Црвена/ сина	Виолетова	Црвена	Црвена/ црна	Сина/ црвена
Од 1-3 дена	Сина/ кафеава	Темно сина	Сина/ кафеава	Виолетова/ црна	Виолетова/ црна
По 1 недела (7 дена)	Жолта/ зелена	Зелена	Зелена	Зелена	Зелена/ жолта
Од 8-10 дена		Жолта	Жолта		Кафеава
По 2 недели (14 дена)		Нормална	Нормална	Жолта	Нормална

Слика 1: Макроскопски видливи стадиуми на промена на бојата кај крвните подливи, во различни временски интервали (од формирање до ресорбирање на подливот)

Сликата е превземена од WebMD on Pedialine



Легенда - А (свежи крвни подливи) - нежно црвено пребојување на кожата

Б (крвни подливи со старост од 1 до 3 дена)-
виолетово-пурпурно пребојување на кожата
В (крвни подливи со старост од 3 до 7 дена)- се
јавуваат жолти тонови, со примеса на виолетови нијанси
Г (крвни подливи со старост повеќе од 7 дена)- кафеаво
пребојување со тенденција кон нормална боја на кожата

Хистолошката анализа на ткивото со подливот ни дава подетални и посигурни информации за неговата старост [37,38]. Со микроскопската анализа на клеточниот инфилтрат во полето на крварење попрецизно може да се толкува времето на настанување на крвниот подлив. Станков во својата студија за микроглијалната активација кај кортикалните мозочни нагмечувања наведува активирање на микроглија клетките (макрофаги во мозочното ткиво) после првиот ден на повредата и нивно понатамошно активирање кое корелира со староста на мозочното нагмечување (подлив) [94]. Доминацијата на неутрофилни гранулоцити во полето на крварење дава насока во прилог на свеж подлив, додека доминантна инфилтрација со макрофаги во полето на крварење оди во прилог на постар подлив кој преминува во фаза на репарација. Betz и Eisenmenger во својата морфометриска студија опишуваат значително количество на хемосидерин во макрофагите, околу 20% и повеќе од видното поле, кое индицира старост на крвниот подлив од околу 1 седмица [32]. Raekallio J. утврдил и присуство на фибрин во субкутаните хеморагии, но заклучил дека згрутчувањето во ткивото со хеморагија може да се јави и посмртно и дека тоа не е доказ за витална реакција [101].

Имунохистохемиската анализа на полето на крварење дава нов момент за анализа на времето кога е формиран крвниот подлив. Овој метод со употреба специфично анти хем-оксигеназа 1 (НО-1) антители го детектира истоимениот ензим кој го продуцираат макрофагите кога ќе го населат полето на крварење. Ензимот НО-1 е одговорен за метаболирање на хемоглобинот од екстравазираните еритроцити. Nakajima T et al. во својот труд за субкутани хеморагии ја анализирале експресијата на ензимот НО-1 и инфилтрацијата со макрофаги [126]. Тие дошле до заклучок дека детерминирањето на НО-1 експресијата може да даде корисни информации

во одредувањето на староста на крвните подливи [126]. Метаболирањето на хемоглобинот понатаму во репарацијата на крвниот подлив доведува до промена на бојата со која макроскопски се презентира подливот, табела 2, [31,39,40,41].

Табела 2: Промена на бојата кај крвните подливи во зависност од молекулот присутен во полето на крварењето [105]

Боја на крвниот подлив	Молекул што ја предизвикува	Време на јавување
Розе-црвена	Хемоглобин (оксигениран)	Време на повредата
Сина, пурпурна, црна	Хемоглобин (деоксигениран)	Во првите часови од настанување на повредата
Пурпурна или црна	Хемоглобин и железо	1 - 5 дена
Зелена	Биливердин	Неколку дена до неколку недели од настанување на повредата
Жолто-кафеава	Билирубин	Неколку дена до повеќе недели од настанување на повредата

Имајќи ги предвид можностите кои ги нудат погоре споменатите методи за анализа на староста на крвните подливи, нивната комбинирана употреба може да даде прецизни информации во врска со времето на иницијалната појава на подливите и последователно нивната репарација.

При толкувањето на крвните подливи треба да се земе предвид нивната презентација и да се внимава да се направи разлика од промените познати како мртвечки дамки кои исто така ги нотираме по настапување

на смртта. Имено, мртовечките дамки настануваат како резултат на застој на крвната циркулација после настапување на смртта, под дејство на Земјината гравитација, која се карактеризира со преполнување со крв на субепидермалните крвни садови. Притоа, крвните садови се неоштетени и во нив се таложат еритроцитите како клетки потешки од серумот. Мртовечките дамки се најизразени во деловите на телото што висат или се најниско поставени. Во табела 3 се дадени карактеристиките за диференцирање помеѓу крвните подливи и мртовечките дамки [42,43].

Табела 3: Диференцирање меѓу мртовечки дамки и крвни подливи

Мртовечки дамки	Крвни подливи
Се јавуваат поради преполнети крвни садови, ги гледаме во субепидермалните крвни садови	Се јавува поради раскинување на крвните садови кои се лоцирани во кожата или подлабоко
Се јавуваат само на делови на телото кои висат или се најниско поставени	Се јавуваат било каде на телото
Имаат дефинирани рабови кои со јасна граница ги одделуваат од околното здраво ткиво	Рабовите дифузно преминуваат на околното здраво ткиво
Немаат едем и ексоријации	Едем и ексоријации може да се присутни
Ако се направи рез, крвта истекува и може да се измие	Ако се направи рез, крвта истекува и не може лесно да се измие
При микроскопска анализа нема знаци за инфламација	Секогаш постојат знаци за инфламација при микроскопска анализа
Униформна боја	Може да варира во нијанси

Крвните клетки се наоѓаат во крвните садови	Крвните клетки не се наоѓаат во крвните садови, туку надвор од нив, ВО ОКОЛНОТО ТКИВО
---	---

2. МОТИВ

Мотивот на студијата беше да утврдиме методологија која, според релативната едноставност и дополнителните податоци кои ги обезбедува, може да биде рутински применувана во случаите од судско-медицинската пракса, во расветлувањето на сознанијата за времето на настанувањето на крвните подливи кај случаите со насилна смрт.

3. ХИПОТЕЗА

Хистолошките промени во ткивото, како резултат на активирање на имунолошкиот систем, каде се создал крвниот подлив и во неговата непосредна околина се специфични за периодот кој поминал од настанувањето на крвниот подлив до денот на обдукцијата.

4. ЦЕЛИ

1. Да конципираме методологија за хистолошка анализа на крвните подливи настанати во кожата.
2. Со помош на применетите методи да ги регистрираме хистолошките промени во ткивото со крвни подливи и ткивото во нивната непосредна околина.
3. Да ја утврдиме динамиката на инвазија на воспалителни клетки (прогресивна / пик / стагнација / опаѓање) и со тоа да ги утврдиме ограничувањата на микроскопскиот метод.

4. Со споредба на наодите од применетите методи да ги утврдиме разликите во испитуваните компоненти на ткивото кај крвните подливи со различна старост.

5. Да ги споредиме сознанијата од микроскопската анализа со опсервацискиот макроскопски наод и да видиме дали воочените хистолошки промени во ткивото можат да го допрецизираат времето на настанувањето на крварењето.

5. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

5.1. Дизајн на студијата

Ова истражување претставува опсервациска проспективна студија базирана на хистолошка (квалитативна, стереолошка, морфометриска, хистохемиска и имунохистохемиска) анализа на ткивни исечоци од хумана кожа која содржи крвни подливи. Неговата цел е да се утврдат хистолошките карактеристики на кожата зафатена од крвниот подлив, да се

утврдат евентуалните специфики на ткивото со подливи со различна старост и да се споредат со податоците од макроскопската опсервација, со што би се допринело во утврдувањето на степенот на полезноста на микроскопската анализа во одредувањето на староста на крвните подливи, особено значајно при судските вештачена кај лица починати од насилна смрт. Материјалот е собиран во период од 2014-2018 година.

5.2. Материјал

5.2.1. Селекција на материјал за истражување

5.2.1.1. Инклузиони критериуми

- Од лица починати од насилна смрт, од двата пола
- Од лица починати пред не повеќе од 48 часа
- Од лица постари од 18 години

5.2.1.2. Ексклузиони критериуми

- Од починати лица од природна или насилна смрт за кои во анамнезата постои податок за заболувања кои предизвикуваат промени во коагулацијата и крварење (кај одредени заболувања на кардиоваскуларниот и дигестивниот систем)

- Од починати лица од изгореници (поради оштетување на епидермисот и дермисот на кожата од термичка повреда)
- Од лица починати пред повеќе од 48 часа (процеси на автодигестија и путрефакција)
- Од лица помлади од 18 години (поради карактеристиките во фрагилноста на кожата додека расте организмот)

5.2.2. Материјал за истражувањето

Материјал за нашето истражување беа крвните подливи кои беа предмет на судско-медицинска обработка кај лица починати од насилна смрт. Ткивните примероци потребни за нашата анализа беа земани во текот на рутинските обдукции на Институтот за судска медицина и криминалистика во Скопје.

Во истражувањето се вклучени примероците од крвни подливи кои:

- Биле присутни во времето на изведувањето на обдукциите на лица починати од насилна смрт;
- Биле потврдени од страна на судските вештаци (врз база на макроскопските карактеристики) дека настанале пред или во времето на настанување на смртта.

Со секој примерок беа обезбедени и 1) податоците за претпоставената старост на крвниот подлив, 2) податоците за настанувањето на смртта од

протоколите за извршена судско-медицинска обдукција како и 3) соодветната фотодокументација.

Материјалот за анализа потекнува од лица починати од насилна смрт, од двата пола, со старост помеѓу 18 и 68 години.

Сите примероци беа земани на идентичен начин, со почитување на следниве правила:

- Исечокот да оди до длабочина на целата кожа, заедно со хиподермисот;
- Димензиите на исечоците да бидат од 1-4см²;
- Примерокот да го содржи подливот
- Од истото лице земен е и примерок од периферните рабови каде подливот преминува во здраво ткиво;

5.2.3. Класификација на материјалот за истражување

Материјалот за анализа потекнува од вкупно 60 починати лица. Од сите нив има специфичен ткивен исечок: освен од крвниот подлив, земен е и примерок од периферните рабови каде подливот преминува во здраво ткиво за да послужи за анализа на реакцијата на ткивото непосредно до крварењето, како и за анализа на нормалното ткиво во кое нема крварење (вкупно 120). Добиените примероци беа примарно поделени во 4 групи, класифицирани според претпоставената старост на подливот.

Табела 4 : Класифицирање на материјалот во групи зависно од макроскопски претпоставената старост на крвниот подлив

Ткивни исечоци од кожа	Примероци	Групи
со подливи не постари од 24 часа (свежи крвни подливи)	од 15 лица	А
со подливи стари меѓу 1 и 3 дена	од 15 лица	Б
со подливи стари меѓу 3 и 7 дена	од 15 лица	В
со подливи стари меѓу 7 и 14 дена	од 15 лица	Г

Табела 5: Приказ на 120 подгрупи на крвни подливи кои го сочинуваат целосниот материјал за истражување.

Легенда - Броевите 1,2,3,..14,15 го означуваат редниот број на примерокот. А, Б, В и Г ги претставуваат примероците од ткивото со крвни подливи, додека пак АК, БК, ВК И ГК ги претставуваат примероците од ткивото покрај рабовите на крвниот подлив.

A-1 + АК-1	A-2 + АК-2	A-3 + АК-3	A + АК 4,5,6,7,8,9,10,11,12,13	A-14 + АК-14	A-15+АК-15
------------	------------	------------	-----------------------------------	--------------	------------

Б-1 + БК- 1	Б-1 + БК- 1	Б-1 + БК- 1	Б + БК 4,5,6,7,8,9,10,11,12,1 3	Б-14*+БК- 14	Б15+БК- 15
В-1 + ВК- 1	В-1 + ВК- 1	В-1 + ВК- 1	В + ВК 4,5,6,7,8,9,10,11,12,1 3	В-14+ВК- 14	В-15+ВК- 15
Г-1 + ГК- 1	Г-1 + ГК- 1	Г-1 + ГК- 1	Г + ГК 4,5,6,7,8,9,10,11,12,1 3	Г-14+ГК- 14	Г-15+ГК- 15

5.3. Методи

5.3.1. Метод на опсервација

Макроскопската анализа на крвните подливи подразбира нотирање на местоположбата на подливот, регијата од телото во која се јавил, проценка на длабочината, опис на големината и формата, како и толкување на пребоеноста на самиот подлив. При макроскопската анализа секогаш крвните подливи се фотодокументираат, на фотографијата стои размер што овозможува повторно толкување на наодот. Предноста на овој метод на

анализа е неговата лесна применливост без дополнителни материјални трошоци. Негативна страна на овој метод е субјективноста во толкувањето на пребоеноста на крвните подливи, од причина што различни вештаци може да имаат различна перцепција на боите. Исто така осветлувањето за време на анализата како и пигментацијата на кожата може да влијаат во толкувањето на староста на крвните подливи. Сето ова го прави макроскопскиот метод за анализа недоволно сигурен. Доколку овој метод се користи во клиничката пракса тогаш е возможно да се направат серија фотографии кои го прикажуваат менувањето на бојата на крвниот подлив. Во оваа студија податоците за макроскопската анализа се комплетно превземени од хистопатолошкиот протокол кој се прави при обдукцијата.

5.3.2. Метод на микроскопска анализа

Хистолошка обработка на материјалот

Ткивните примероци беа процесирани до хистолошки резони и се анализираа на Институтот за Хистологија и ембриологија при Медицинскиот факултет во Скопје.

Сите примероци беа процесирани според стандардите за хистолошка обработка:

- Фиксирани во 10% формалин;
- Вклопени во парафински блокчиња;
- Сериски режени со дебелина од 4 микрони;

Применети методи за боене на ткивните примероци

Основен метод

Haematoxilin - eosin како рутинска метода за боење на ткивните пресеци, при првичната хистолошка анализа.

Дополнителен метод

Хистохемиски боења

Giemsa метод

Ова боење се употребува како златен стандард за диференцијација на клетките на крвта, особено во крвните размаски. Понекогаш се користи и за визуелизирање на паразити во крвта. Принципот на боење комбинира базична метилен блу боја и ацидна еозин боја коишто даваат широк спектар на боење на клетките на крвта.

Резултати од боењето

- Цитоплазма на клетките..... црвена
- Јадра на клетките..... сино-виолетови
- Еритроцити..... црвени

Van Gieson elastica метод

Овој метод овозможува селективно визуелизирање и одвојување на фибриларните структури во сврзното ткиво, како што се еластичните и колагените влакна.

Принципот на бојење е комбинација од Resorcin – fuchsin методот по Weigert со picrofuchsin методот по Van Gieson и техниката на бојење на јадрата по Weigert.

Резултати од бојењето

- **Колагени влакна..... црвени**
- **Еластични влакна..... црни**
- **Еритроцити..... жолти**
- **Мускулни влакна..... црвени**

PAS (Periodic acid - SCHIFF) метод

Овој метод на бојење овозможува прикажување на неутрални полисахариди во ткивото. Често макрофагите во својата цитоплазма содржат PAS позитивни инклузии, поради оптовареност на цитоплазмата со резидуални телца при фагоцитирање на клетките на имуниот одговор

Методот се заснова на следниот принцип: во хистохемијата SCHIFF-овиот реагенс регуларно се употребува за идентификација на алдехидите, во PAS реакцијата несупституираните 1,2 гликоли се оксидираат со примена на перјодната киселина како оксидативен реагенс. Овие алдехиди реагираат со SCHIFF-овиот реагенс и формираат светло црвено до црвено обоен комплекс.

Резултати од бојењето

- **Макрофаги..... нијанси на црвена**

Perl's Prussian Blue метод

Овој метод на бојење овозможува визуелизација на макрофагите, базирано на нивната способност за фагоцитоза на екстравазирани еритроцити и последователно метаболирање на хемоглобинот присутен како хемосидерин во макрофагите. Хемосидеринот се бои изразено сино.

Методот се заснова на следниот принцип: хидролизата на дилутираната минерална киселина од ткивните депозити ослободува железни јони $[Fe^{3+}]$ врзани за протеините. Тие во присуство на фероцијанидни јони, се преципитираат како високо обоени и мошне стабилни комплекси од калиум фери фероцијанид, нерастворливи во вода. Обоените комплекси се именувани како Prussian Blue.

Резултати од бојењето

- Железни соли..... темно сино
- Јадра..... црвени
- Еритроцити..... жолти

Трихромни методи на бојење

Masson – Goldner метод

Овој метод се базира на употребата на три различни раствори за селективно визуелизирање на различни структурни елементи – колагени влакна, мускулни клетки, фибрин, еритроцити.

Принципот на методот се базира на постапно бојење на различните структурни елементи со следните бои: Weigert-ов железен хематоксилин, azophloxine, orange-G и контрастено бојење со светло зелен (light green) раствор.

Резултати од бојењето

- Цитоплазма светло портокалово,црвено
- Еритроцити светло портокалово,црвено
- Јадра темно кафеави, црни
- Колагени влакна зелени
- Мускулни влакна светло портокалово,црвено

Имунохистохемиски методи

Апликација на анти хем-оксигеназа-1 (НО-1) антителио

Имунохистохемиските боења се применуваат за да се потврди и визуелизира присуство на некој специфичен протеин во ткивото. За таа цел во процедурата на боење се применува моноклонално антителио специфично за тој протеин (кој тука е во улога на антиген). Со нивното поврзување се добива комплекс (АТ-АГ) и истиот со примена на боја станува видлив. Во нашиот случај целта беше да потврдиме присуство на ензимот хем-оксигеназа-1 во макрофагите и со тоа да покажеме дали се одвива процес на фагоцитоза на еритроцитите и метаболирање на хемоглобинот како манифестација на одбранбената реакција на ткивото.

Протокол на боење

1. Изложување на целниот протеин (антигенот) во ткивото– со 10 mM натриум цитрат (pH 6.0) во тек на 8-15 мин во микробранова печка на 700W (процедура наречена antigen retrieval)
2. Супримирање на ендогената пероксидаза во ткивото - преку нејзино блокирање со Peroxidase blocking reagent (Daco Cytomation) во тек на 10 мин на собна температура.
3. Блокирање на можноста за неспецифично врзување на антителиото – со 10 минутна инкубација во Protein Block Serum Free (Daco Cytomation).
4. Аплицирање на моноклоналното антителио Heme-Oxygenase-1 (продукт # MA1-112, Thermo Fisher Scientific, Waltham MA USA) разредено во Antibody Diluent (Daco Cytomation) во разредување 1:100 и инкубација во влажна комора во тек на 2 часа.
5. Детекција на антителиото со помош на En Vision+ two step визуелизирачка техника (Daco), со хромоген DAB.
6. Контрастно боење со хематоксилин апотоа дехидрирање во етанол.

Резултат од боењето

- Макрофаги.....кафеави

Квалитативна хистолошка анализа

Овој метод подразбира толкување на клеточниот наод и ткивните промени во подливот и во околното здраво ткиво, кои се поврзани со низа биохемиски и клеточни промени при неговото настанување.

Квалитативната хистолошка анализа беше изведена со фазно-контрасен светлосен микроскоп, Nikon Eclipse E400, Nikon Corporation, Јапан, поврзан со дигитална камера Bresser, tv lens c-0.45x со компјутерски програм за документирање на резултатите. За анализа беа употребени препаратите боени со хистохемиски техники (Van Gieson elastic, Perl's Prussian Blue, PAS) и трихромни техники (Masson – Goldner), поради селективниот приказ на анализираните параметри.

Квантитативна хистолошка анализа

Стереолошка анализа

Стереологијата претставува метод на тродимензионално толкување на дводимензионалните пресеци на ткивата. Овозможува преку практични техники и математички формули добивање на квантитативни информации за структурата на тродимензионален материјал (ткиво) од мерења направени на дводимензионални рамни пресеци на материјалот (ткивото). Стереологијата е метод што користи рандомизирано, систематско земање на мостри за анализа со цел да обезбеди непристрасни и квантитативни податоци.

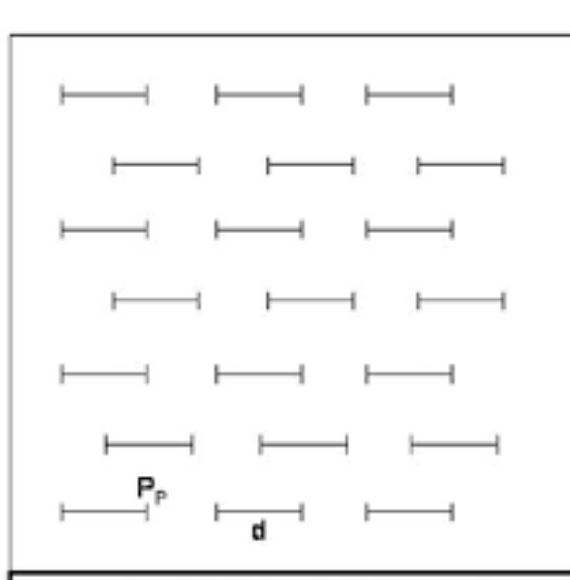
Во оваа студија со примена на стереолошка анализа ја определивме нумеричката густина на неутрофилите и макрофагите во полето на крвниот подлив како и во соседното здраво ткиво, т.е. го анализиравме бројот на испитуваниот параметар во единица волумен од ткивото. Со определувањето на нумеричката густина на неутрофилите и макрофагите добивме поконкретна претстава за следново:

1. Колку се присутни во интакното ткиво на кожата;

2. Дали постои разлика во нивното присуство во интактното ткиво, на самиот раб околу крварењето и во самиот крвен подлив;
3. Дали се менува (и како) нивниот број во полето на крварењето во зависност од времето поминато од настанувањето на крвниот подлив;
4. Дали нивната инвазија во крвниот подлив е прогресива или пак достигнува пик и потоа стагнира или опаѓа.

Квантитативната хистолошка анализа беше изведена со светлосен микроскоп OLYMPUS CX21, Olympus Corporation, Tokyo, Japan, со употреба на окуларен M42 тестен систем – Weibl, WILD Heerbrugg Switzerland (слика 2) и окуларна морфометриска мерица Carl Zeiss Jena, 1/0.01, Germany со нумериран линијар Nikon CFWE 10XA/18 Japan (слика 3).

Слика 2 – м42 тестен систем - Weibl 10xK



Легенда - P_p – број на тестни точки (42) во системот
d - должина на тестната отсечка (66.6µm)

(дебелите линии десно и долу на тестната ареа означуваат кои клетки треба да се бројат во анализата од периферијата на тестната ареа)

Определувањето на нумеричката густина на неутрофилите го изведовме на препаратите боени по Giemsa, додека нумеричката густина на макрофагите ја определивме на препаратите боени по Perl's Prussian Blue и на препаратите од ткивото третирани со анти (НО-1) антителио.

Нумеричката густина на одреден елемент (во нашата студија - клетките) во ткивото ја одредивме според следнава стереолошка формула:

$$NV=NA/D$$

$$NA=N/At$$

$$At=36.36 \times d^2$$

NV – нумеричка густина

NA - број на клетки во единица волумен

N - број на изброени клетки на тестната ареа

At - тестна ареа (се одредува за соодветното зголемување на микроскопот)

d - должина на тестната отсечка во м42 тестниот систем - 66.6µm

Pp - број на тестни точки (42)

D - просечен дијаметар на клетката

Морфометриска анализа

Оваа анализа ја применивме за да го определиме просечниот дијаметар на клетките што ги испитувавме. Притоа користевме морфометриски окулар со вграден микрометарски линијар со 100 поделоци, Carl Zeiss Jena, 1/0.01 Germany, каде секој поделок има соодветна вредност за различно зголемување со објективите. Со примена на објектен микрометар, Nikon CFWE 10XA/18, Јапан, извршивме баждарење на микроскопот, при што добивме соодветни фактори за корекција при различни зголемувања од објективите. Според тоа за зголемување од x10

една окуларна единица изнесува 99 μm , додека за зголемување од $\times 40$ една окуларна единица изнесува 25 μm . Просечниот дијаметар на клетките (макрофаги, неутрофили) го одредуваме како аритметичка средна вредност од 100 изброени клетки, на сериски пресеци, на 10 видни полиња, со зголемување од $\times 40$.

Слика 3 - Морфометриска микромерица, горна скала и нумериран (објектен) микрометар долна скала



Слика 4 – изглед на ткивото со крвен подлив поставено во парафински блок



Табела 6: Протокол на активностите при анализата на секој поединечен крвен подлив

Општи податоци за лицето од кое е земен примерокот		Пол
		Возраст
Податоци од макроскопската опсервација		Локализација на подливот
		Боја во центар на подливот
		Боја на периферија на подливот
Микроскопски наод на ткивото над крвниот подлив	Структура на епидермисот во споредба со соодветна контрола	

Микроскопски наод на ткивото во самиот крвен подлив	Присуство и изглед на сочуваните ткивни компоненти
	Присуство и локализација на неутрофилите во изливот
	Нумеричка густина на неутрофилите во изливот
	Споредба на нумеричката густина на неутрофилите (со контролна група)
	Присуство и локализација на макрофагите во подливот
	Нумеричка густина на макрофагите во подливот
	Споредба на густината на макрофагите во контролна група

Податоци кои се очекува да се добијат од микроскопската анализа

Со помош на добиените податоци во протоколот ќе добиеме целосни или делумни одговори на следниве прашања:

1. Дали и како со тек на времето се менуваат карактеристиките на:
 - Епидермисот над крварењето
 - Структурата и клеточната популација на соседното здраво ткиво непосредно околу работ на крвниот подлив
 - Самиот крвен подлив по однос на примарните структурни компоненти на ткивото во кое настанал.
 - Самиот крвен подлив, по однос на инвазијата на неутрофили, макрофаги и нивната активна фагоцитоза на хемоглобинот

2. Дали врз основа на разликите во испитуваните компоненти на ткивото кај крвните подливи со различна старост, ќе утврдиме хронолошки промени кои можат дополнително да го допрецизираат времето на настанувањето на крварењето.
3. Кој од применетите методи на боење ќе даде најдобра визуелизација на клеточниот инфилтрат кај крвните подливи со различна старост.

6. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА

Обработка на податоците од квалитативната и квантитативната анализа

Податоците од микроскопската анализа се дескриптивно прикажани, документирани со микрофотографии и прикажани преку атрибутивни и нумерички статистички серии. Прикажани се минималната, максималната, средната вредност и стандардната девијација на нумеричката густина на неутрофилите и макрофагите.

За анализа и креирање на бази на податоци беше применет IBM SPSS v.26 статистички софтвер (IBM, Kingston, NY, USA).

За анализа на податоците беа употребени следниве статистички тестови:

- Student-Newman-Kewls тест [t test]
За споредба на средни вредности на две испитувани варијабли, кои се изразени во нумерички вредности и кога се работи на релативно мал број на примероци, но сепак постои поврзаност меѓу варијаблите. Тестот ќе го користиме за прикажување на нумеричката густина на неутрофили и макрофаги во полето на крварење, кај крвните подливи со различна старост.
- Spearman`s rank correlation,
Преку оваа корелација ќе прикажеме заедничко варирање на две варијабли со цел да се одреди степенот на нивната поврзаност, во нашиот случај нумеричката густина на инвазија на макрофаги во полето на крварење и староста на крвниот подлив.
- one way ANOVA, – оваа анализа на варијанса ќе ја користиме за да утврдиме дали има статистички значајни разлики помеѓу средните вредности за нумеричката густина на неутрофилите и макрофагите во експерименталните групи.

Согласно меѓународните стандарди за био-медицински науки, нивоата на веројатност кај споменатите тестови се 0,05 и 0,01.

7. РЕЗУЛТАТИ

Експерименталните групи во оваа студија, кои се состојат од вкупно 60 ткивни примероци на кожа со крвни подливи, се анализирани со макроскопска и микроскопска анализа. Од обработениот материјал во оваа студија, со првичната макроскопска анализа добиени се податоци за димензиите, локализација на телото, формата и бојата на крвните подливи. Димензиите се движеа од неколку милиметри до повеќе сантиметри, при што имаше и случаи со екстензивни крвни подливи. Според ексклузионите критериуми на оваа студија и етичкиот кодекс за работа со хуман материјал, од големите крвни подливи беше земен мал примерок за анализа, помал од 2 сантиметри. Најчесто кај една индивидуа постоеа повеќе крвни подливи, некаде и дифузни, во различни регии од телото. Во ретки случаи наидовме на изолирани крвни подливи, случаи каде не се работеше за акцидентална насилна смрт. Кај некои примероци од испитуваните подливи формата беше овална, додека некои беа со неправилна, недефинирана форма (табела 7).

Микроскопската анализа беше изведена квалитативно и квантитативно. Квалитативната анализата даде податоци за локализацијата на крвните подливи во кожата како и хронолошки увид во репаративната клеточна инфилтрација на истите. Според локализацијата крвните подливи беа забележани најчесто во дермисот и хиподермисот на кожата (слика 3, 4). Во еден случај беше забележано локализирање на крвниот подлив и во самиот епидермис, покрај зафатеноста на дермисот (слика 2), но притоа епидермисот беше интактен. Хистолошка анализа покажа инфилтрација со различни типови на клетки во полето на крварење (крвниот подлив) во

различни временски интервали. Најпрво беше забележана инфилтрација со неутрофилни гранулоцити (неутрофили), клетки кои по морфолошките карактеристи претставуваат полиморфонуклеарни клетки. Овој наод е карактеристичен за свежите крвни подливи, не постари од 24 часа, група А. Веќе во следната експериментална група Б, кај крвните подливи со старост од 1 до 3 дена, во полето на крварење беше забележана почетна минимална инфилтрација со макрофаги, клетки кои според морфолошките карактеристики претставуваат моноклеарни клетки. Нивната нумеричка застапеност (густина) прогредираше во следните експериментални групи, В и Г, односно кај крвните подливи со старост од 3 до 7 дена и од 7 до 14 дена соодветно. Нумеричката застапеност на неутрофилите и макрофагите во крвните подливе беше анализирана со квантитативна хистолошка анализа, применувајќи стереолошки методи. Овие резултати беа обработени статистички со IBM SSPS statistics v.26 софтвер и покажаа сигнификантни вредности во споредуваните групи, обработени со Student`s t test (paired groups). Имено се покажа како статистички сигнификантна нумеричката густина на неутрофилите во експерименталната група А споредено со групата Б, со $p < 0.0001$. Како статистички сигнификантна се покажа и нумеричката густина на макрофагите кај сите четири експериментални групи, А, Б, В, Г ($p < 0.0001$), споредени една со друга. Со примена на дескриптивна статистика за секоја експериментална група се дефинирани минималните и максималните вредности на нумеричката густина на неутрофилите и макрофагите, како и средната вредност и стандардната девијација. Прикажана е и очекуваната нормална дистрибуција на нумеричката густина на неутрофилите и макрофагите внатре во самите експериментални групи со примена на P-p Plot of Normality Test. Корелацијата меѓу староста на крвните подливи во денови и нивната инфилтрација (нумеричка густина) со неутрофили и макрофаги е прикажана преку Spearman`s Rank Correlation Test, каде се гледа позитивната корелација на тие параметри. Со примена на one way ANOVA, анализа на варијанса, прикажана е статистичката значајност во разликите за средните вредности на нумеричката густина на неутрофилите и

макрофагите во експерименталните групи. Сите овие параметри се систематизирани во рамките на експерименталните групи, при што квалитативната хистолошка анализа е поткрепена со квантитативна хистолошка анализа и аналитичка статистика, прикажана во табели и графикони во рамките на експерименталните групи.

Макроскопски анализа

Табела 7 - сумирани податоци од макроскопската анализа на сите испитувани групи на крвни подливи

	Група А Крвни подливи не постари од 24 часа	Група Б Крвни подливи со старост од 1-3 дена	Група В Крвни подливи со старост од 3-7 дена	Група Г Крвни подливи со старост од 7-14 дена	Група Д Контролна група
Возраст на починатите	18-65	18-64	18-68	18-65	18-68

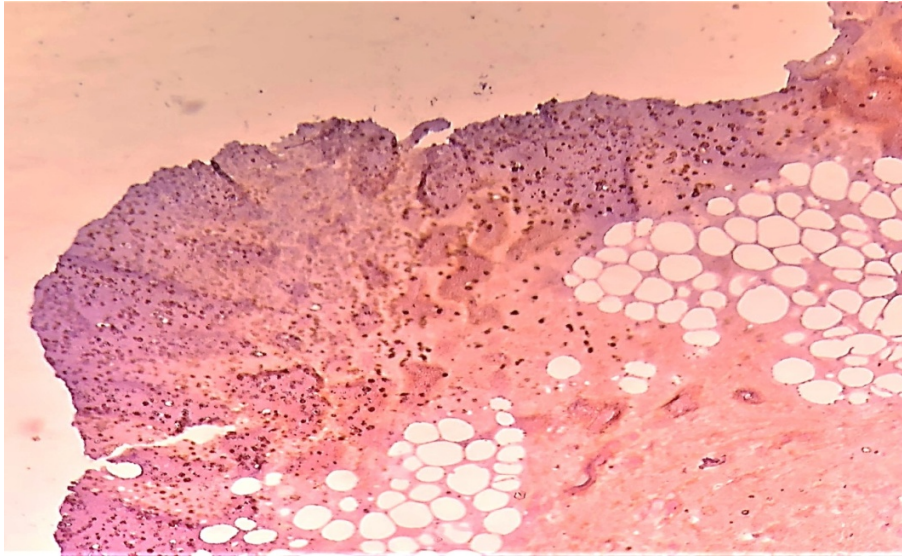
ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Димензии на крвните подливи	13-19 mm	10-17 mm	15-19 mm	15-20 mm	/
Форма на крвните подливи	Неправилна овална, неостро ограничена	Неправилна овална, добро ограничена	Неправилна овална, добро ограничена	Неправилна овална, неостро ограничена	/
Локализација на телото	Горни екстремитети труп и врат	Горни и долни екстремитети и труп	Горни и долни екстремитети и врат	Горни и долни екстремитети и врат	Соседна здрава кожа во истата регија со крвниот подлив
Пребоеност на крвните подливи	Црвеникаво-розева	Темна виолетова	Светло виолетова, нијанси на виолетова	Жолто-зелена	Нормална беж боја (бела раса)

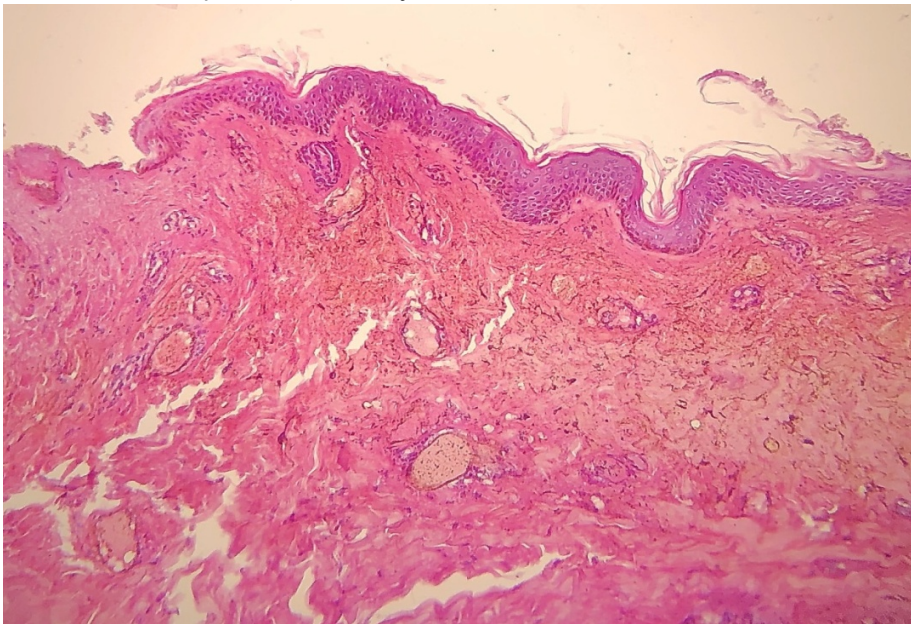
Микроскопска анализа

Локализација на крвните подливи во кожата

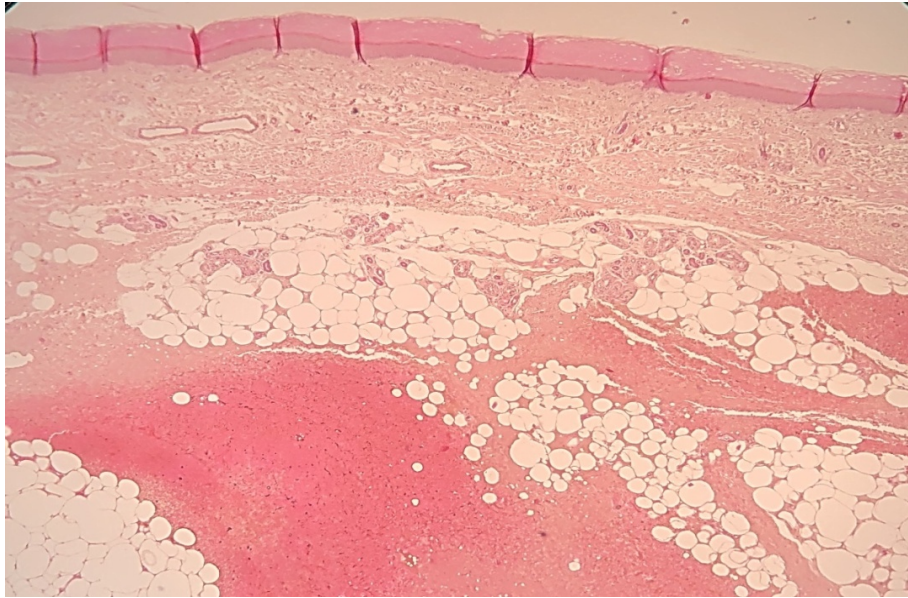
Слика 2- Крвен подлив локализиран во епидермисот и дермисот на кожата
Боење со hematoxillin/eosin и анти НО-1 антитело, зголемување x 10



Слика 3- Крвен подлив локализиран во дермисот на кожата
Боење со hematoxillin/eosin, зголемување x 4



Слика 4- Крвен подлив локализиран во хиподермисот на кожата
Боење со hematoxillin/eosin, зголемување x 4



- **Група А - ткивни исечеоци од кожа со крвни подливи не постари од 24 часа**

Макроскопски наод

Свежите крвни подливи макроскопски покажуваат црвеникаво-виолетова боја. Нејасно се ограничени кон околното здраво ткиво и покажуваат благ едем кој се забележува на површината на кожата (слика 5). Во централниот дел и во периферниот дел на крвниот подлив бојата не е изедначена поради дејството на гравитацијата врз излевањето на крвта. Површината на кожата е интактна, со зачувана морфолошка структура.

Слика 5 - Макроскопски изглед на крвен подлив со старост не повеќе од 24 часа (присуство на црвено пребојување на кожата на местото на дејство на тапата сила поради раскинување на површинските крвни садови во кожата)



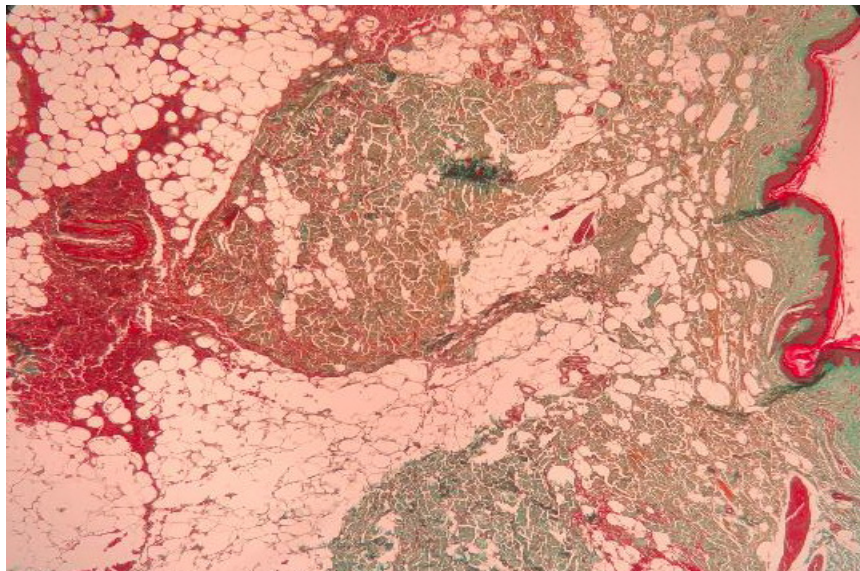
Микроскопски наод – квалитативна анализа

Епидермисот на кожата е со зачувана морфолошка градба, на слика 6 јасно се гледаат сите слоеви во неговата структура. Излевање на крвта кај површинските подливи е локализирано во сврзното ткиво на дермисот, додека кај длабоките крвни подливи излевање на крвта е во фиброзните септи на адипозното ткиво на хиподермисот. Рабовите на крвните подливи се јасно видливи поради локализирање на излеаната крв во фиброзните септи на дермисот или хиподермисот. Се забележува проширување на фиброзните септи како резултат на едемот и екстравазираните еритроцити при крварењето (слика 7). Во полето на крварење се забележува и присуство на фибрин. Микроскопската анализа на свежите крвни подливи во иницијалниот стадиум на формирање покажа присуство на мноштво екстравазирани еритроцити во полето на крварење. Во доцниот стадиум на формирање на крвниот подлив се забележува инфилтрација на полето со неутрофилни гранулоцити-неутрофили (слика 8,9). Инфилтрацијата со неутрофили се забележува низ целото поле на крварење. На слика 10 со примена на специјално боење со антители специфично за макрофаги, анти НО-1 антители, покажано е дека не беше забележано присуство на макрофаги кај крвните подливи од оваа испитувана група.

Микрофотографии

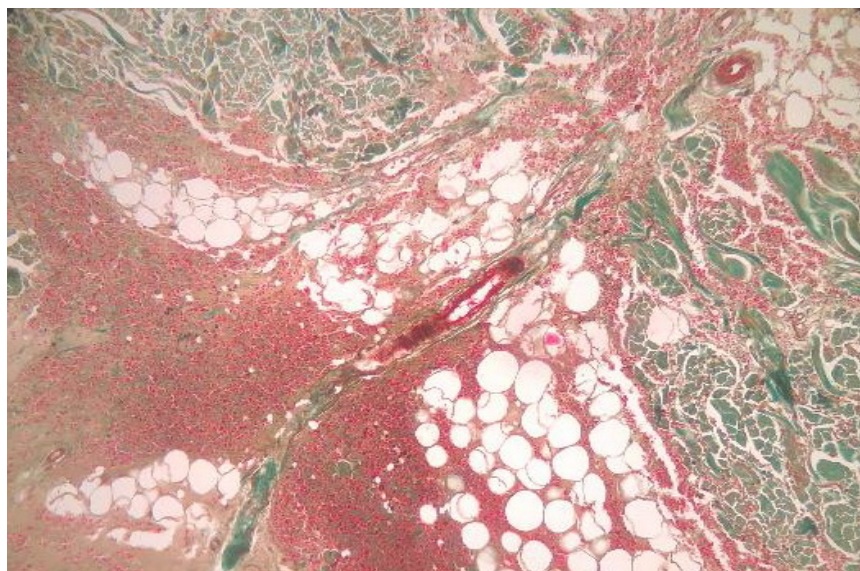
Слика 6- Интактен епидермис на кожата (десно), раскинат крвен сад во подлив от во адипозното ткиво на кожата (лево)

Боење со Masson trichrome green, зголемување x 20



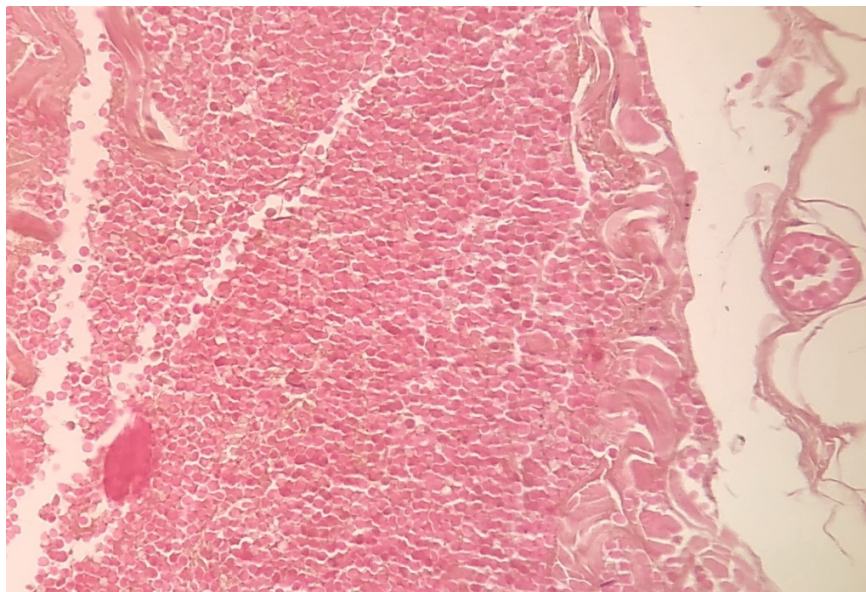
Слика 7- Проширена фиброзна септа во адипозното ткиво на кожата (долу, лево)

Боење со Masson trichrome green, зголемување x 20



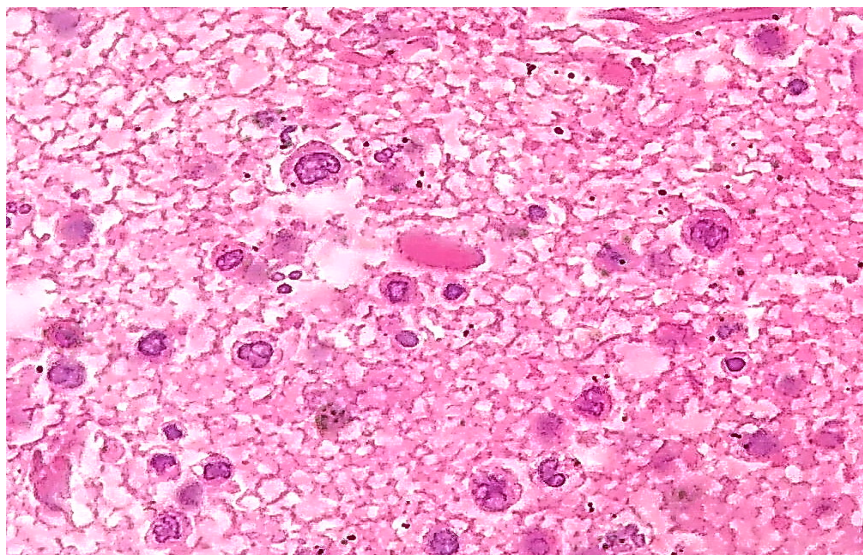
Слика 8- Микроскопски наод кај крвен подлив со старост не повеќе од 24 часа, во иницијален стадиум на формирање, (присуство на мноштво екстравазирани еритроцити во крвниот подлив, сеуште наме инфилтрација со неутрофилни гранулоцити)

Бојење со hematoxillin/eosin, зголемување x 40



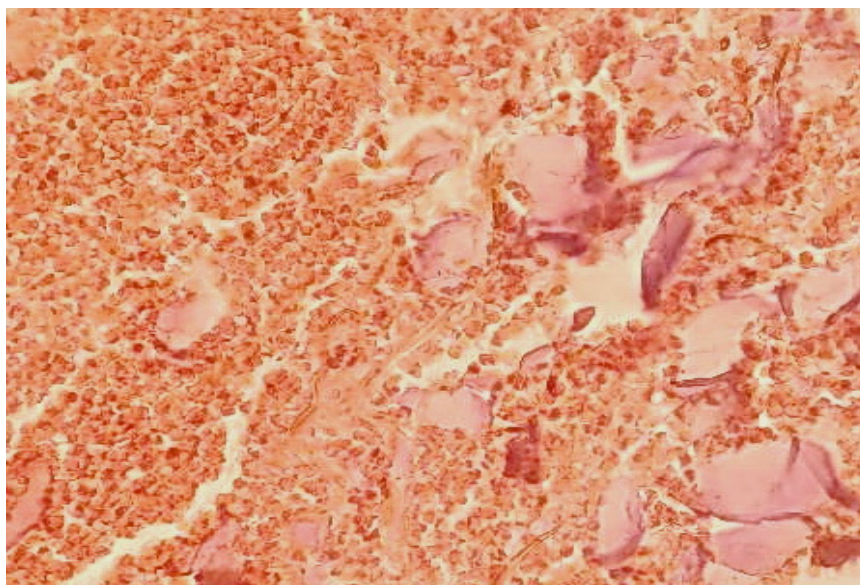
Слика 9 - Микроскопски наод кај крвен подлив со старост не повеќе од 24 часа, доцен стадиум на формирање, (присуство на мноштво екстравазирани еритроцити во крвниот подлив и инфилтрација со неутрофилни гранулоцити)

Бојење по Giemsa, зголемување x 100



Слика 10 - Микроскопски наод кај крвен подлив со старост не повеќе од 24 часа (присуство на мноштво екстравазирани еритроцити во крвниот подлив и отсуство на инфилтрација со макрофаги)

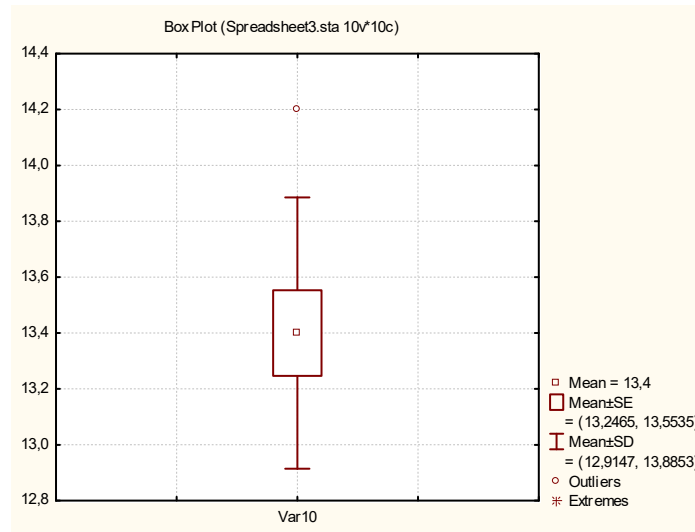
Бојење со анти НО-1 антитело, зголемување x 40



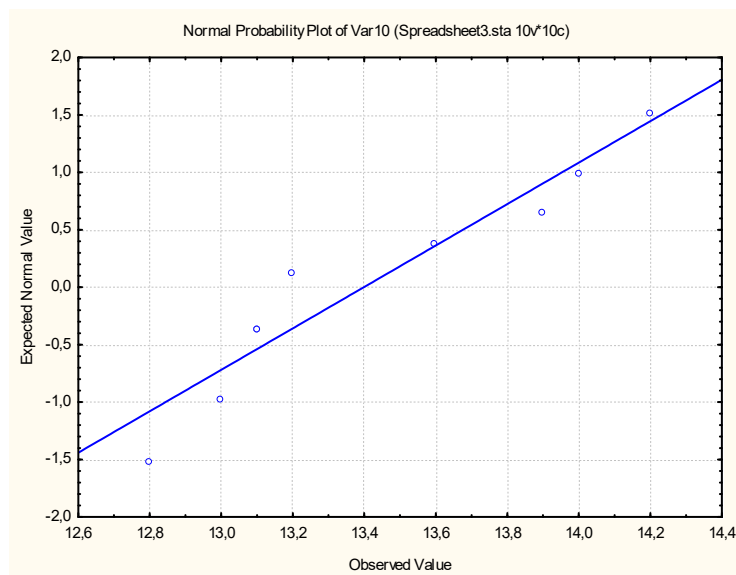
Табела 8 - дескриптивна статистика за нумеричката густина на неутрофили кај крвни подливи не постари од 24 часа (група А)

	N	минимум	максимум	средна вредност(\bar{x})	стандардна девијација(Σ)
Група А	15	12,80000	14,20000	13,40000	0,485341

Графикон 1 – дистрибуција на нумеричката густината на неутрофилите кај крвни подливи не постари од 24 часа (група А)



Графикон 2 – очекувана нормална дистрибуција на нумеричката густина на неутрофилите кај крвни подливи не постари од 24 часа (група А)



Дескриптивните статистички податоци за групата А, односно за крвните подливи не постари од 24 часа, при анализата на нумеричката густина на неутрофилите во полето на крвниот подлив, покажаа минимална вредност од 12,8000 до максимална вредност од 14,2000. Средна вредност за

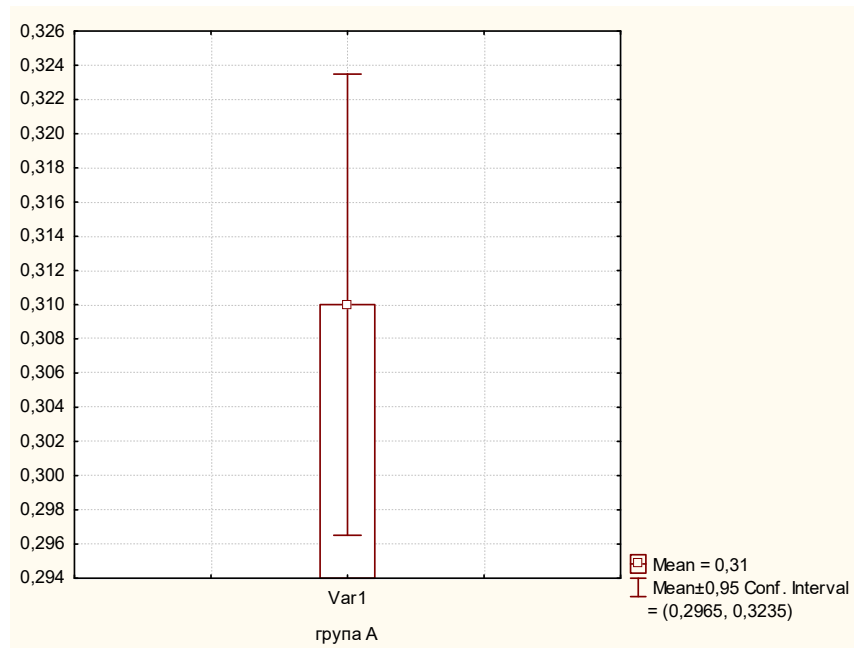
густината на неутрофилите е 13.4000, со стандардна девијација од 0,485341 (табела 8). Истите резултати за дистрибуцијата на нумеричката густина на неутрофилите во оваа група се прикажани графички, на графиконот број 1, додека графикон број 2 ја прикажува нивната очекуваната нормална дистрибуција во полето на крвниот подлив.

Табела 9 - дескриптивна статистика за нумеричката густина на макрофагите кај крвни подливи не постари од 24 часа (група А)

	N	минимум	максимум	средна вредност(\bar{x})	стандардна девијација(Σ)
Група А	15	0.28	0.35	0.3100	0.01886

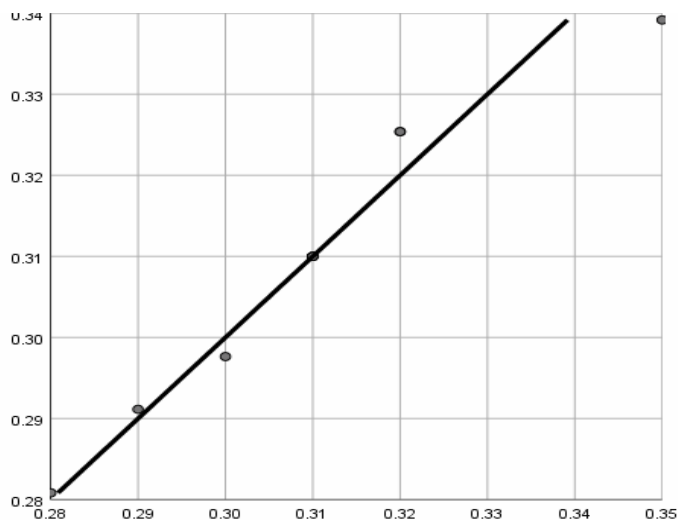
Дескриптивните статистички податоци за групата А, односно за крвните подливи не постари од 24 часа, при анализата на нумеричката густина на макрофагите во полето на крвниот подлив, покажаа минимална вредност од 0,28 до максимална вредност од 0,35. Како средна вредност за нумеричката густина на макрофагите е добиена вредноста од 0.3100, со стандардна девијација од 0.01886 (табела 9). Истите резултати за дистрибуцијата на нумеричката густина на макрофагите во оваа група се прикажани графички, на графиконот број 3, додека графиконот број 4 ја прикажува очекуваната нормална дистрибуција на нумеричката густина на макрофагите.

Графикон 3 – дистрибуција на нумеричката густина на макрофагите кај крвни подливи не постари од 24 часа (група А)



Графикон 4 – очекувана нормална дистрибуција на нумеричката густина на макрофагите кај крвни подливи не постари од 24 часа (група А)

Очекувана нормална дистрибуција



добиена нормална дистрибуција

Табела 10 – т тест за спарени примероци (група А нумеричка густина на макрофаги и група А нумеричка густина на неутрофили)

пар 1	t	df	значајност (p)
група А макрофаги - група А неутрофили	-85,9565	9	0,000000

Во табела 10 се дадени вредности за т тестот при споредба на двата испитувани клеточни параметри во групата А, густина на макрофаги и густина на неутрофили во полето на крвниот подлив. Притоа добиената вредност за $p=0,0000$, со $p<0,0001$, што укажува на значајна разлика во густината на инфилтрација на свежите крвни подливи со овие два типови на клетки, односно во свежите крвни подливи, не постари од 24 часа доминираат неутрофили како клеточен инфилтрат по иницијалното формирање на крвниот подлив.

- **Група Б - ткивни исечоци од кожа со крвни подливи со старост меѓу 1 и 3 дена**

Макроскопски наод

Крвните подливи во оваа група макроскопски покажуваат виолетова боја. Рабовите се веќе јасно дефинирани од околното здраво ткиво. Кај овие подливи се забележува нијансирање на виолетовото пребојување кое соодветствува со метаболизмот на хемоглобинот во полето на крварењето (слика 11). Површината на кожата е интактна, со зачувана морфолошка структура. Низ епидермисот јасно се гледа пребоеноста на крвните подливи.

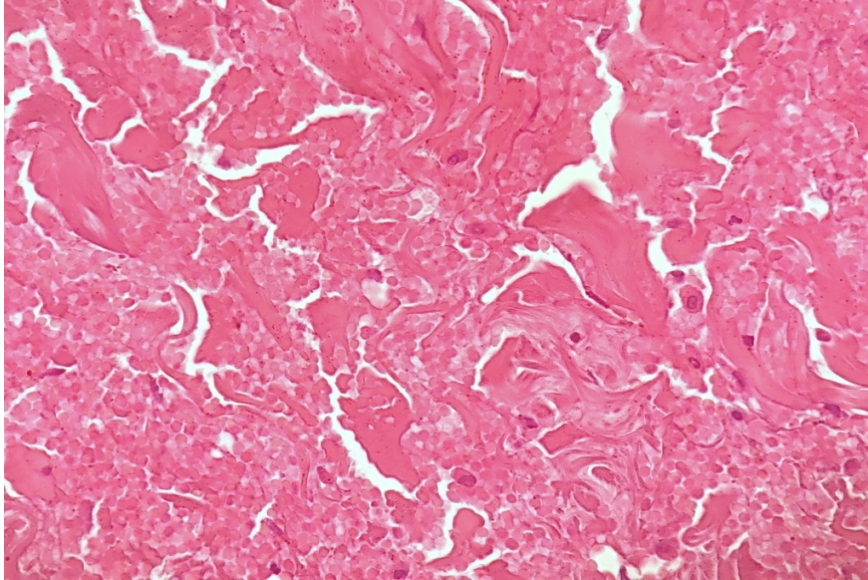
Слика 11 - макроскопски изглед на крвен подлив со старост меѓу 1 и 3 дена (дифузно виолетово-црно пребојување на кожата на местото на дејство на тапата сила)



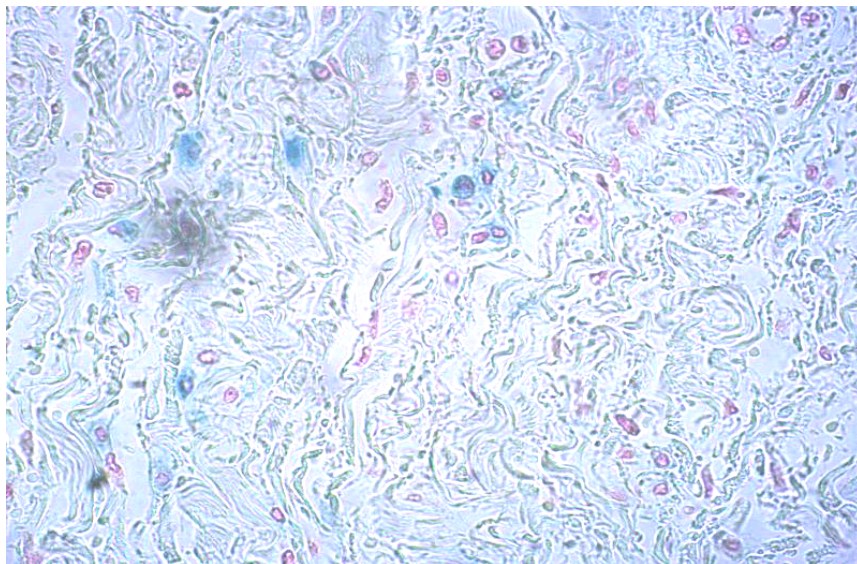
Микроскопски наод

Епидермисот на кожата над крвните подливи е со зачувана морфолошка градба. Излевањето на крвта кај некои подливи е локализирано во сврзното ткиво на дермисот, додека кај некои е во фиброзните септи на адипозното ткиво на хиподермисот. Рабовите на крвните подливи се јасно видливи поради локализирање на излеаната крв во фиброзните септи на дермисот или епидермисот. Микроскопската анализа на клеточниот инфилтрат кај крвните подливи со старост од 1 до 3 дена покажува екстравазирани еритроцити во полето на крварење и оскудно изразена инфилтрација на полето со ретки макрофаги (слика 12,13). Во полето на крварење се забележува присуство на фибрин. На слика 12 присуството на макрофагите е диференцирано со специјалното бојење по Perl`s Prussian Blue, додека на слика 13 нивното присуство е диференцирано со употребата на специфично антителио за макрофаги, анти НО-1 антителио. Фиброзните септи во кожата се сеуште проширени како резултат на екстравазираните клетки-еритроцити и макрофаги прикажани на слика 14. Инфилтрацијата со макрофаги микроскопски се забележува низ целото поле на крварење, но не е особено изразена. Инфилтрација со неутрофили во оваа група не е забележана.

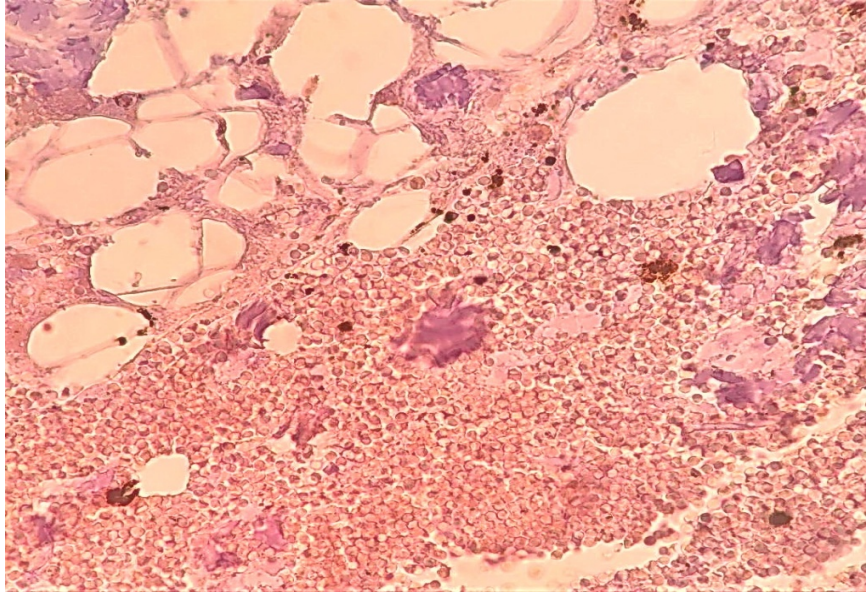
Слика 12-микроскопски наод кај крвен подлив со старост меѓу 1 до 3 дена
(присуство на ретки макрофаги во крвниот подлив)
Бојење со hematoxillin/eosin , зголемување x 40



Слика 13- микроскопски наод кај крвен подлив со старост меѓу 1 до 3 дена
(присуство на ретки макрофаги во крвниот подлив)
Бојење со Perl` s Prussian Blue , зголемување x 40



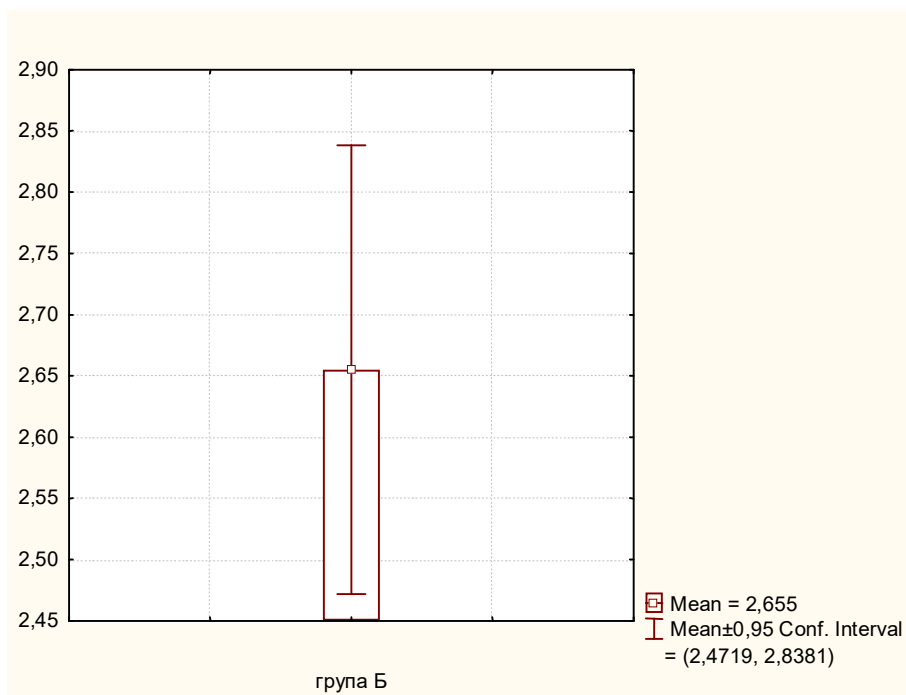
Слика 14-Проширена фиброзна септа во адипозното ткиво на кожата
Бојење со анти НО-1 антитело, зголемување x 40



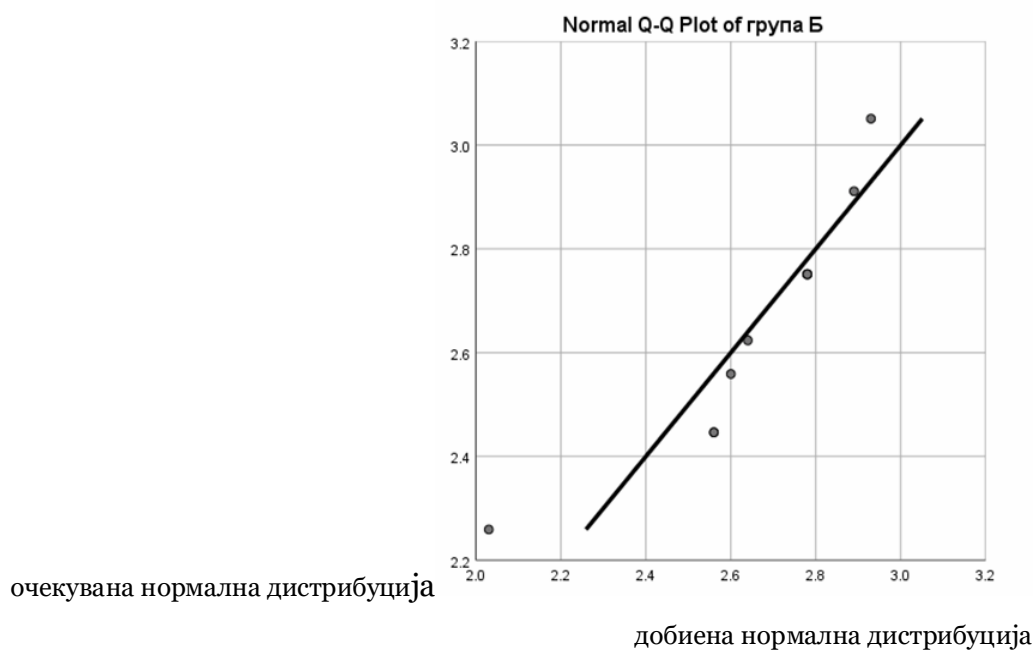
**Табела 11 - дескриптивна статистика за нумеричката густина на макрофагите
кај крвните подливи со старост од 1 до 3 дена (група Б)**

	N	минимум	максимум	средна вредност(\bar{x})	стандардна девијација(Σ)
Група Б	15	2.03	2.93	2.6550	0.25596

Графикон 5 – дистрибуција на нумеричката густина на макрофагите кај крвни подливи со старост од 1 до 3 дена (група Б)



Графикон 6 – очекувана нормална дистрибуција на нумеричката густина на макрофагите кај крвни подливи со старост од 1 до 3 дена (група Б)



Дескриптивните статистички податоци за групата Б, односно за крвните подливи стари од 1 до 3 дена, при анализата на нумеричката густина на макрофагите во полето на крвниот подлив, покажаа минимална вредност од 2,03 до максимална вредност од 2,93. Како средна вредност за густината на макрофагите е добиена вредност од 2,6550, со стандардна девијација од 0.25596 (табела 11). Истите резултати за дистрибуцијата на нумеричката густина на макрофагите во оваа група се прикажани графички, на графиконот број 5, додека графикон број 6 ја прикажува очекуваната нормална дистрибуција на нумеричката густина на макрофагите. Од резултатите се забележува дека нумеричката густина на макрофагите во оваа група има поголема вредност, во споредба со претходната испитувана група А.

- **Група В - ткивни исечоци од кожа со крвни подливи со старост меѓу 3 и 7 дена**

Макроскопски наод

Крвните подливи во оваа група се неостро ограничени од околното здраво ткиво. Кожата на површината не покажува едем. Нејзината површина има зачувана морфолошка градба. Низ епидермисот се гледа пребојувањето на подливот во подлежащото сврзно ткиво. Крвните подливи со старост од 3 до 7 дена имаат светло виолетова пребоеност, со блага градација на бојата од периферијата кон центарот на подливот поради метаболизмот на хемоглобинот (слика 15).

Слика 15 - макроскопски изглед на крвен подлив со старост меѓу 3-7 дена (виолетово пребојување на кожата како резултат на метаболизмот на екстрацелуларниот хемоглобин)



Микроскопски наод

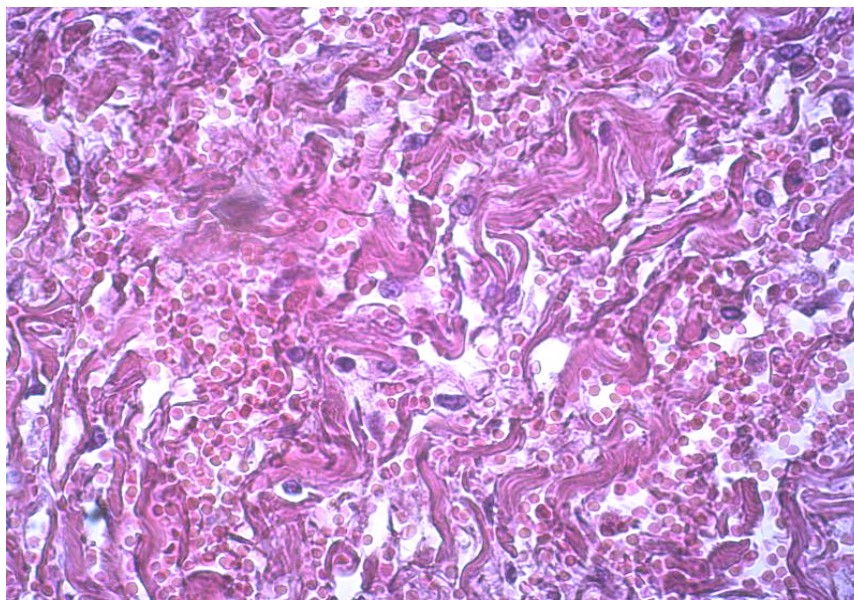
Квалитативната хистолошка анализа на крвните подливи со старост од 3 до 7 дена покажа дека епидермисот на кожата е со зачувана морфологија. Кај него се гледаат сите структурни слоеви во неговата градба. Излевањето на крвта кај некои подливи беше локализирано во сврзното ткиво на дермисот, додека кај длабоките крвни подливи излевањето на крвта беше локализирано во фиброзните септи на адипозното ткиво на хиподермисот.

Хистолошка анализа на оваа група крвни подливи покажа умерена инфилтрација на полето на крварење со макрофаги, како и отсуство на неутрофилни гранулоцити. Во полето на крварење се забележува присуство на фибрин. На слика 16 даден е приказ на полето на крварење каде со примена на основното боење hematoxillin/eosin се забележува инфилтрација со мононуклеарни клетки. На слика 17 со боењето Perl`s Prussian Blue се потврдени истите мононуклеарни клетки, макрофаги. Со дополнително боење со анти НО-1 антители се покажува активноста на макрофагите во полето на крварење преку продукција на ензимот хем оксигеназа 1 (слика 18,19,20). Инфилтрацијата со макрофаги микроскопски се забележува низ целото поле на крварење, додека инфилтрација со неутрофили во оваа група не беше забележана.

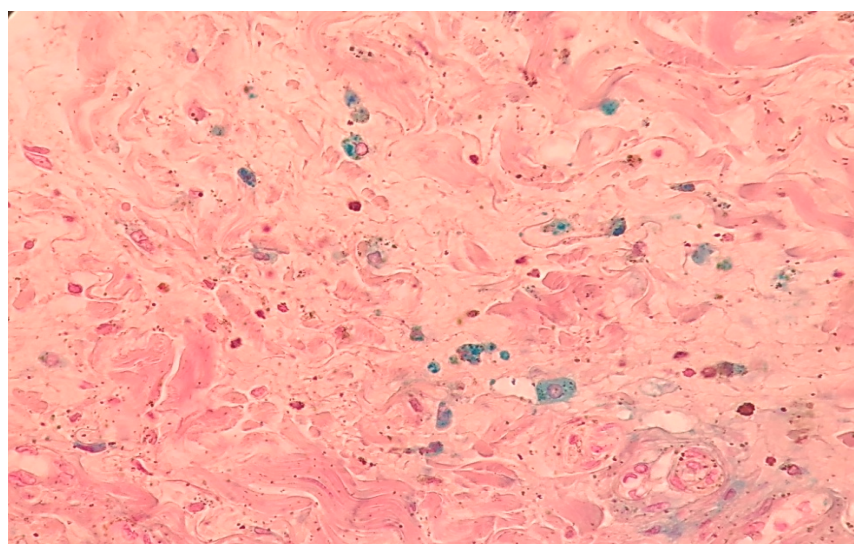
Фиброзните септи се проширени поради обилната екстравазација на еритроцитите и умерена инфилтрација со макрофаги (слика 20).

Микрофотографии

Слика 16-микроскопски наод кај крвен подлив со старост меѓу 3 до 7 дена (присуство на мононуклеари во крвниот подлив)
Бојење Н&Е, зголемување x 40

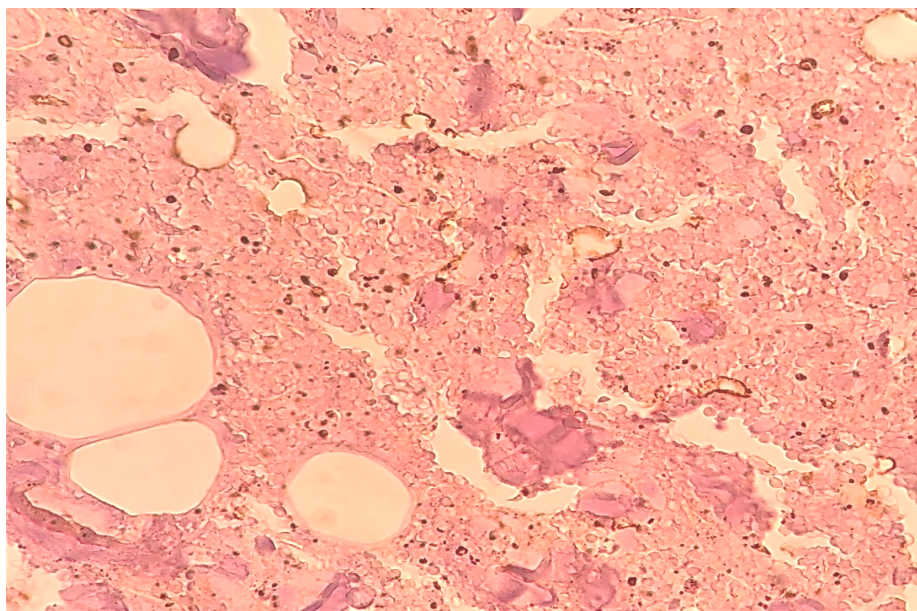


Слика 17-микроскопски наод кај крвен подлив со старост меѓу 3 до 7 дена (умерено присуство на мононуклеари во крвниот подлив)
Бојење Perl`s Prussian Blue, зголемување x 40



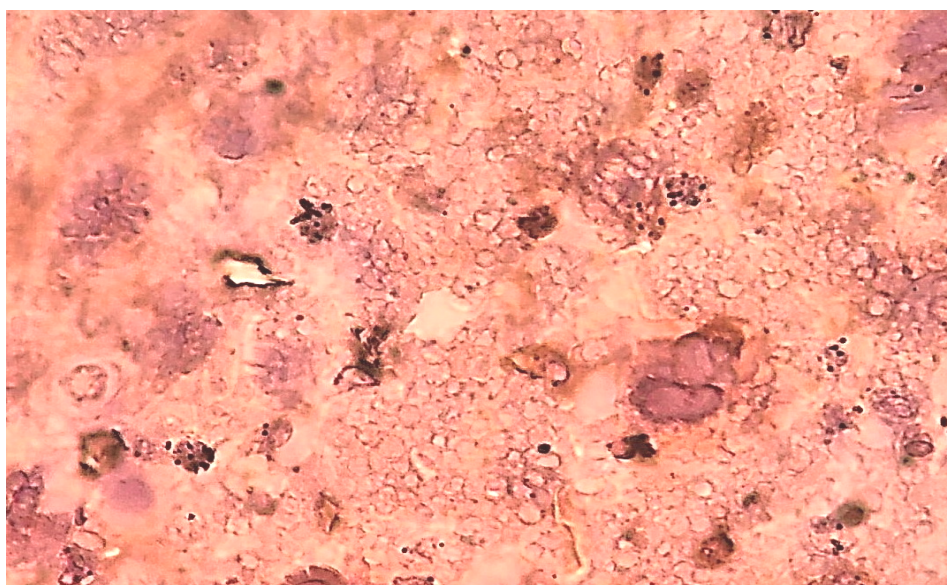
Слика 18-микроскопски наод кај крвен подлив со старост меѓу 3 до 7 дена (умерено присуство на активни-хем оксигеназа 1 продуцирачки мононуклеари во крвниот подлив)

Бојење со анти НО-1 антитело , зголемување x 20



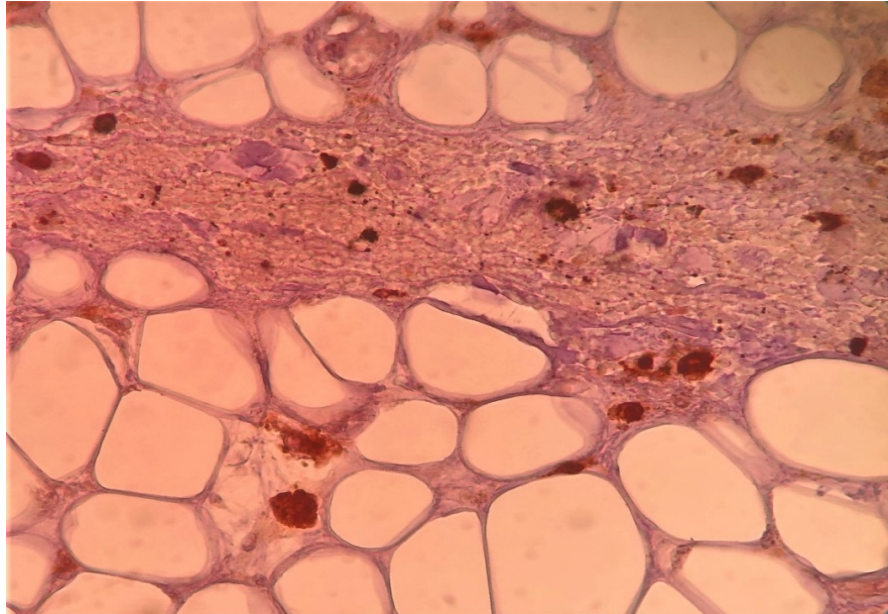
Слика 19-микроскопски наод кај крвен подлив со старост меѓу 3 до 7 дена (присуство на мононуклеари во крвниот подлив)

Бојење со анти НО-1 антитело , зголемување x 100



Слика 20-микроскопски наод кај крвен подлив со старост меѓу 3 до 7 дена (присуство на мононуклеари во крвниот подлив лоциран во фиброзна септа во адипозното ткиво на кожата)

Боене со анти НО-1 антитело , зголемување x 100

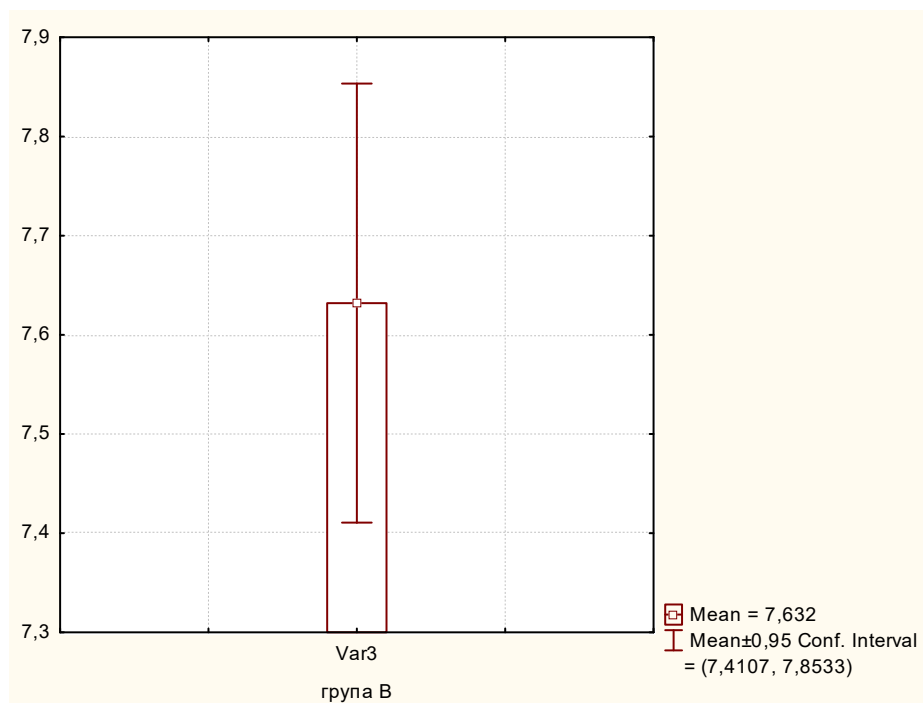


Статистичка анализа

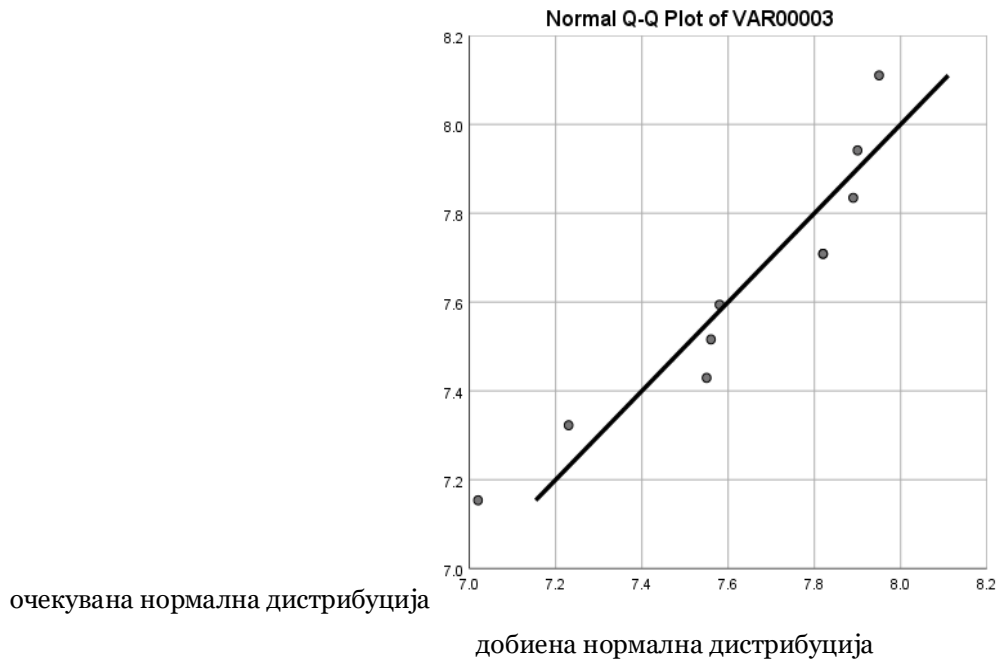
Табела 12 - дескриптивна статистика за нумеричката густина на макрофагите кај крвните подливи со старост од 3 до 7 дена (група В)

	N	минимум м	максимум м	средна вредност(\bar{x})	стандардна девијација(Σ)
Група В	15	7.02	7.95	7.6320	0.30929

Графикон 7 – дистрибуција на нумеричката густина на макрофагите кај крвни подливи со старост од 3 до 7 дена (група В)



Графикон 8 – очекувана нормална дистрибуција на нумеричката густина на макрофагите кај крвни подливи со старост меѓу 3 до 7 дена (група В)



Дескриптивните статистички податоци за групата В, односно за крвните подливи стари од 3 до 7 дена, при анализата на нумеричката густина на макрофагите во полето на крвниот подлив, покажаа минимална вредност од 7,02 до максимална вредност од 7,95. Како средна вредност за густината на макрофагите е добиена вредност од 7,6320, со стандардна девијација од 0.30929 (табела 12). Истите резултати за дистрибуцијата на нумеричката густина на макрофагите во оваа група се прикажани графички, на графиконот број 7, додека графикон број 8 ја прикажува очекуваната нормална дистрибуција на нумеричката густина на макрофагите.

- **Група Г - ткивни исечоци од кожа со крвни подливи со старост меѓу 7 и 14 дена**

Макроскопски наод

Овие крвни подливи се неостро ограничени од околното здраво ткиво. Пребоеноста е кафеаво-жолтеникава, со градација на бојата од периферијата кон центарот на подливот поради веќе напреднатиот метаболизам на хемоглобинот. Едемот е апсорбиран и подливот е во ниво на кожата. На слика 21 прикажани се два крвни подливи, долниот подлив, со жолто кафеаво пребојување се однесува за оваа група, додека горниот крвен подлив со виолетово пребојување се однесува за претходната експериментална група, В. Површината на кожата е интактна, низ неа просветлува бојата на подливот.

Слика 21-макроскопски наод кај крвен подлив со старост од 7-14 дена (Кафеаво-жолта пигментација на подливот, со нејасни рабови кон околното здраво ткиво. NB-на сликата се гледа и подлив со виолетова пигментација, што оди во прилог за старост од 3 до 7 дена)

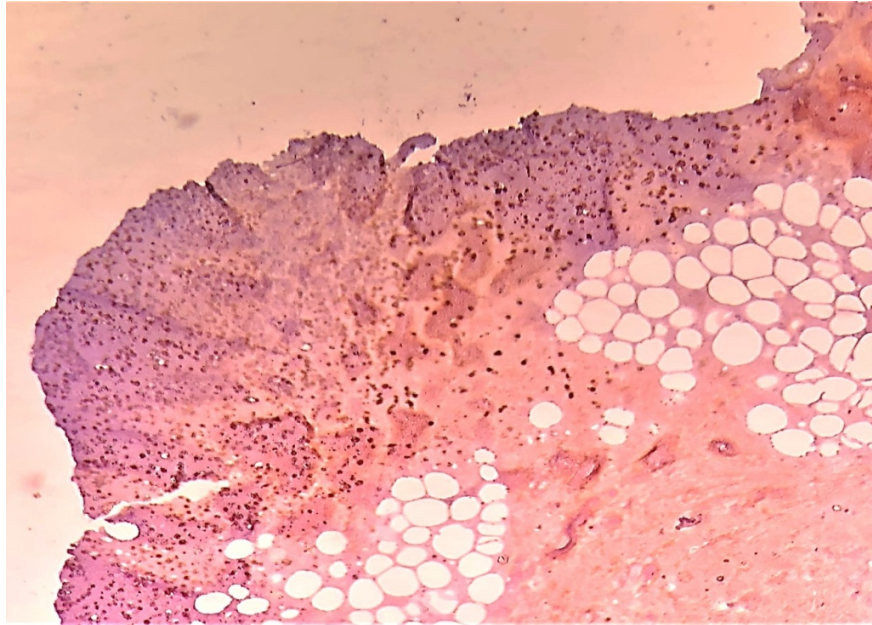


Микроскопски наод

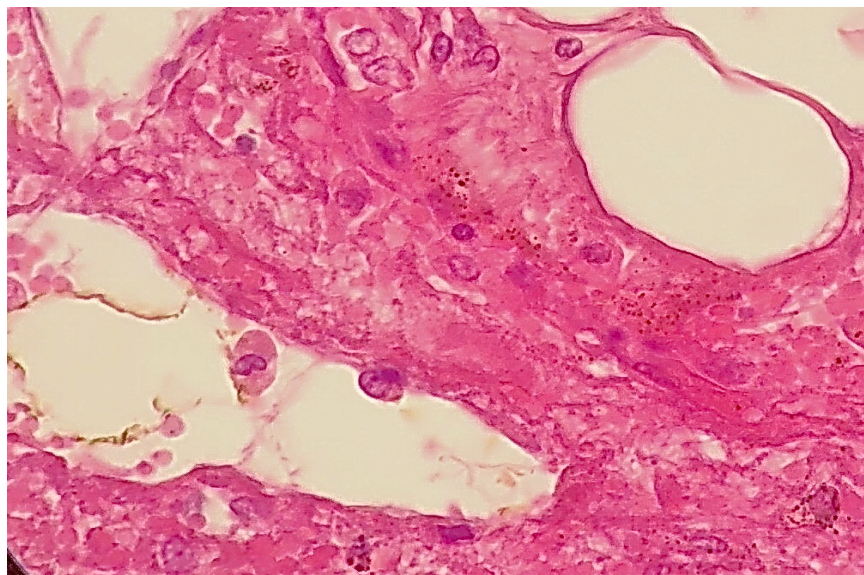
Кај крвните подливи со старост од 7 до 14 дена микроскопската анализа покажа дека епидермисот на кожата е со зачувана морфологија, со присуство на сите структурни слоеви во неговата градба, исто како кај останатите експериментални групи. Излевањето на крвта и во оваа група кај некои подливи е локализирано во сврзното ткиво на дермисот, додека кај длабоките крвни подливи излевањето на крвта е во фиброзните септи на адипозното ткиво на хиподермисот. Во еден испитуван примерок постоеше крварење и инфилтрација со макрофаги и во слоевите на епидермисот, но сепак неговите површински слоеви беа со зачуван интегритет (слика 22). Хистолошката анализа покажа интензивна инфилтрација на полето на крварење со моноклеарни клетки-макрофаги, како и присуство на хемосидерински гранули и ткивен дебрис (слика 23,24,25). Макрофагите активно го продуцираат ензимот хем оксигеназа 1, прикажани со имуно-боење со анти хем оксигеназа 1 антитело, при што се гледа силен кафеав сигнал кај овие клетки (слика 26). Фиброзните септи сеуште се широки поради обилната инфилтрација со еритроцити и макрофаги во полето на крварење (слика 27). Инфилтрацијата со макрофаги микроскопски се забележува низ целото поле на крварење. Во оваа група таа е силно изразена, така што во полето на крварење доминираат макрофагите со околу 30% застапеност од целокупната клеточна популација. Инфилтрација со неутрофили во оваа група не се забележува.

Микрофотографии

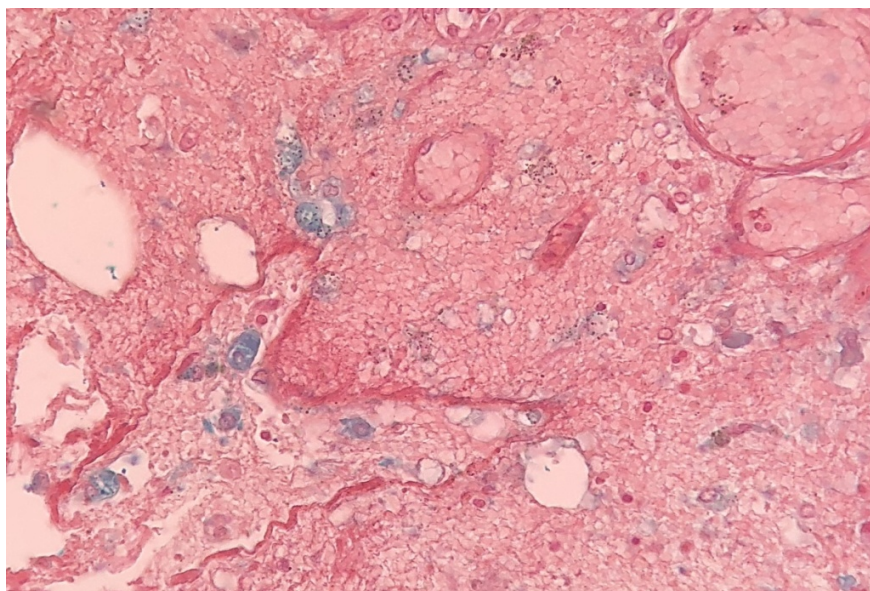
Слика 22- Крвен подлив локализиран во епидермисот и дермисот на кожата
Бојење со анти НО-1 антитело, зголемување x 10



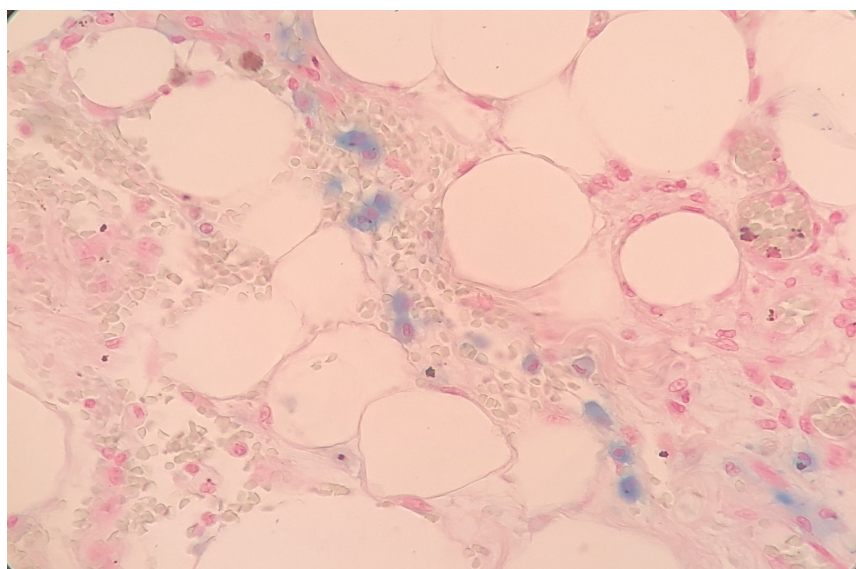
Слика 23-микроскопски наод кај крвен подлив со старост од 7-14 дена (присуство на мононуклеарни клетки во крвниот подлив)
Бојење Н&Е, зголемување x 100



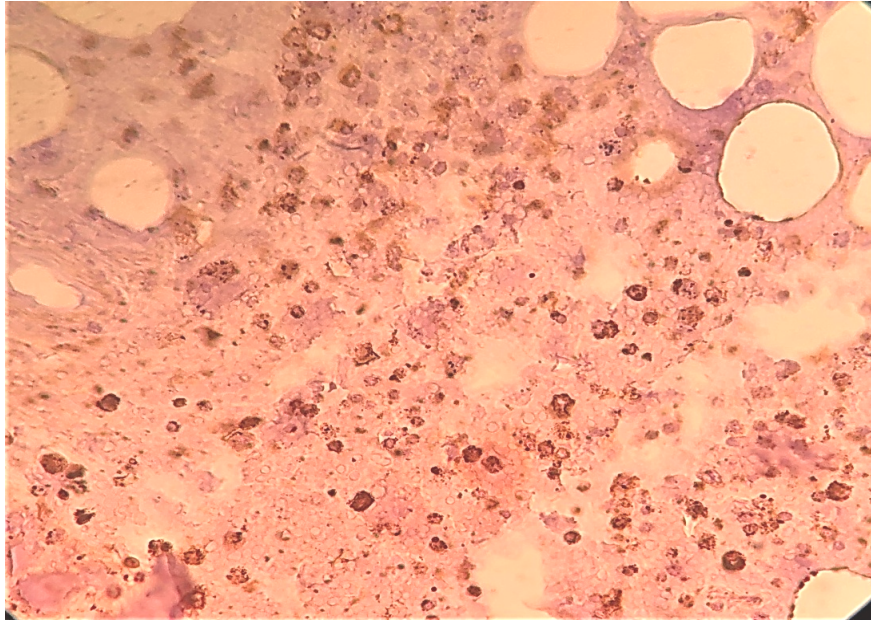
Слика 24-микроскопски наод кај крвен подлив со старост од 7-14 дена (изразено присуство на макрофаги во крвниот подлив)
Бојење Perl`s Prussian Blue, зголемување x 100



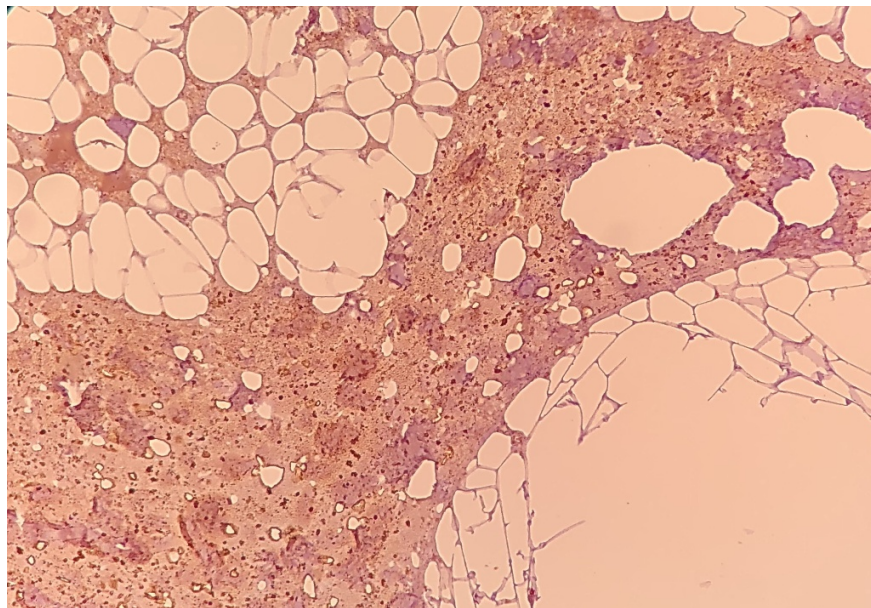
Слика 25-микроскопски наод кај крвен подлив со старост од 7-14 дена (изразено присуство на макрофаги во крвниот подлив лоциран во фиброзна септа во адипозното ткиво на кожата)
Бојење Perl`s Prussian Blue, зголемување x 40



Слика 26-микроскопски наод кај крвен подлив со старост од 7-14 дена (изразено присуство на мононуклеари во крвниот подлив)
Боење со анти НО-1 антитело , зголемување x 40



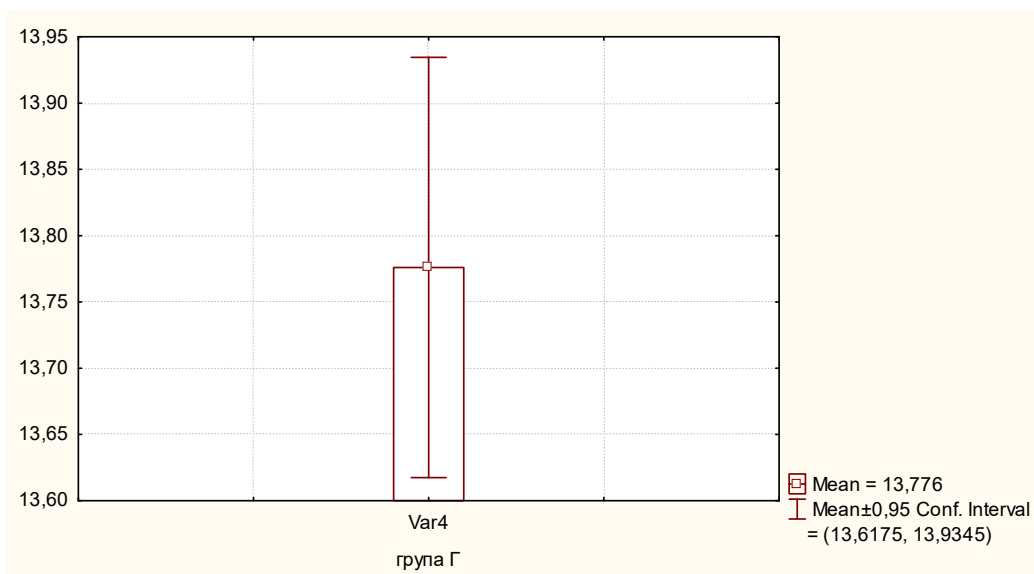
Слика 27-микроскопски наод кај крвен подлив со старост од 7-14 дена (изразено присуство на активирани макрофаги во фиброзна септа во хиподермисот)
Боење со анти НО-1 антитело , зголемување x 20



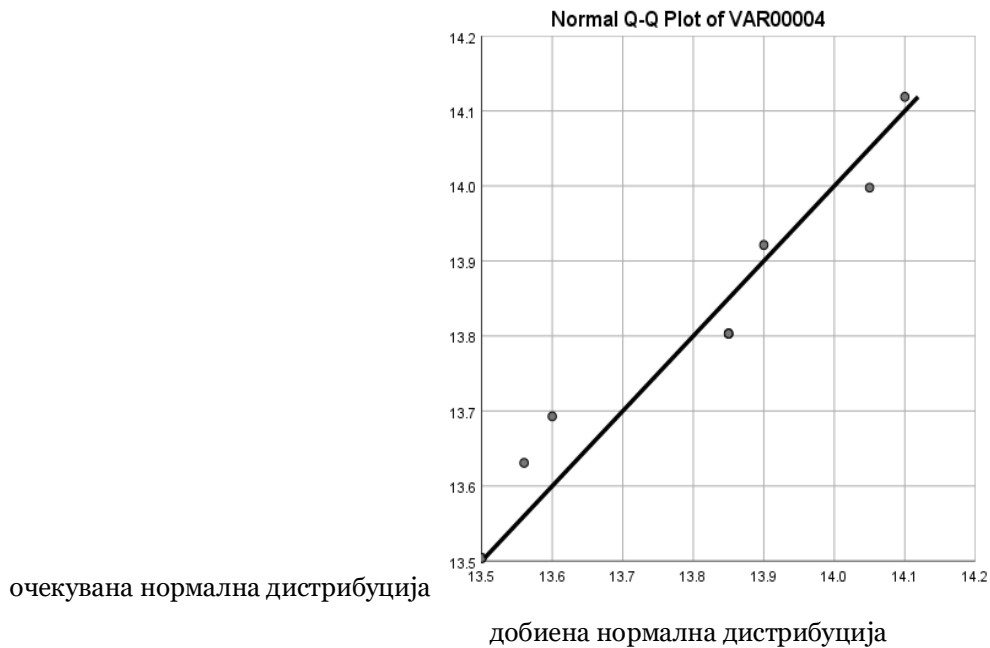
Табела 13 - дескриптивна статистика за нумеричката густина на макрофагите кај крвните подливи со старост од 7 до 14 дена (група Г)

	N	минимум м	максимум м	средна вредност(\bar{x})	стандардна девијација(Σ)
Група Г	15	13.50	14.10	13.7760	0.22157

Графикон 9 – дистрибуција на нумеричката густина на макрофагите кај крвни подливи со старост од 7 до 14 дена (група Г)



Графикон 10– очекувана нормална дистрибуција на нумеричката густина на макрофагите кај крвни подливи со старост од 7 до 14 дена (група Г)



Дескриптивните статистички податоци за групата Г, односно за крвните подливи стари од 7 до 14 дена, при анализата на нумеричката густина на макрофагите во полето на крвниот подлив, покажаа минимална вредност од 13,50 до максимална вредност од 14,10. Како средна вредност за густината на макрофагите е добиена вредност од 13,7760, со стандардна девијација од 0.22157 (табела 13). Истите резултати за дистрибуцијата на нумеричката густина на макрофагите во оваа група се прикажани графички, на графиконот број 9, додека графикон број 10 ја прикажува очекуваната нормална дистрибуција на нумеричката густина на макрофагите.

- **Група Д - контролна група**

Оваа испитувана група содржи примероци на здраво ткиво, интактна кожа, која се наоѓа околу рабовите на крвниот подлив. Обработениот материјал од оваа група овозможува директна споредба на патолошки променетото ткиво со соседното нормално здраво ткиво.

Макроскопски наод

При опсервација, здравата, интактна кожа околу крвниот подлив е со нормална морфолошка структура. Таа е мазна, без едем, без промена на сопствената беж боја, без макроскопски видливи лацерации. Во зависност од регијата во која се наоѓаа анализираните крвни подливи, здравата кожа беше покриена со влакна или имаше поизразена пигментираност .

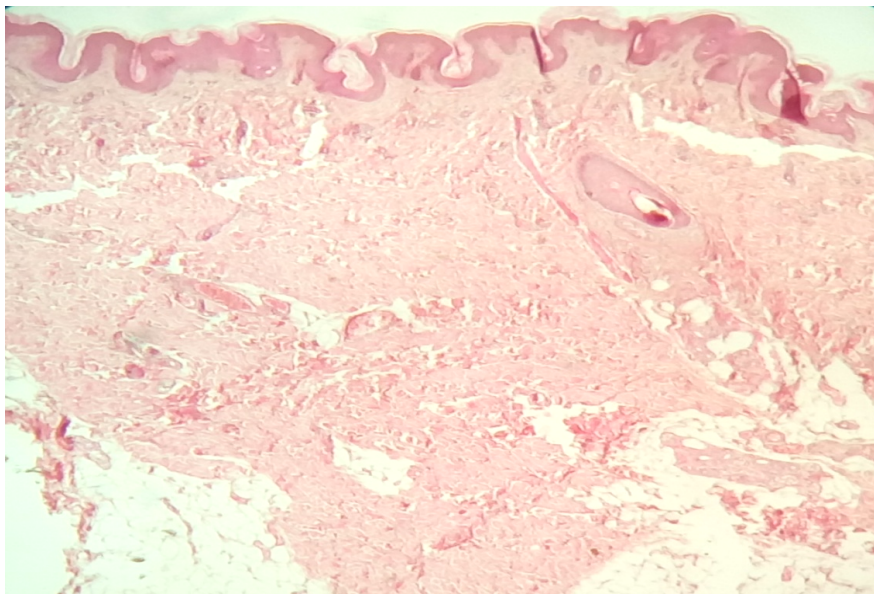
Микроскопски наод

Хистолошката анализа на здравата кожа покажа нормална микро-структура. Во наодот епидермисот беше интактен, претставен со сите структурни слоеви на клетки и ороженет површински слој. Орожнатоста на површинскиот слој варираше во зависност од регијата во која се наоѓаше анализираниот крвен подлив. Во дермисот беше забележано присуство на кожните аднекси (влакна, потни и лојни жлезди) и интактни мали крвни садови во фиброзното ткиво. Во доминантното адипозно ткиво на хиподермисот беше забележана нормалната интактна васкуларизација со присуство на поголеми крвни садови. Во хиподермисот беа забележани и фоликули на влакна. Анализите беа изведени со примена на погоре споменатите методи на боење поради демонстрација на присуство или отсуство на клетки од имуниот одговор во здравата кожа и приказ на крвните садови. На слика 26 даден е приказ на здравата кожа боена со

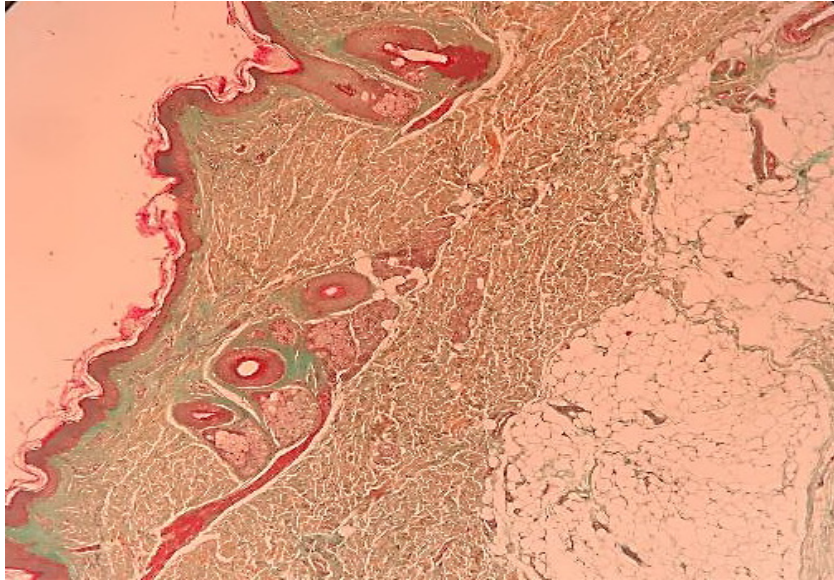
hematoxillin/eosin . На слика 27 и 28 со примена на специјално Masson trichrome green бојење, даден е приказ на структурните делови на кожата како и крвните садови во неа. Слика 27 прикажува и интактни крвни садови во дермисот на кожата, додека пак слика 28 прикажува интактна, нормална структура на епидермисот и раскинат крвен сад во фиброзна септа во хиподермисот на кожата. На слика 31 и 33 даден е приказ на раскинати крвни садови во фиброзните септи на кожата. Сликите 29, 30, 32 и 34 покажуваат интактни крвни садови во кожата, прикажани со специфични бојења (Elastica Van Gieson, Masson trichrome green) кои овозможуваат визуелизација на градбените елементи на крвните садови.

Микрофотографии

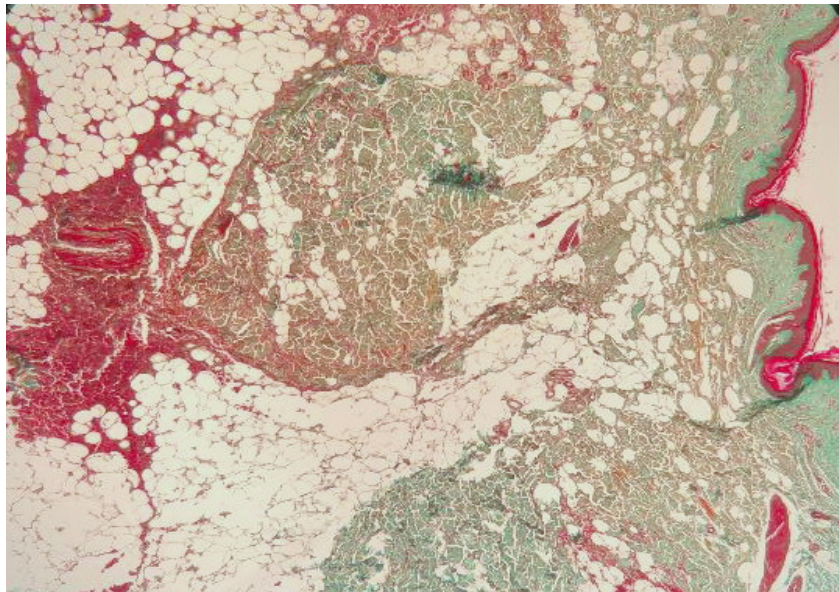
Слика 26-Микроскопски изглед на здрава кожа
Бојење со hematoxillin/eosin, зголемување x 4



Слика 27-Микроскопски изглед на здрава кожа
Боење со Masson trichrome green, зголемување x 4

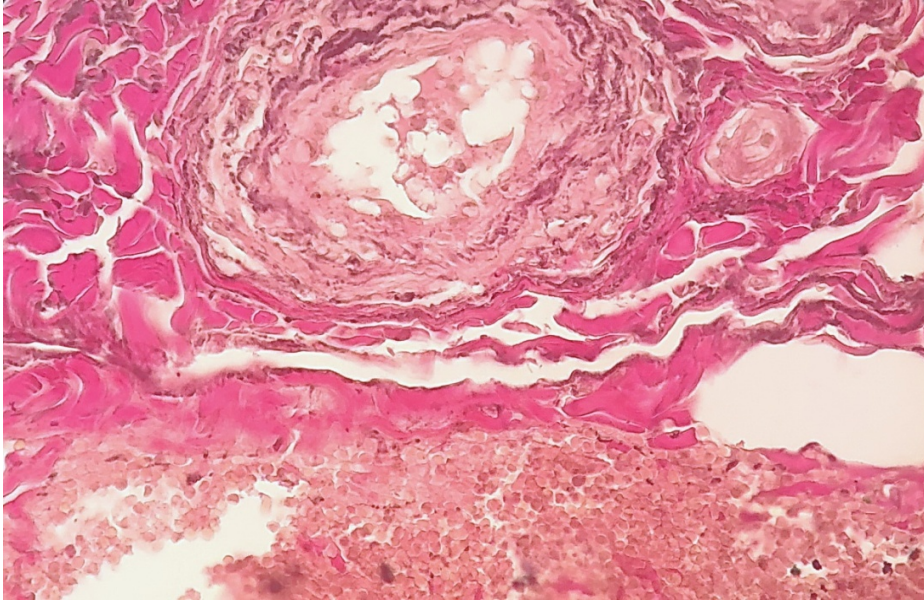


Слика 28 - Интактен епидермис на кожата кај контролната група (десно), раскинат крвен сад во адипозното ткиво на кожата, во полето на крвниот подлив (лево)
Боење со Masson trichrome green, зголемување x 20



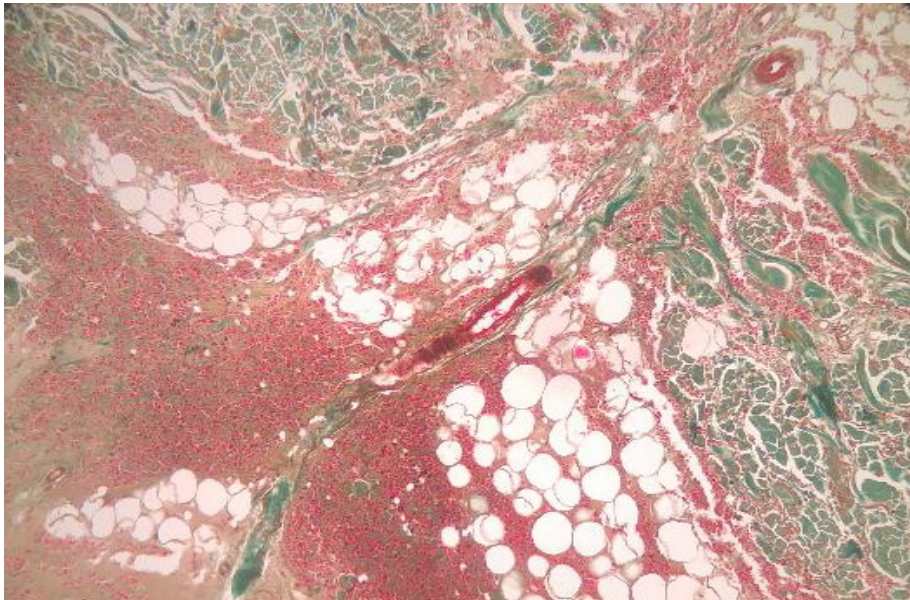
Слика 29 - Интактни крвни садови (лево) и крвен подлив (десно) во хиподермисот на кожата

Боење Elastica Van Gieson, зголемување x 40



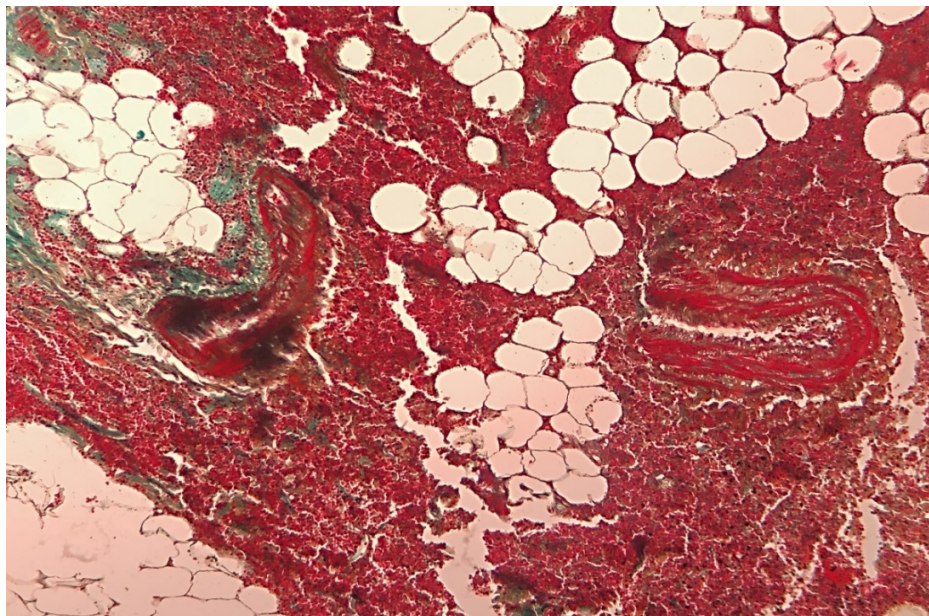
Слика 30 - Крвен сад во дермисот и хиподермисот на кожата

Боење со Masson trichrome green , зголемување x 20

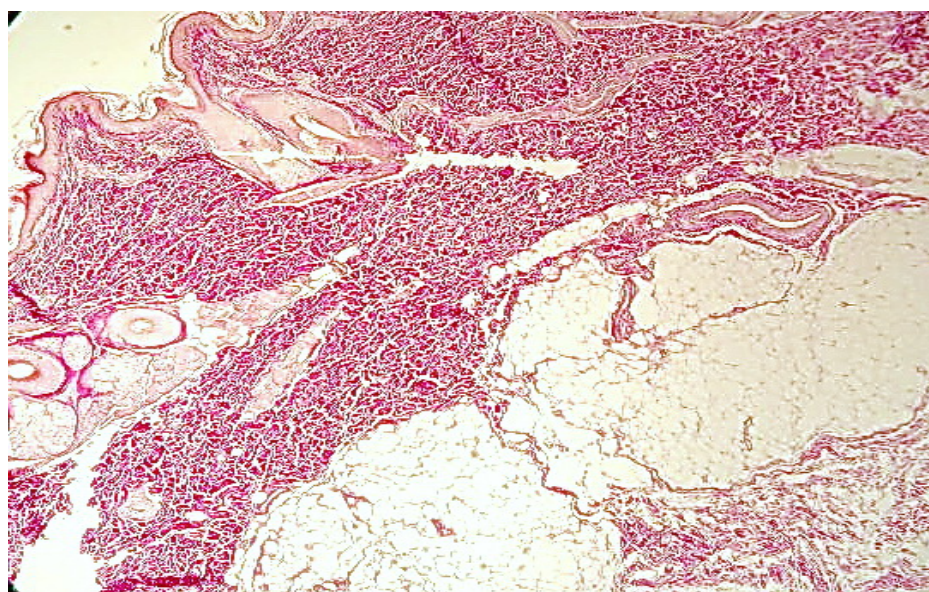


Слика 31 - Раскинат крвен сад (десно) и интактен крвен сад (лево) во хиподермисот на кожата

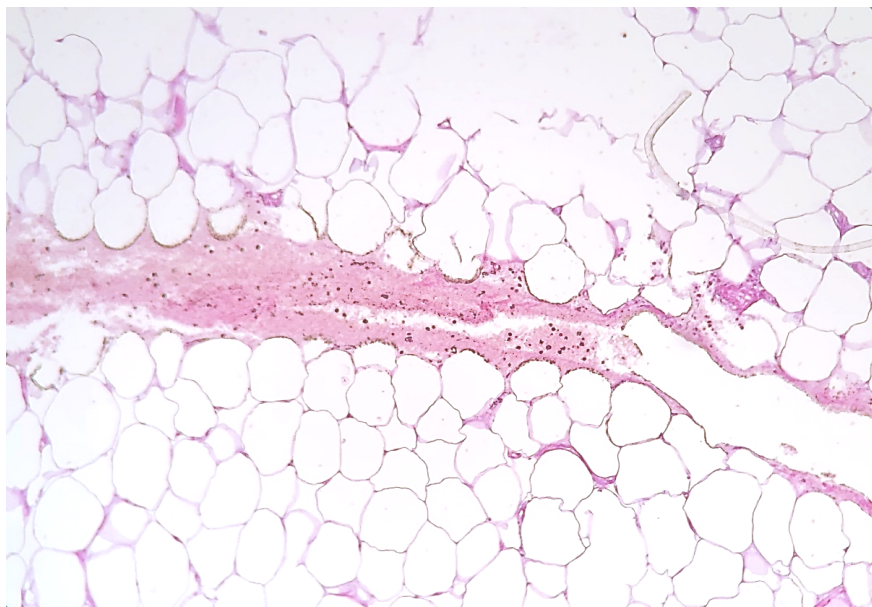
Бојење со Masson trichrome green , зголемување x 40



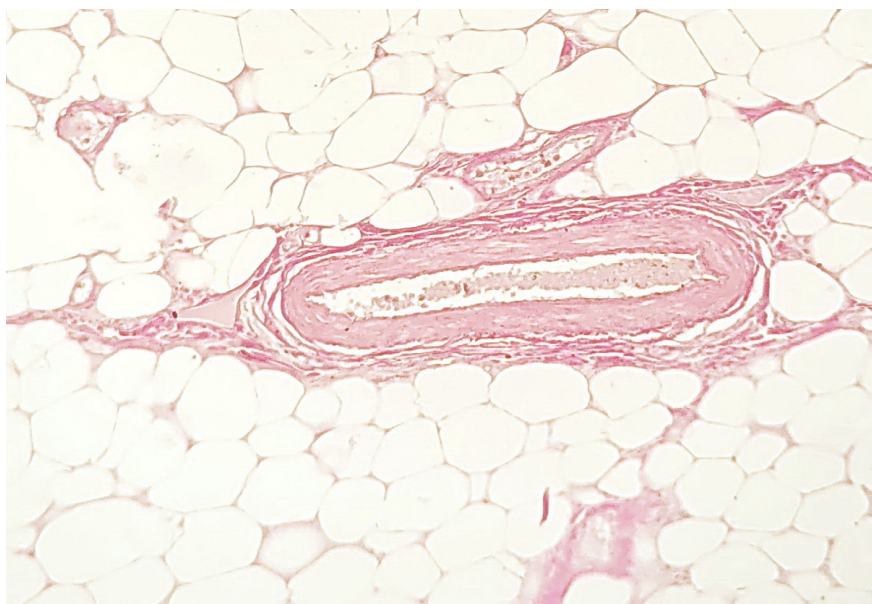
Слика 32 - Крвни садови во дермисот и хиподермисот на кожата
Бојење со Elastica Van Gieson , зголемување x 10



Слика 33 - Раскинат крвен сад во фиброзна септа во хиподермисот на кожата
Бојење Hematoxillin/eosin, зголемување x 10



Слика 34 - Крвен сад во фиброзна септа во хиподермисот на кожата
Бојење со Elastica Van Gieson, зголемување x 10



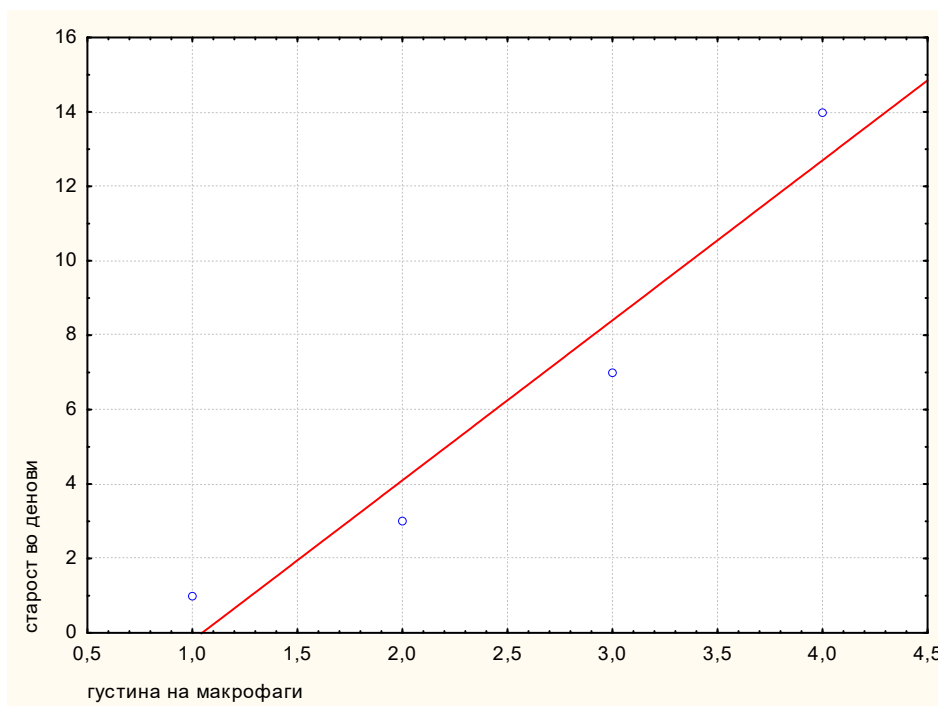
Табела 14 - Корелација меѓу староста на крвните подливи и нивната инфилтрација (нумеричка густина) со макрофаги (Spearman`s rank)

		старост во денови	инфилтрација со макрофаги
Spearman's rho	старост во денови	коэффициент на корелација	1.000
		Значајност (2-tailed)	0.0
		N	4
	инфилтрација со макрофаги	коэффициент на корелација	1.000**
		значајност (2-tailed)	0.0
		N	4

** . корелацијата е сигнификантна при 0.01 вредност

Во табела 14 е прикажана корелацијата на староста на крвните подливи во денови и нумеричката густина на инфилтраните макрофаги во полето на крвниот подлив. Од добиените резултати, односно од коефициентот на корелација 1,000 се гледа црвста позитивна корелација помеѓу двата испитувани параметри. Добиените резултати се прикажани и графички, на графикон број 11.

Графикон 11 - Корелација меѓу староста на крвните подливи изразена во денови и нивната инфилтрација (нумеричка густина) со макрофаги



Графикон 11 ја прикажува позитивна корелација помеѓу двата испитувани параметри, староста на крвните подливи изразена во денови и нивната инфилтрација (нумеричка густина) со макрофаги.

Табела 15 – сумирана дескриптивна статистика за нумеричката густина на макрофагите во испитуваните групи А, Б, В и Г

	минимум	максимум	средна вредност(\bar{x})	стандардна девијација(Σ)
група А	0.28	0.35	0.3100	0.01886
група Б	2.03	2.93	2.6550	0.25596
група В	7.02	7.95	7.6320	0.30929
група Г	13.50	14.10	13.7760	0.22157

Во табела 15 дадени се сумирани податоци од дескриптивната статистичка анализа за нумеричката густина на макрофагите во полето на крварење во четирите испитувани групи на крвни подливи. Вредностите за нумеричката густина на макрофагите се изразени преку минимална и максимална вредност, како и средна вредност и стандардна девијација. Во групата А, кај крвните подливи не постари од 24 часа, вредностите за нумеричката густина на макрофагите во полето на крвниот подлив се движат од 0,28 до 0,35, со средна вредност од 0,3100. Овие вредности одат во прилог на мала нумеричка густина на макрофагите во оваа испитувана група, во споредба со останатите испитувани групи Б, В и Г. Во групата Б, кај крвните подливи стари од 1 до 3 дена, вредностите за нумеричката густина на макрофагите во полето на крвниот подлив се движат од 2,03 до 2,93, со средна вредност од 2,6550. Од вредностите се забележува поголема нумеричка густина на макрофагите во оваа испитувана група, во споредба со групата А, но помала од групите В и Г. Во групата В, кај крвните подливи стари од 3 до 7 дена, вредностите за нумеричката густина на макрофагите во полето на крвниот подлив се движат од 7,02 до 7,95, со средна вредност од 7,6320. Од добиените вредности се забележува поголема нумеричка густина на макрофагите во оваа испитувана група, во споредба со групите А и Б, но помала од групата Г. Во групата Г, кај крвните подливи стари од 7 до 14 дена, вредностите за нумеричката густина на макрофагите во полето на крвниот подлив се движат од 13,50 до 14,10, со средна вредност од 13,7760.

Од добиените вредности се забележува најголема нумеричка густина на макрофагите во оваа испитувана група, во споредба со останатите испитувани групи А, Б и В. Од сумарната дескриптивна статистика можеме да заклучиме дека нумеричката густина на макрофагите во полето на крвниот подлив е динамичен параметар кој се менува со текот на времето, во процесот на репарација на крвниот подлив. Од добиените вредности јасно се забележува зголемување на нумеричката густина на макрофагите во сите четири испитувани групи, А, Б, В и Г, односно како подливот старее, (како поминуваат повеќе денови од моментот на формирање на подливот).

**Табела 16 - тест за спарени примероци група А и група Б
-спарени разлики-**

Пар 1 група А - група Б	средна вредност (\bar{x})	стандардна девијација (Σ)	станд. грешка	95% интервал на доверба на разликата		t	df	p
				<	>			
	-2.34500	0.25330	0.08010	-2.52620	-2.16380	-29.276	9	0.000

T тестот за спарени примероци, односно спарени разлики меѓу групите А и Б покажува значајност за $p=0,000$, што укажува на значајна разлика во густината на макрофагите во двете споредени групи. Тоа подразбира поголема нумеричка густина на макрофагите кај крвните подливи стари од 1 до 3 дена за разлика од густината на макрофагите кај свежите крвни подливи, не постари од 24 часа (табела 16).

Табела 17 - корелација на спарени примероци група А и група Б

	N	корелација	значајност(p)
пар 1 група А - група Б	15	0.177	0.624

Од тестот за корелација меѓу експерименталните групи А и Б се доби резултат за позитивна корелација за густината на макрофагите кај свежите крвни подливи и крвните подливи стари од 1 до 3 дена (табела 17).

Табела 18 - статистика за спарени примероци група А и група Б

Пар 1	средна вредност(\bar{x})	N	стандардна девијација(Σ)	стандардна грешка
група А	0.3100	15	0.01886	0.00596
група Б	2.6550	15	0.25596	0.08094

Во табела 18 дадени се споредбено средните вредности за густината на макрофагите кај свежите крвни подливи не постари од 24 часа, група А и кај крвните подливи стари од 1 до 3 дена, група Б при што средната вредност за групата А изнесува 0,3100, додека средната вредност за групата Б изнесува 2,6550.

Табела 19 - тест за спарени примероци група А и група В -спарени разлики-

Пар 1	средна вредност (\bar{x})	стандардна девијација (Σ)	станд. грешка	95% интервал на доверба на разликата		t	df	p
				<	>			
група А - група В	-7.06300	0.63425	0.20057	-7.51671	-6.60929	-35.215	9	0.000

Во табела 19 т тестот за спарени примероци, односно спарени разлики меѓу групите А и В покажува значајност за $p=0,000$, што укажува на значајна разлика во густината на макрофагите во двете споредени групи. Тоа подразбира поголема нумеричка густина на макрофагите кај крвните подливи стари од 3 до 7 дена за разлика од густината на макрофагите кај свежите крвни подливи, не постари од 24 часа.

Табела 20 - корелација на спарени примероци група А и група В

	N	корелација	значајност(p)
пар 1 група А - група В	15	-0.173	0.632

Од тестот за корелација меѓу експерименталните групи А и В се доби резултат за негативна корелација за густината на макрофагите кај свежите крвни подливи и крвните подливи стари од 3 до 7 дена (табела 20).

Табела 21 - статистика за спарени примероци група А и група В

	средна вредност(\bar{x})	N	стандардна девијација(Σ)	стандардна грешка
група А	0.3100	15	0.01838	0.00581
група В	7.3670	15	0.63080	0.19948

Во табела 21 дадени се споредбено средните вредности за густината на макрофагите кај свежите крвни подливи не постари од 24 часа, група А и кај крвните подливи стари од 3 до 7 дена, група В, при што средната вредност за групата А изнесува 0,3100, додека средната вредност за групата В изнесува 7.3670.

Табела 22 - тест за спарени примероци А и група Г -спарени разлики-

пар 1 група А - група Г	средна вредност(\bar{x})	стандардна девијација(Σ)	станд. грешка	95% интервал на доверба на разликата		t	df	p
				<	>			
	-13.46600	0.22495	0.07114	-13.62692	-13.30508	-189.297	9	0.000

Во табелата 22 т тестот за спарени примероци, односно спарени разлики меѓу групите А и Г покажува значајност за $p=0,000$, што укажува на значајна разлика во густината на макрофагите во двете споредени групи. Тоа подразбира поголема нумеричка густина на макрофагите кај крвните подливи стари од 7 до 14 дена за разлика од густината на макрофагите кај свежите крвни подливи, не постари од 24 часа.

Табела 23 - корелација на спарени примероци А и група Г

	N	корелација	значајност(p)
пар 1 група А - група Г	15	-0.138	0.703

Од тестот за корелација меѓу експерименталните групи А и Г се доби резултат за негативна корелација за густината на макрофагите кај свежите крвни подливи и крвните подливи стари од 7 до 14 дена (табела 23).

Табела 24 - статистика за спарени примероци А и група Г

Пар 1		средна вредност(\bar{x})	N	стандардна девијација(Σ)	стандардна грешка
	група А		0.3100	15	0.01886
група Г		13.7760	15	0.22157	0.07007

Во табела 24 дадени се споредбено средните вредности за густината на макрофагите кај свежите крвни подливи не постари од 24 часа, група А и кај крвните подливи стари од 7 до 14 дена, група Г, при што средната вредност за групата А изнесува 0,3100, додека средната вредност за групата Г изнесува 13.7760.

**Табела 25 - тест за спарени примероци Б и група Г
-спарени разлики-**

Пар 1 група Б - група Г	средна вредност(\bar{x})	стандардна девијација(Σ)	станд. грешка	95% интервал на доверба на разликата		t	df	p
)			<	>			
	-11.12100	0.30723	0.09715	-11.34078	-10.90122	-114.468	9	0.000

Во табелата 25 т тестот за спарени примероци, односно спарени разлики меѓу групите Б и Г покажува значајност за $p=0,000$, што укажува на значајна разлика во густината на макрофагите во двете споредени групи. Тоа подразбира поголема нумеричка густина на макрофагите кај крвните подливи стари од 7 до 14 дена за разлика од густината на макрофагите кај крвните подливи со старост од 3 до 7 дена.

Табела 26 - корелација на спарени примероци Б и група Г

	N	корелација	значајност(p)
пар 1 група Б - група Г	15	0.178	0.622

Од тестот за корелација меѓу експерименталните групи Б и Г се доби резултат за позитивна корелација за густината на макрофагите кај крвните подливи со старост од 1 до 3 дена и крвните подливи со старост од 7 до 14 дена (табела 26).

Табела 27 - статистика за спарени примероци Б и група Г

Пар 1	средна вредност(\bar{x})	N	стандардна девијација(Σ)	стандардна грешка
група Б	2.6550	15	0.25596	0.08094
група Г	13.7760	15	0.22157	0.07007

Во табела 27 дадени се споредбено средните вредности за густината на макрофагите кај свежите крвни подливи стари од 1 до 3 дена, група Б и кај крвните подливи стари од 7 до 14 дена, група Г, при што средната вредност за групата Б изнесува 2.6550, додека средната вредност за групата Г изнесува 13.7760.

Табела 28 - тест за спарени примероци група Б и група В

-спарени разлики-

пар 1 група Б - група В	средна	стандардна	станд.	95% интервал на		t	df	p
	вредност(\bar{x})	девијација (Σ)	грешка	доверба на разликата				
				<	>			
	-4.97700	0.48440	.15318	-5.32352	-4.63048	-32.491	9	0.000

Во табелата 28 т тестот за спарени примероци, односно спарени разлики меѓу групите Б и В покажува значајност за $p=0,000$, што укажува на значајна разлика во густината на макрофагите во двете споредени групи. Тоа подразбира поголема нумеричка густина на макрофагите кај крвните подливи стари од 3 до 7 дена за разлика од густината на макрофагите кај крвните подливи со старост од 1 до 3 дена.

Табела 29 - корелација на спарени примероци група Б и група В

	N	корелација	значајност(p)
пар 1 група Б - група В	15	-0.464	0.177

Од тестот за корелација меѓу експерименталните групи Б и В се доби резултат за негативна корелација за густината на макрофагите кај крвните подливи со старост од 1 до 3 дена и крвните подливи со старост од 3 до 7 дена (табела 29).

Табела 30 - статистика за спарени примероци група Б и група В

Пар 1		средна вредност(\bar{x})	N	стандардна девијација(Σ)	стандардна грешка
	група Б		2.6550	15	0.25596
група В		7.6320	15	0.30929	0.09781

Во табела 30 дадени се споредбено средните вредности за густината на макрофагите кај свежите крвни подливи стари од 1 до 3 дена, група Б и кај крвните подливи стари од 3 до 7 дена, група В, при што средната вредност за групата Б изнесува 2.6550, додека средната вредност за групата В изнесува 7.6320.

**Табела 31- тест за спарени примероци група В и група Г
-спарени разлики-**

пар 1 група В- група Г	средна вредност(\bar{x})	стандардна девијација(Σ)	станд. грешка	95% интервал на доверба на разликата		t	df	значајност (2-tailed)
				пониско	повисоко			
	6.14400	0.32163	0.10171	5.91392	6.37408	60.407	9	0.000

Во табелата 31 т тестот за спарени примероци, односно спарени разлики меѓу групите В и Г покажува значајност за $p=0,000$, што укажува на значајна разлика во густината на макрофагите во двете споредени групи. Тоа подразбира поголема нумеричка густина на макрофагите кај крвните

подливи стари од 7 до 14 дена за разлика од густината на макрофагите кај крвните подливи со старост од 3 до 7 дена.

Табела 32 - корелација на спарени примероци група В и група Г

	N	корелација	значајност (p)
пар 1 група В - група Г	15	0.301	0.397

Од тестот за корелација меѓу експерименталните групи В и Г се доби резултат за позитивна корелација за густината на макрофагите кај крвните подливи со старост од 3 до 7 дена и крвните подливи со старост од 7 до 14 дена (табела 32).

Табела 33 – статистика за спарени примероци група В и група Г

Пар 1	средна вредност(\bar{x})	N	стандардна девијација(Σ)	стандардна грешка
група В	7,6320	15	0.30929	0.09781
група Г	13.7760	15	0.22157	0.07007

Во табела 33 дадени се споредбено средните вредности за густината на макрофагите кај крвните подливи стари од 3 до 7 дена, група В и кај крвните подливи стари од 7 до 14 дена, група Г, при што средната вредност за групата В изнесува 7,6320, додека средната вредност за групата Г изнесува 13.7760.

Табела 34 – анализа на варијанса кај експерименталните групи А,Б,В и Г

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
макрофаги	Between Groups	1066,599	3	355,533	6751,876	<,001
	Within Groups	1,896	36	,053		
	Total	1068,495	39			
неутрофили	Between Groups	1338,672	3	446,224	6572,858	<,001
	Within Groups	2,444	36	,068		
	Total	1341,116	39			

Од резултатите на тестот за one way ANOVA (табела 34) се забележува дека постои значајна разлика помеѓу експерименталните групи за параметрите нумеричка густина на макрофаги и нумеричка густина на неутрофили, со $p < 0.001$ (кај макрофагите) и $p < 0.001$ (кај неутрофилите).

Табела 35 – мултипла споредба со Tukey HSD тест на експерименталните групи А,Б,В,Г (анализа на варијанса)

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) групи	(J) групи	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
макрофаги	група А	група Б	-2,34500*	,10262	<,001	-2,6214	-2,0686
		група В	-7,32200*	,10262	<,001	-7,5984	-7,0456
		група Г	-13,46600*	,10262	<,001	-13,7424	-13,1896
	група Б	група А	2,34500*	,10262	<,001	2,0686	2,6214
		група В	-4,97700*	,10262	<,001	-5,2534	-4,7006
		група Г	-11,12100*	,10262	<,001	-11,3974	-10,8446
	група В	група А	7,32200*	,10262	<,001	7,0456	7,5984
		група Б	4,97700*	,10262	<,001	4,7006	5,2534
		група Г	-6,14400*	,10262	<,001	-6,4204	-5,8676
	група Г	група А	13,46600*	,10262	<,001	13,1896	13,7424
		група Б	11,12100*	,10262	<,001	10,8446	11,3974
		група В	6,14400*	,10262	<,001	5,8676	6,4204
неутрофили	група А	група Б	13,36000*	,11652	<,001	13,0462	13,6738
		група В	13,36000*	,11652	<,001	13,0462	13,6738
		група Г	13,36000*	,11652	<,001	13,0462	13,6738
	група Б	група А	-13,36000*	,11652	<,001	-13,6738	-13,0462
		група В	,00000	,11652	1,000	-,3138	,3138
		група Г	,00000	,11652	1,000	-,3138	,3138
	група В	група А	-13,36000*	,11652	<,001	-13,6738	-13,0462
		група Б	,00000	,11652	1,000	-,3138	,3138
		група Г	,00000	,11652	1,000	-,3138	,3138
	група Г	група А	-13,36000*	,11652	<,001	-13,6738	-13,0462
		група Б	,00000	,11652	1,000	-,3138	,3138
		група В	,00000	,11652	1,000	-,3138	,3138

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Tukey HSD тестот, кој е дополнување на one way ANOVA тестот, прикажува детални резултати од споредбата на експерименталните групи А, Б, В и Г за параметрите нумеричка густина на макрофаги и нумеричка густина на неутрофили. Оттука се гледа дека постои значајна разлика во нумериката густина на макрофагите меѓу групите А и Б, со $p < 0.001$, меѓу групите А и В, со $p < 0.001$, меѓу групите А и Г, со $p < 0.001$, меѓу групите Б и В, со $p < 0.001$, меѓу групите Б и Г, со $p < 0.001$, како и меѓу групите В и Г, со $p < 0.001$. Кај

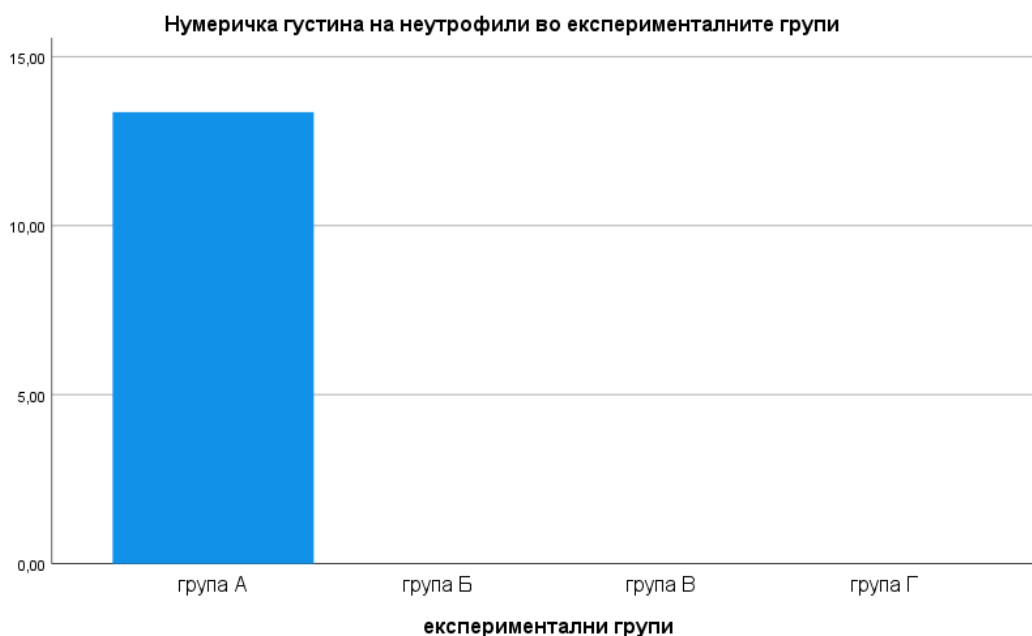
споредбата за нумеричка густина на неутрофилите меѓу експерименталните групи, значајна разлика постои меѓу групите А и Б, со $p < 0.001$, меѓу групите А и В, со $p < 0.001$ и меѓу групите А и Г, со $p < 0.001$ (табела 35).

Графикон 12 – нумеричка густина на макрофагите кај експерименталните групи А,Б,В и Г



На графиконот број 12 прикажана е нумеричката густина на макрофагите во експерименталните групи А, Б, В и Г, каде забележуваме тенденција за зголемување на нумеричката густина на макрофагите во секоја наредна експериментална група. Кај сите четири експериментални групи забележано е присуство на макрофаги, чијашто нумеричка густина расте како напредува староста на крвните подливи, односно најмала нумеричка густина на макрофагите е забележана во групата А, кај свежите крвни подливи не постари од 24 часа, додека најголема нумеричка густина на макрофагите е забележана во групата Г, кај крвните подливи со старост од 7-14 дена.

Графикон 13 – нумеричка густина на неутрофилите кај експерименталните групи А,Б,В и Г



На графиконот број 13 прикажана е нумеричката густина на неутрофилите во експерименталните групи А, Б, В и Г, каде забележуваме присуство на овие клетки само во групата А, односно кај свежите крвни подливи, не постари од 24 часа. Во останатите групи, кај крвните подливи со старост од 1-3 дена (група Б), со старост од 3-7 дена (група В) и со старост од 7-14 дена (група Г) не е забележано присуство на неутрофили.

Графикон 14 – нумеричка густина на неутрофилите и макрофагите кај експерименталните групи А,Б,В и Г



На графиконот број 14 прикажани се двата параметри-нумеричката густина на макрофагите и нумеричката густина на неутрофилите во експерименталните групи А, Б, В и Г. Присуството на неутрофили го нотираме во групата А, односно кај свежите крвни подливи, не постари од 24 часа. Во останатите групи, кај крвните подливи со старост од 1-3 дена (група Б), со старост од 3-7 дена (група В) и со старост од 7-14 дена (група Г) не е забележано присуство на неутрофили. Кај сите четири експериментални групи забележано е присуство на макрофаги, чијашто нумеричка густина расте како напредува староста на крвните подливи, односно најмала нумеричка густина е забележана во групата А, кај свежите крвни подливи, додека најголема нумеричка густина е забележана во групата Г, кај крвните подливи со старост од 7-14 дена.

8. ДИСКУСИЈА

Крвните подливи се најчести повреди кои се јавуваат од најраната возраст кај човекот. Постојат бројни студии во литературата кои ги обработуваат крвните подливи видени кај различни старосни групи на луѓе - бебиња, деца, возрасни и стари луѓе. Опишан е еден пик во јавувањето на крвните подливи во бебешката возраст, кога бебињата почнуваат да одат и да го осознаваат просторот околу нив. Притоа поради нестабилноста, слабата координација и несозреаноста на централниот нервен систем, тие се изложени на чести паѓања и повреди, најчесто на главата и екстремитетите. Сличен заклучок е изведен и за малите деца, кои поради недоразвиената координација, додека играат и си ги испитуваат сопствените мотилни способности, често се изложени на незабележливи повреди и бројни крвни подливи по екстремитетите. Другиот пик на јавување на крвните подливи е опишан кај старите луѓе над 65 годишна возраст. Кај нив станува збор за забавена моторика и слаба координација на движењата во изведувањето на

секојдневните, рутински активности, при што најчесто незабележително се здобиваат со помали крвни подливи [44].

Во форензичната практика крвните подливи се од особена важност при случаи со семејно насилство и злоупотреба на деца и стари луѓе. Најчесто се присутни како повреди кај убиства, сообраќајни или други незгоди во секојдневието. Нивното присуство често помага во разјаснување на причините за настапување на смртта [6].

Терминот крвен подлив, како повреда подразбира морфо-функционално нарушување на интегритетот на ткивото, при што површинскиот слој, епидермисот на кожата е неповреден, додека пак крвниот подлив е лоциран во поткожното ткиво, дермис или хиподермис. Заживотно настанатата повреда се карактеризира со започнување на низа витални реакции кои не се случуваат при постморталните, евентуални, повреди. Бидејќи виталните реакции се случуваат со одреден временски редослед и динамика, дозволуваат процесот во кој се наоѓа здравувањето на една повреда да го одреди и времето на настанување на повредата (95). Крвните подливи како повреди не се директна причина за настапување на смрт кај човекот, освен ако не се екстремно екстензивни и зафаќаат голема површина на телото [19,20,21].

Во оваа студија ткивниот материјал со крвни подливи беше обезбеден во текот на рутинските обдукциски процедури на Институтот за Судска медицина и деонтологија во Скопје. Според фотодокументацијата и извештајот од протоколите, крвните подливи опфатени во оваа студија се настанати акцидентално, со најчеста локализација на трупот и екстремитетите на починатите. Старосната граница на починатите се движи од 18-65 години, при што се застапени индивидуи од двата пола, но доминираат мажи. Деца и повозрасни индивидуи не беа опфатени поради разликите во активацијата и ефикасноста на имуниот систем кај овие возрасни групи. како и репарацијата на повредите кај нив, како што е наведено во ексклузионите критериуми, според литературата [6,11].

Во материјалот што го обработивме димензиите на крвните подливи се движеа од неколку милиметри до повеќе сантиметри, при што имаше и

случаи со екстензивни крвни подливи. Според ексклузионите критериуми на оваа студија и етичкиот кодекс за работа со хуман материјал, од големите крвни подливи беше земен мал примерок за анализа, помал од 2 сантиметри. Најчесто кај една индивидуа постоела повеќе крвни подливи, некаде и дифузни, на различни делови од телото. Во ретки случаи најдовме на изолирани крвни подливи, случаи каде не се работеше за акцидентална насилна смрт. Кај некои од испитуваните подливи формата беше овална, додека некои беа со неправилна форма.

Современите методи за анализа во медицината овозможуваат да се следи метаболизмот на хемоглобинот во организмот, особено формирањето на различни форми на оксидиран хемоглобин со различни биолошки активности. Комплексниот систем на организмот кој еволуирал за контрола и отстранување на клетките без хемоглобин, функционира добро, освен ако не е презаситен од прекумерно акцидентално крварење или хемолиза некаде во организмот. Оттука произлегува дека мобилните, разновидни оксидирани форми на хемоглобин можат да активираат процеси на оксидација и воспалителни реакции во организмот. Ова се случува преку ослободување на слободен хем (токсичен прооксидантен молекул), зголемено изразување на молекули за васкуларна адхезија и последователно активирање на воспалителни процеси [48]. Деталното проучување на овој синџир на настани може да доведе до развој на подобрена дијагностика и терапија со цел да се прекинат патолошките ефекти на клетките без хемоглобин во организмот.

Неколку патолошки состојби во организмот се поврзани со хемолиза, кога хемоглобинот се ослободува од еритроцитите во екстрацелуларниот простор. Екстрацелуларниот хемоглобин врши вазоактивни ефекти преку азотниот оксид (NO), кој претставува важен вазодилататор и сигнален молекул [47]. Покрај тоа, оксидацијата на екстрацелуларниот хемоглобин предизвикува прооксидансен и проинфламаторен ефект врз васкуларниот ендотел [49]. Организмот поседува ефикасни механизми за отстранување на хемоглобинот од циркулацијата, како и за контрола на штетните ефекти на екстрацелуларниот хемоглобин. По неговата интернализацијата од страна

на макрофагите, хемот се метаболира со дејство на ензимот хем оксигеназа-1 (НО-1) во биливердин, јаглерод моноксид и железо. Овој механизам не само што обезбедува ефективна елиминација на хемоглобинот, туку исто така обезбедува и рециклирање на железото за де novo еритропоеза под нормални околности [46]. Хаптоглобинот (Hp), транспортен молекул, се врзува со екстрацелуларниот хемоглобин и ја олеснува неговата интернализација во макрофагите. Хаптоглобинот е протеин на акутната фаза на воспалението, присутен е во плазмата во големи количини (0,41–1,65 мг / мл), со ексклузивна функција за врзување со екстрацелуларниот хемоглобин и негово предавање на макрофагите за деградација [50]. Образувањето на овој комплекс го олеснува отстранувањето на хемоглобинот од циркулацијата преку ендоцитоза, посредувана со CD163 макрофаг-чистач-посредуван рецептор [51].

Макроскопски наод

При макроскопска обсервација на крвните подливи, присуството на хемоглобин близу до површината на кожата ќе се прикаже црвено, но доколку хемоглобинот се наоѓа подлабоко во ткивото ќе се прикаже сино. Овој ефект е поврзан со Raighley-евиот феномен на распрснување, коефициентот на апсорпција на кожата и системот за визуелна интерпретација [25,27,108,109]. Излевањето на крвта во сврзното ткиво на кожата предизвикува воспалителна реакција [105] и ваквата реакција може да биде потенцирана при оштетување на ткивото од тапа повреда [106,107]. Како резултат на активацијата на воспалителниот одговор, започнува процес на клеточна инфилтрација во полето на крварење, покрај бројните биохемиски процеси. Полиморфонуклеарните клетки, неутрофили, се првите клетки кои што го инфилтрираат крвниот подлив, но тие најверојатно не можат да го метаболизираат хемоглобинот [110,111]. Подоцна следи инфилтрација на полето на крварење со други клетки на воспалителната реакција, моноклеарните макрофаги, клетки кои можат да ги фагоцитираат еритроцитите [112], бидејќи содржат ензим хем оксигеназа (НО) кој го овозможува првиот чекор во метаболирањето на

хемоглобинот. Овој ензим го конвертира хемоглобинот во биливердин [113]. Биливердинот претставува зелен пигмент и набрзо се конвертира во билирубин, жолт пигмент, со посредство на ензимот биливердин редуктаза (BVR). BVR е ензим кој се наоѓа во сите ткива во нормални услови, но особено се наоѓа во ретикулоцитите и макрофагите на црниот дроб и слезината [72,110].

Иницијалната појава на крвниот подлив е поврзана со забележувањето на крвта во кожата. Подливот станува видлив најрано за 15-20 минути од повредата [114]. Според публикувани податоци, иницијалната боја на подливот зависи од местоположбата во која се наоѓа излеаната крв во кожата [27,108,115]. Може да се види црвена, сина, пурпурна, темно-виолетова или зелена боја, меѓутоа овие бои не се сигурни показатели на староста на подливот [13]. Промената на бојата во крвниот подлив може да настане поради менувањето на позицијата на крвта во однос на површината на кожата [116] и може да биде потенцирана од хемоглобинот ослободен при конверзија на оксихемоглобинот во деоксихемоглобин [117].

Во експерименталната група А, каде што беа анализирани свежи крвни подливи, не постари од 24 часа, макроскопски беше забележана црвена пребоеност на местото на дејство на силата. Кожата, односно епидермисот на кожата над крвниот подлив беше интактна, но отечен поради присутниот едем во крвниот подлив, додека пак рабовите на подливите беа нејасно ограничени кон соседното здраво ткиво, придонесувајќи за неправилната форма на подливите. Во групата Б, при опсервација на крвните подливи со старост од 1 до 3 дена, пребојувањето на кожата се движеше од темно црвена до пурпурна нијанса. Ограничувањето кон соседното здраво ткиво беше подобро изразено, додека едемот во внатрешноста на подливот беше помалку изразен, поради веќе активираниот репараторен процес во организмот. Во експерименталната група В, при анализата на крвните подливи со старост од 3 до 7 дена, пребојувањето на крвните подливи беше виолетово, со нејасни рабови кон соседното здраво ткиво, додека кај последната опсервирана група Г, со подливи со старост од

7 до 14 дена пребоеноста на подливите се движеше од нијанси на кафеава до жолта боја.

За продукција на билирубин и хемосидерин на местото на крвниот подлив, кои ја даваат неговата боја, потребно е време за инфлукс на макрофаги, индукција на ензимот НО и за метаболирање на хемоглобинот [118]. Развојот на жолта боја во подливот се должи на локалната продукција на билирубин [110,119,] кој може да се докаже во серумот со зголемени вредности [120]. Постои сигнификантна разлика во просечното време на појавување на жолтата боја кај лица помлади од 65 години [112]. Литературните податоци со експериментални анимални студии посочуваат дека крвните подливи заздравуваат побрзо кај помлади единки [121] и дека функцијата на макрофагите е нарушена кај постарите единки [122,123].

Според метаболизмот на хемоглобинот и промената на бојата на крвниот подлив, дојдено е до заклучок дека само појавата на жолта боја во подливот може да даде информации во врска со неговата старост, кога се користи обсервацијата како едноставен метод за одредување на староста на крвните подливи [112]. Stephenson во својот труд дава приказ на 5 шеми од различни автори за толкување на староста на крвните подливи, според нивната боја [124], табела 1. Иницијалната боја на крвните подливи скоро секогаш е црвена, освен ако е подливот длабоко во кожата и тогаш тој е пурпурен или син. Жолта боја не може да се види порано од 18 часа од настанување на подливот [112]. Вообичаено после една седмица се забележува жолтата боја која исчезнува кон крајот на втората седмица. При интерпретација на подливите особено се важни и анамнестичките податоци, односно времето на настанување на повредата кое е различно од времето на појавувањето на крвните подливи [44].

Најчесто применуван метод во првичната интерпретација на староста на крвните подливи е методот на визуелна опсервација. Добрата страна на овој метод е практичноста и неинвазивноста за примена во клиничката форензична медицина. Меѓутоа, слаба страна е фактот дека често овој метод е непрецизен бидејќи е засегнат од повеќе фактори, како на пример, видната перцепција за боја на опсерваторот, моменталното осветлување на

подливот и пигментацијата на кожата на жртвата [115,13]. При анализата на бојата на подливите влијае и фактот што крвните подливи можат да се презентираат со задоцнување, имаат можност да мигрираат и имаат различна брзина на ресорпција [116].

Сите овие промени во пребојувањето на крвните подливи се должат на метаболизмот на екстрацелуларниот хемоглобин, кој според податоци кои ги изнесовме од литературата, како токсичен молекул треба да биде отстранет од организмот. Опсервацискиот метод за анализа на крвните подливи ни овозможи првична ориентација за времето поминато од настанување на крвните подливите и нивното евентуално влијание на *causa mortis*.

Микроскопски наод

Квалитативната и квантитативната хистолошка анализа на различните експериментални групи во оваа студија даде резултати кои кореспондираат со податоците од актуелната медицинска литература. Патохистолошката анализа го следи клеточниот одговор по настанувањето на крвниот подлив. Параметрите кои ги следевме како се менуваат беа типот на клетките кои го инфилтрираат подливот и степенот на инфилтрација со клетки кај крвните подливи во различна временска инстанца.

Со примена на квалитативна хистолошка анализа беше анализиран типот на инфилтрирани клетки, со употреба на дополнителни хистолошки методи за боења, откако беше направена рутинска хистолошка анализа на сите ткивни примероци обоени со hematoxillin/eosin метод. Со ова боење кај крвните подливи не постари од 24 часа, група А, беше утврдена екстравазација на еритроцити во полето на крварење, како и инфилтрација со полиморфонуклеарни клетки. Во оваа група дополнително беше применето боење по Giemsa, боење кое е специјално наменето за диференцирање на клетките во крвта и со тоа беше дефинирано присуството на неутрофилни гранулоцити-неутрофили кај овие крвни подливи. Во групата Б, кај крвните подливи со старост од 1 до 3 дена, покрај еритроцитите во полето на крварење беа забележани новоинфилтрирани

мононуклеарни клетки со првичното боење со hematoxillin/eosin. Со примена на боење по Perl`s Prussian Blue методот се овозможи дефинирање на мононуклеарните клетки-макрофагите. Исто така за потврда на присуството на макрофаги во оваа група на крвни подливи беше употребено и имунохистохемиско боење со апликација на анти хем оксигеназа 1 антители, боење што ја потврдува и продукцијата на ензимот HO-1 во макрофагите. Во групата В и во групата Г, кај крвните подливи со старост од 3 до 7 дена и крвните подливи со старост од 7 до 14 дена, анализата на ткивото со рутинското боење со hematoxillin/eosin покажа екстравазирани еритроцити и присуство на мононуклеарни клетки. И во овие две групи материјалот беше дополнително обработен со боење по Perl`s Prussian Blue методот и со апликација на анти хем оксигеназа 1 антители, за потврда на инфилтрираните макрофаги и нивната ензимска активност. Во текот на студијата материјалот од групите Б, В и Г, односно крвните подливи кои беа инфилтрирани со макрофаги, беа обоени и со боењето по Alcian Blue PAS метод за диференцирање на макрофагите, за да се направи споредба кој метод на хистохемиско боење ќе ни даде подобра визуелизација на овие клетки. Боењето по Perl`s Prussian Blue методот го прикажува железото фагоцитирано во цитоплазмата на макрофагите и дава одлично сино пребојување на ткивото на хистолошкиот препарат, додека боењето по Alcian Blue PAS методот макрофагите ги прикажува со црвено-бордо пребојување бидејќи ги бои кисетите мукополисахариди во нивната цитоплазма. Според добиените резултати, при анализа на крвните подливи, бидејќи при нивната репарација макрофагите го фагоцитираат железото од екстравазираните еритроцити, посоодветно боење за нивна визуелизација е боењето по Perl`s Prussian Blue методот. Здравото ткиво во околината на крвните подливи, кое што ни служеше како контролна група Д, покрај рутинското боење со hematoxillin/eosin, беше анализирано со дополнителни специјални методи на боење Elastica Van Gieson и Masson Goldner trichrome green, за да се визуелизираат морфолошките структури на слоевите на кожата околу крвниот подлив и структурата на сидот на крвните садови. Elastica Van Gieson методот овозможува визуелизирање на сидот на крвните

садови со потенцирање на еластичното сврзно ткиво. Masson Goldner trichrome green методот овозможува прикажување на сврзното ткиво во дермисот и септите од сврзно ткиво во хиподермисот, олеснувајќи го притоа одредувањето на локализација на крвните подливи во кожата.

Степенот на инфилтрација со макрофаги беше анализиран со квантитативна хистолошка анализа, со примена на стереолошки метод за одредување на нумеричката густина на клетките во волумен ткиво, претставен со соодветна статистичка обработка на наодот. Покрај првичните знаци на повредата, како што е едемот во близина на хеморагијата кој резултира со проширување на фиброзните септи, еритроцитите надвор од крвните садови го активираат воспалителниот одговор на организмот и во сврзното ткиво набрзо доаѓа до инфилтрација со воспалителни клетки [22]. Први, за приближно 4 часа од настанувањето на подливот, мигрираат полиморфонуклеарните леукоцити - неутрофили, но тие не можат да ги фагоцитираат еритроцитите. Неутрофилите не се присутни во нормалната кожа и затоа нивното присуство се смета за сигнификантно во наодот [29]. Кај свежите крвни подливи, од групата А, микроскопската анализа ни покажа инфилтрација на полето на крвниот подлив со еритроцити поради раскинатите крвни садови, како и инфлукс на неутрофили. Овие промени беа пропратени со проширување на фиброзните септи во кожата. Според литературните податоци, подоцна, приближно после 9 часа од настанувањето на крвниот подлив, мигрираат мононуклеарните леукоцити - макрофаги [30]. Фагоцитирани еритроцити во макрофагите се забележуваат после 15-17 часа од настанувањето на крвниот подлив [30]. Ретки макрофаги се присутни во нормалната кожа [29] и тоа го отежнува нивното детерминирање кога започнува нивна инфилтрација во пределот на подливот. Во хуманите кожни повреди макрофагите се наоѓаат после 3 или 7 часа, со пик на јавување од 1-2 дена после повредата [31, 21]. Еритрофагоцитозата се јавува најдоцна после 3 дена [31]. Макрофаги исполнети со хемосидерин, како резидуа од фагоцитираните еритроцити, можат јасно да се видат најрано 24-48 часа од настанувањето на крвниот подлив, но најчесто се забележуваат по 4-8 дена.

Хемосидеринот вообичаено се наоѓа во ткивото 90 часа после настанувањето на подливот, додека хематоидинот повремено се наоѓа 9 часа после настанување на подливот [30]. Ваков наод ни потврди веќе следната експериментална група, Б, каде крвните подливи се со старост од 1 до 3 дена. Во полето на крварење беше забележана почетна инфилтрација со макрофаги. Покрај ретките макрофаги во полето на крвниот подлив беа присутни и екстравазираните еритроцити. Во следната експериментална група В, каде што испитуваните крвни подливи се со старост од 3 до 7 дена забележана е поизразена инфилтрација со макрофаги и појава на хемосидерински гранули во полето на крварење. Инфилтрацијата со макрофаги, односно нивната густина во полето на крварење беше анализирана со квантитативна хистолошка анализа, со примена на стереолошки метод и статистичка обработка и презентација на наодот. Статистички беше потврдена како сигнификантно значајна густината на макрофагите во групата В во споредба со групата Б, користејќи Student`s t test за споредба на две експериментални групи, со вредност за $p < 0.001$, односно густината на макрофагите кај крвните подливи со старост од 3 до 7 дена е статистички значајна во споредба со густината на макрофагите кај крвните подливи со старост од 1 до 3 дена. Истата сигнификантна значајност, $p < 0.001$, ја утврдивме и при споредба кај експерименталните групи В и Г, односно густината на макрофагите кај крвните подливи со старост од 7 до 14 дена е статистички значајна во споредба со густината на макрофагите кај крвните подливи со старост од 3 до 7 дена.

Неутрофилите се полиморфонуклеарни клетки, припаѓаат на белата крвна лоза и се белег на акутната воспалителна реакција. Тие се првите клетки кои го инфилтрираат местото на повредата веднаш по настанувањето на повредата. Сепак, тие не можат да репарираат одредени повреди или инфекции без помош на други видови имунокомпетентни клетки [128].

Макрофагите се мононуклеарни клетки на имунолошкиот систем, припадници на белата крвна лоза кои имаат способност за фагоцитоза и

дигестија на страните супстанции, микроби, карциномските клетки и било кои други супстанции кои го немаат типот на протеини специфични за здравите телесни клетки [64]. Овие големи фагоцити се наоѓаат во суштина во сите ткива, каде патролираат за потенцијални патогени, придвижувајќи се со амебовидно движење [65]. Именувани се со различни имиња кога се локализирани на различни места низ целиот организам (на пример хистиоцити-сврзно ткиво, Купферови клетки-хепар, алвеоларни макрофаги-бели дробови, микроглија-мозок), но сите се дел од системот на мононуклеарни фагоцити. Покрај фагоцитозата, тие играат клучна улога во неспецифичната одбрана на организмот (вроден имунитет) и исто така помагаат во иницирање на специфични одбранбени механизми (стекнат имунитет) со регрутирање на други клетки на имунолошкиот систем, како што се лимфоцитите. Тие се важни како антигени презентери на Т-клетките. Кај луѓето, дисфункционалните макрофаги предизвикуваат сериозни заболувања како што е хроничното грануломатозно заболување кое резултира со чести инфекции. Покрај тоа што ја помагаат воспалителната реакција и го стимулираат имунолошкиот систем, макрофагите исто така играат важна анти-инфламаторна улога и можат да ги намалат имуните реакции преку ослободување на цитокини. Макрофагите кои ја поттикнуваат воспалителната реакција се нарекуваат М1 макрофаги, додека оние што ја намалуваат истата и го поттикнуваат обновувањето на ткивата се нарекуваат М2 макрофаги [66]. Оваа разлика произлегува од нивниот метаболизам; М1 макрофагите имаат уникатна способност да го метаболизираат аргининот во молекул „убиец“ азотен оксид (NO), додека М2 макрофагите имаат уникатна способност да го метаболизираат аргининот во „поправачки“ молекул орнитин. Сепак, оваа дихотомија неодамна била доведена во прашање бидејќи била откриена дополнителна сложеност кај макрофагите. Човечките макрофаги се мононуклеарни клетки со големина од 21 микрометар во дијаметар и се создаваат со диференцијација на моноцитите во ткивата [67]. За прв пат биле откриени од Ели Метchnikoff, руски зоолог, во 1884 година [69]. Можат да се идентификуваат со употреба на хистохемиски бојења, проточна

цитометрија или имунохистохемиски боења со специфичен израз на протеини. Боењето по Perl`s Prussian Blue методот овозможува боење на фагоцитираните молекули на железо во цитоплазмата на макрофагите и на тој начин макрофагите се гледаат сино обоени на хистолошките препарати. Имунохистохемиската апликација на анти хем оксигеназа 1 антителиво дава визуелизација на макрофагите на хистолошки препарати, при што макрофагите ги гледаме обоени кафеаво. Таа реакција на апликација на антителивото се одвива по принципот на реакција со специфичен протеин од ензимот хем оксигеназа 1 што го синтетизираат макрофагите во полето на крварење, при фагоцитоза и метаболизам на еритроцитите.

Макрофагите се неопходни за заздравување на повредите [53]. Тие ги заменуваат полиморфонуклеарните неутрофили како доминантни клетки во повредите најдоцна за два дена од настанувањето на повредата [54]. Неутрофилите го претставуваат ред на клетки кои се активираат при заздравување на повредите, како резултат на активирана воспалителна реакција. Овие клетки не можат да извршат фагоцитоза на ткивниот дебрис и страните тела во ткивото. Привлечени од факторите на раст сигнализирани од тромбоцитите и други клетки, моноцитите од крвотокот влегуваат во полето на повредата преку сидот на крвните садови [55]. Бројни моноцити достигнуваат еден до еден и пол ден по појавата на повредата. Откако ќе се населат во полето на повредата, моноцитите созреваат во макрофаги. Слезината содржи половина од моноцитите на телото како резерва подготвени да бидат распоредени во повреденото ткиво [56,57]. Главната улога на макрофагите е да ги фагоцитира бактериите и оштетеното ткиво [53], но исто така го дебризираат оштетеното ткиво со ослободување на протеази [58]. Макрофагите ослободуваат голем број фактори, како што се факторите на раст и други цитокини, особено за време на третиот и четвртиот пост-трауматичен ден. Овие фактори привлекуваат клетки вклучени во пролиферативната фаза за заздравувањето во полето на повредата [59,60]. Макрофагите се стимулирани од ниската содржина на кислород во нивното опкружување за да произведат фактори кои

предизвикуваат и ја забрзуваат ангиогенезата [61] и исто така ги стимулираат клетките кои повторно ја епителизираат раната, создаваат грануларно ткиво и создаваат нов екстрацелуларен матрикс [62].

Хематоидинот претставува пигмент кој е хемиски идентичен со билирубинот. Се јавува во ткивата како резултат на метаболирањето на хемоглобинот, особено во услови на намалена концентрација на кислород. Хематоидинот не содржи железо, се формира интрацелуларно, веројатно во ретикулоендотелните клетки, но често се наоѓа и екстрацелуларно, по 5-7 дена во фокуси на претходно крварење [82,83]. Хистолошки го нотираме како рефрактилни, жолто-кафени или портокалово-црвени гранули, но покарактеристични се ромбоидни плочки, т.н. *hematoidin burrs*, наредени во радијален распоред [80]. Наодот на хематоидин е знак на крварење кое е во правец на резолуција. Боење со методот *Perl's Prussian Blue* овозможува лесно да се направи разликата помеѓу хематоидин и хемосидерин. Хемосидеринот дава сино обоени честички во полето на крварењето, додека хематоидинот останува со лесно кафеаво пребојување [81].

Хемосидеринот е комплекс за складирање на железо. Распаѓањето на хемот резултира со појава на биливердин и железо [84,85]. Организмот потоа го заробува ослободеното железо и го чува како хемосидерин во ткивата. Хемосидеринот исто така се создава и од абнормалниот метаболички пат на феритинот [86]. Се наоѓа само во клетките (за разлика од она што циркулира во крвта) и претставува комплекс од феритин, денатуриран феритин и друг материјал [87,88]. Железото во склоп на хемосидеринот е многу слабо достапно за снабдување на организмот со железо кога е потребно. Хемосидеринот може да се идентификува хистолошки со методот на боење пруско сино (*Perl's Prussian Blue*), при што се бои сино до црно кога е изложено на дејството на калиум фeroцијанид [89]. Во нашето истражување, хемосидерински остатоци беа нотирани при обработка на ткивата со *Perl's Prussian Blue* метод на боење, каде што хемосидеринот беше изразено сино обоен, интернализиран во макрофагите. Ваков наод беше забележан кај примероците во групите В и Г, односно кај

крвните подливи со старост од 3 до 7 дена и од 7 до 14 дена, соодветно. Кај нормалните животни, депозитите на хемосидерин се мали и најчесто невидливи без посебни методи на боење. Прекумерната акумулација на хемосидерин обично се открива во клетките на мононуклеарниот фагоцитен систем (MPS) или повремено во епителните клетки на црниот дроб и бубрезите. Неколку болести резултираат со таложење на поголеми количини на хемосидерин во ткивата, иако овие депозити често не предизвикуваат симптоми, тие можат да доведат до оштетување на органите.

Хемосидеринот најчесто се наоѓа во макрофагите и особено го има во изобилство после крварење, што укажува дека неговото формирање е поврзано со фагоцитозата на еритроцитите и хемоглобинот. При крварење, по раскинувањето на крвните садови еритроцитите умираат и хемоглобинот останува во екстраклеточниот простор. Притоа се активира воспалителната реакција и имуниот одговор за да биде отстранет хемоглобинот, со дејство на макрофагите кои вршат фагоцитоза. Со метаболирањето на хемоглобинот во макрофагите се произведува биливердин и хемосидерин. Хемосидеринот може да се најде во макрофагите на слезината, белите дробови, коскената срцевина и црниот дроб при масивна хемолиза или прекумерен внес на железо во организмот. Железото е потребно за бројни хемиски реакции во организмот (оксидо-редуктивни реакции), но истото е токсично кога не е соодветно складирано. Поради таа потреба организмот развил различни начини за складирање на железото [86].

Прецизен метод за одредување на староста на крвните подливи е хистолошката анализа на ткивото во кое се формирал подливот. Овој метод се употребува само во постморталната анализа на крвните подливи во судската медицина. Betz и Eisenmenger во својата морфометриска студија опишуваат значително количество на хемосидерин во макрофагите, околу 20% и повеќе од видното поле, кое индицира старост на крвниот подлив од околу 1 седмица [32]. При интерпретацијата на застапеноста на макрофагите во експерименталните групи во оваа студија се одлучивме за квантитативна (стереолошка) анализа на нивната густина во видното поле,

наместо нивно прикажување со процентуална застапеност, поради попрецизните податоци што ги овозможува стереолошкиот метод за анализа на густината на клетките во ткивото. Raekallio J. утврдил и присуство на фибрин во субкутаните хеморагии, но заклучил дека згругчувањето во ткивото со хеморагија може да се јави и посмртно и дека тоа не е доказ за витална реакција [101]. Бидејќи постмортална фибринолиза се јавува 1 ден после хеморагијата, наод на добро зачувана фибринска мрежа во субкутаните хеморагии, анализирани при обдукција 2-3 дена по смртта, посочуваат на витално или агонално потекло на хеморагијата, односно крвниот подлив [95]. Во нашата студија формирана фибринска мрежа беше забележана во полето на крварење кај испитуваните групи А и Б, кај групата В беа забележани остатоци од фибрин во полето на крварење, додека во групата Г не беше забележано присуство на фибрин.

Како значајно во ова истражување се истакна зголемување на нумеричката застапеност (густина) на макрофагите во полето на крвниот подлив во зависност од времето поминато од нивното настанување. Со примена на Student`s t test направени се споредбени анализи меѓу експерименталните групи и побарана е статистичка значајност за густината на макрофагите во споредуваните групи, која е помала од 0,001, вредност која покажува сигнификантност на наодот. Spearman`s rank correlation test-от покажа позитивна корелација помеѓу староста на крвните подливи во денови и густината на макрофагите во нив.

Од овие резултати дојдовме до заклучок дека примарната реакција на организмот на настанување на крвниот подлив е со активирање на воспалителна реакција во полето на крварење. Резултат на тоа е инфлукс на имунокомпетентни клетки-неутрофили. Бидејќи овие клетки не можат да го метаболираат екстрацелуларниот хемоглобин, набрзо, во период од 1 до 2 дена, се заменети со други имунокомпетентни клетки, макрофаги, кои овозможуваат репаративен процес. Како што беше наведено во литературните податоци, макрофагите кога се доселуваат во полето на крварење, откако ќе ги фагоцитираат еритроцитите и екстрацелуларното

железо, продуцираат ензим НО-1 кој овозможува метаболизам на екстрацелуларниот хемоглобин. Активираниите макрофаги во полето на крварење ги потврдивме со апликација на анти НО-1 антители, метод кој ни овозможи визуелизација на макрофагите и нивната морфологија. Макрофагите ги забележавме како моноклеарни крупни клетки со димензии од околу 20 μm , со овално тело со псевдоподии, изразено кафеаво обоени што е сигнал за продукција на ензимот НО-1.

Имунохистохемија за парафински пресеци (immunohistochemistry-paraffin sections; ИНС-Р) е метод на имуно-боење, кој вклучува процес на селективно идентификување на антигени (протеини) во клетките на ткивни слајдови со примена на принципот специфично врзување на антиген-антитело, со употреба на специфични антитела [102]. Изразот имунохистохемија потекнува од зборот "имуно", во однос на антителата што се употребуваат во постапката и "хисто", што го означува ткивото (споредено со имуноцитохемија). Алберт Конс ја конципираше и за прв пат ја спровел техниката во 1941 година [103].

ИНС се употребува за одредување на староста на крвните подливи преку детерминирање на активноста на ензимот НО-1, експресиран во макрофагите кои го инфилтрираат крвниот подлив. Со примена на овој метод може да се докаже и да се мери експресијата на НО-1. Хем оксигеназа (НО) е ензим што ја катализира деградацијата на хемот. При оваа реакција се создава биливердин, железо II оксид и јаглерод монооксид [70,71]. НО за прв пат е опишан кон крајот на 1960-тите, кога Тенхунен покажал ензимска реакција за катаболизам на хемот [72]. НО е значаен извор за производство на ендоген јаглерод монооксид (СО), процес што интензивно се проучува за терапевтски придобивки [73].

Хем оксигеназата е член на heat shock family протеините (HSP). Содржи хем идентификуван како HSP32. HSP се семејство на протеини, кои се произведуваат од клетките како одговор на изложеност на организмот на состојби на стрес. Најпрво биле опишани во врска со топлотниот шок [90], но сега е познато дека се изразени и за време на други состојби на стрес,

вклучително и изложеност на студ, УВ светлина и за време на заздравување на раните или регенерирање на ткивата [91,92,93]. НО е 32kDa ензим и содржи 288 остатоци од аминокиселини кодирани од генот НМОХ1 [74]. Се наоѓа во ендоплазматскиот ретикулум на клетките, иако е забележан и во митохондриите, клеточното јадро и клеточната мембрана [75]. Иако е присутен низ целото тело, НО има значителна активност во слезината при деградација на хемоглобинот за време на рециклирање на еритроцитите (0,8% од пулот на еритроцитите на ден), што учествува со 80% во ендогеното производство на СО од хем потекло [76]. НО ензимите се деградираат во организмот преку убиквитинација [77]. Кај луѓето се познати три изоформи на хем оксигеназата, едната е индуктибилна форма НО-1, другите две се конститутивни форми НО-2, НО-3 [78,79,104].

НО-1 е изо-форма на НО, чие манифестирање во организмот е предизвикано во состојби на стрес. Присутен е во целото тело, со најголеми концентрации во слезината, црниот дроб и бубрезите [78]. Една студија покажала дека нивоата на НО-1 во ткивото на белите дробови биле директно поврзани со инфекција со туберкулоза, а нокаут глумците биле подложни на експресија, покажувајќи ја суштинската улога на овој ензим [79].

Овој ензим има потенцијална улога во модулирањето на имуниот одговор [45]. Формата присутна во макрофагите е НО-1 и вообичаено се наоѓа во мали количества во нив. Ензимот е исто така присутен и во фибробластите во индуктибилна форма, но овие клетки немаат улога во метаболизмот на хемоглобинот во крвните подливи [125]. Количеството на ензимот НО-1 во макрофагите се зголемува при фагоцитоза на еритроцити [45,112,118] или при изложеност на макрофагите само на хемоглобин [110]. Во НО-1 позитивните клетки, кои кореспондираат со полето на макрофагите во крвниот подлив, активноста на ензимот најрано може да биде детектирана 3 часа по настанувањето на крвниот подлив, но пикот на експресијата е после 3 дена. [30]. Nakajima T et al. во својот труд за субкутани хеморагии ја анализирале експресијата на ензимот НО-1 и инфилтрацијата со макрофаги. Тие дошле до заклучок дека

детерминирањето на НО-1 експресијата може да даде корисни информации во одредувањето на староста на крвните подливи [126]. Во нашето истражување дојдовме до слични податоци, со примена на имуно-боењето со анти НО-1 антители. Веќе во втората испитувана група, Б, каде крвните подливи беа со старост од 1 до 3 дена, анализираниите макрофаги покажаа продукција на ензимот и дадоа кафеав сигнал при боењето. Истиот изразен кафеав сигнал кај макрофагите беше нотирен и во групата В и групата Г, каде крвните подливи се со старост од 3 до 7 дена и од 7 до 14 дена, соодветно.

Квалитативната и квантитативната анализа на примероците во групата Д, каде е анализирано соседното здраво ткиво околу крвните подливи, даде податци за нормална морфолошка структура на кожата и нејзина нормална цито-архитектоника. Во хистолошката анализа на кожата се забележува површински интактен слој, епидермис, изграден од повеќе слоеви на клетки, со орожат најповршински слој кој содржи безјадрени клетки. Кај здравата кожа неговата функција е заштитна, бариерна. Слојот под него е претставен со густо сврзно ткиво, богато со колагени влакна и бројни нерви и крвни садови, како и кожни аднекси. Овој слој ја дава цврстината на кожата. Најдлабокиот слој на кожата е претставен со адипозно ткиво, кожни аднекси, нервни снопови и богата васкуларна мрежа. Најдлабокиот слој на кожата е задолжен за терморегулацијата на организмот. Во контролната група Д, не беше забележан инфлукс на имунокомпетентни клетки, ниту нарушување на нормалната хистолошка градба на кожата како последица на крвниот подлив во соседното ткиво.

Морфолошките промени на ткивото како одговор на траумата, во нашата студија формирањето на крвните подливи, се солиден параметар во судската медицина кој покажува колку време поминало од настанувањето на повредата. Позитивниот наод на макрофагите, како и отсуство на неутрофили во крвните подливи има пресудна улога во толкувањето на нивната старост, особено тоа што првичното рано јавување на макрофагите се смета за параметар со кој се одредува минималната старост на повредата. Свое значење има и негативниот наод доколку регуларната појава на

испитуваниот параметар-макрофагите е утврдена со систематска анализа на доволен број на случаи со познато време на настанување на повредата [95]. Морфолошките параметри можат да се обработат и презентираат на три начини- квалитативно, семи-квантитативно и квантитативно. При квалитативната анализа се потврдува присуство или отсуство на испитуваниот параметар. Семи-квантитативната анализа се врши според претходно одредена скала за степенување на одреден параметар, додека квантитативната анализа овозможува броење и соодветно толкување на густината на некој параметар, како на пример-клетки, во единица волумен од испитуваното ткиво. Параметарот макрофаги кај крвните подливи во оваа студија е презентираан квалитативно, со специфични методи на броење, како присутни клетки во различен временски интервал по формирањето на крвниот подлив и квантитативно, со примена на стереолошка анализа и соодветна статистичка обработка.

Стереологијата е метод на тродимензионално толкување на дводимензионалните пресеци на ткива. Таа овозможува добивање на квантитативни информации за тродимензионален материјал од мерења направени на дводимензионални рамни пресеци на материјалот. Стереологијата е метод што користи рандомизирано, систематско земање на мостри за анализа со цел да обезбеди непристрасен и квантитативен податок. Таа е важна и ефикасна алатка во многу апликации на микроскопијата (како што се петрографијата, науката за материјали, биолошките науки, вклучувајќи ја тука и хистологијата). Во оваа студија стереолошката анализа овозможи со употреба на многунаменски тестен систем м42, броење на клетките, макрофаги, во полето на крварење и нивно изразување со помош на математички формули како нумеричката густина на клетките во единица волумен [96,97]. Квантитативната стереолошка анализа ни овозможи преку анализа на ткивото на две димензии да конструираме заклучоци што би очекувале да се случува при процесот на репарација во живото ткиво [98,99,100]. Овој тип на анализа се препорачува за примена доколку сакаме добро потврдена интерпретација на староста на крвните подливи.

9. ЗАКЛУЧОЦИ

1. Првичната презентација на подливите најлесно ја забележуваме со метод на опсервација. Опсервацискиот метод дава брза ориентација за времето на настанување на крвниот подлив, но не и дефинитивна потврда.
2. Формирањето на крвниот подлив предизвикува воспалителна реакција во ткивото и отпочнување на процес на репарација.
3. Микроскопската анализа со примена на различни методи на боене (Perl`s Prussian Blue, анти хем оксигеназа 1 антители) дава мошне сигурна проценка за времето на настанување на крвниот подлив, при што микроскопската анализа како метод е ограничена само за постморталната анализа.
 - Со метод на микроскопска анализа потврдуваме миграција на различни типови на клетки на имуниот одговор во полето на крварење во одреден временски интервал:
 - Во групата А, кај свежите крвни подливи, првиот инфлукс е претставен со полиморфонуклерни клетки неутрофили.

- Во групата Б, кај крвните подливи со старост од 1 до 3 дена, следи инфлукс со макрофаги кои го метаболираат слободното, екстраклеточно железо како токсичен молекул.
 - Во групата В, кај крвните подливи со старост од 3 до 7 дена, најдена е сигнификантна вредност во густината на макрофагите споредбено со претходната експериментална група Б.
 - Во групата Г, кај крвните подливи со старост од 7 до 14 дена, квантитативната хистолошка анализа исто така покажа статистички сигнификантна вредност за густината на макрофагите во крвните подливи во оваа група, во споредба со останатите експериментални групи, Б и В.
 - Метаболизмот на железото во макрофагите, односно продукција на ензимот хем оксигеназа 1, се потврдува со примена на имунохистохемиски метод на боене, со апликација на анти хем оксигеназа 1 антителио.
4. Сите овие наоди овозможуваат конципирање на лесно апликативен алгоритам за анализа на крвните подливи, кој опфаќа првична макроскопска анализа на подливите проследена со хистолошка потврда со соодветни боења (Perl`s Prussian Blue, анти хем оксигеназа 1 антителио).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Senn DR, Weems RA. Manual of Forensic Odontology, Fifth Edition. CRC Press, 2013. ISBN 9781439851340.
2. Modi JP, Modi NJ. Modi's Textbook of medical jurisprudence and toxicology. Bombay: N.M.Tripathi; 1972
3. FDA US Food and drug administration. Drugs. Aspirin for Reducing Your Risk of Heart Attack and Stroke: Know the Facts. Available at: <https://www.fda.gov/Drugs/ResourcesForYou/Consumers/BuyingUsingMedicineSafely/UnderstandingOver-the-CounterMedicines/SafeDailyUseofAspirin/ucm291433.htm> [accessed 18 October 2017]
4. U.S. National Library of Medicine. MedlinePlus. Ibuprofen. Available at: <https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a682159.html> [accessed 24.10.2017]
5. Healthline. Anticoagulant and antiplatelet drugs. Available at: <https://www.healthline.com/health/anticoagulant-and-antiplatelet-drugs#overview1> [accessed 24.10.2017]
6. Jennette JC; Falk RJ; Bacon PA et al. "2012 Revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides". Arthritis & Rheumatism. 65 [1]: 1–11, 2013. PMID 23045170. doi:10.1002/art.37715.
7. Carpenter KJ. The History of Scurvy and Vitamin C. Cambridge University Press. p. 172, 1988. ISBN 0-521-34773-4.
8. Mayer EA. Functional gastrointestinal disorders. In: Goldman L, Schafer AI, eds. Goldman's Cecil Medicine. 25th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2016:chap 137.

9. Ely SF, Hirsch CS "Ashpyxial deaths and petechiae: a review" . Journal of Forensic Science(2000)45 [6]: 1274–1277.
10. Lee AC. "Bruises, blood coagulation tests and the battered child syndrome" (2008), Singapore Medical Journal. 49 [6]: 445–449. PMID 18581014
11. The BMJ. Investigating easy bruising in a child. BMJ 2010;341:c4565. Available at: <http://www.bmj.com/content/341/bmj.c4565> [accessed 25.10.2017]
12. Langlois NEI. The science behind the quest to determine the age of bruises—a review of the English language literature. Forensic Science Medicine and Pathology 2007;3:241-251.
13. Langlois NEI, Gresham GA. The ageing of bruises: A review and study of the colour changes with time. Forensic Science International, 50 [1991] 227 – 238
14. Hughes VK, Ellis PS, Langlois NE. The perception of yellow in bruises. J Clin Forensic Med. 2004 Oct;11[5]:257-9.
15. Hunt E, Beverley J. "Bleeding and Coagulopathies in Critical Care". New England Journal of Medicine(2014); 370 [9]: 847–859. ISSN 0028-4793. doi:10.1056/NEJMra1208626.
16. Lackland DT; Weber MA. "Global burden of cardiovascular disease and stroke: hypertension at the core.".The Canadian journal of cardiology(2015); 31 [5]: 569-71
17. Camps FE. Gradwohl's legal medicine, 2d ed. Bristol: J. Wright; 1968
18. Dogra Dr.TD.Lyons: Medical Jurisprudence & Toxicology, 11th ed. New Delhi: Delhi Law House; 2015
19. Hiss J, Kahana T. Medicolegal investigation of death in custody: a postmortem procedure for detection of blunt force injuries. Am J Forensic Med Pathol 1996;17:312-314.

20. Hiss J, Kahana T, Kugel C. Beaten to death: why do they die? *J Trauma* 1996;40:27-30.
21. Oenmichen M. *Vitality and time course of wounds. Forensic Sci Int* 2004;144:221-231
22. Vanezis P. Interpreting bruises at necropsy. *J Clin Pathol* 2001;54:348-355.
23. Cluroe AD. Superficial soft-tissue injury. *Am J Forensic Med Pathol* 1995;16:142-146.
24. Camps F. Interpretation of wounds. *Br Med J* 1952;2:770-772.
25. Edwards EA, Duntley SQ. The pigments and color of living human skin. *Am J Anat* 1939;65:1-33.
26. Hardy JD, Hammel HT, Murgatroyd D. Spectral transmittance and reflectance of excised human skin. *J Appl Physiol* 1956;9:257-264
27. Bonhert M, Baumgartner R, Pollak S. Spectrophotometric evaluation of the color of intra- and subcutaneous bruises. *Int J Legal Med* 2000;113:343-348.
28. Gall J, Payne-James J. *Current practice in forensic medicine*. ©2011 John Wiley & Sons, Ltd. Publication. ISBN:978-0-470-74487-1.
29. Tarran S, Langlois NEI, Dziewulski P, Sztynka T. Using the inflammatory cell infiltrate to estimate the age of human burn wounds: a review and immunohistochemical study. *Med Sci Low* 2006;46:115-126.
30. Microscopy of bruises. Available from <http://www.forensicmed.co.uk/wounds/blunt-force-trauma/bruises/microscopy-of-bruises>. Accessed April 24th 2014
31. Betz P. *Histological and enzyme histochemical parameters for the age estimation of human skin wounds. Int J Legal Med* 1994;107:60-68.

32. Betz P, Eisenmenger W. Morphometrical analysis of hemosiderin deposits in relation to wound age. *Int J Leg Med* 1996;108:262–264.
33. DiMaio, Dominick; DiMaio, Vincent J. M. [2001-06-28]. Forensic Pathology, Second Edition. CRC Press. ISBN 9781420042412.
34. Maguire S, Mann MK, Sibert J, Kemp A. Can you age bruises accurately in children? A systematic review. *BMJ Journals*
<http://dx.doi.org/10.1136/adc.2003.044073>
35. Terazawa K. Observations on injuries by blunt objects. Nihon Hoigaku Zasshi. 2010 Dec;64[2]:103-20
36. Spitz WU, editor. *Medicolegal Investigation of Death*. 4th ed. Springfield: Charles C. Thomas Publisher; 1974.
37. Elder ED, Elenitsas R, Johnson BL, Murphy GF, Xu X, editors. *Lever`s histopathology of skin*. 10th edition. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 2009. p. 817-823
38. McCausland IP, Dougherty R. Histological ageing of bruises in lambs and calves. *Au& Vet. J* 54 [1978]: 525-528.
39. Otterbein LE, Soares MP, Yamashita K, Bach FH. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. Trends Immunol.2003; 24[8]:449-55.
40. Gozzelino R, Jeney V, Soares MP. Mechanisms of Cell Protection by Heme Oxygenase-1. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2010. 50:323–54
41. Yoshida T, Migita CT. Mechanism of heme degradation by heme oxygenase. J Inorg Biochem. 2000 Nov;82[1-4]:33-41.
42. Robertson I, Ante-mortem and post-mortem bruises of the skin. *J. Forensic Med.*, 4 [1957] 2-10.
43. Bertino AJ. "Forensic Science: Fundamentals and Investigations" South-Western Cengage Learning, 2008, ISBN 978-0-538-44586-3
44. Mosqueda L. MD, Burnight K. PhD, Liao S. MD, Giorno R. "Bruising in the Geriatric Population" [1984], *Diagn Immunol*.2:161-6

45. Willis D, Moore AR, Frederick R, Willoughby DA. Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. *Nat Med* 1996;2:87-93.
46. Jeney V, Eaton JW, Balla G, Balla J. “Natural History of the Bruise: Formation, Elimination, and Biological Effects of Oxidized Hemoglobin”. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Volume 2013, Article ID 703571, 9 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/703571>
47. Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT, “The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease”, *Journal of the American Medical Association*, vol. 293, no. 13, pp. 1653–1662, 2005.
48. Balla J, Vercellotti GM, Jeney V et al., “Heme, heme oxygenase and ferritin in vascular endothelial cell injury,” *Molecular Nutrition and Food Research*, vol. 49, no. 11, pp. 1030–1043, 2005.
49. Silva G, Jeney V, Chora A, Larsen R, Balla J, Soares MP, “Oxidized hemoglobin is an endogenous proinflammatory agonist that targets vascular endothelial cells”, *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 43, pp. 29582–29595, 2009.
50. Alayash AI, “Haptoglobin: old protein with new functions,” *Clinica Chimica Acta*, vol. 412, no. 7-8, pp. 493–498, 2011.
51. Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C et al., “Identification of the haemoglobin scavenger receptor,” *Nature*, vol. 409, no. 6817, pp. 198–201, 2001.
52. "Harrison's Principles of Internal Medicine". 17th ed. United States: McGraw-Hill Professional, 2008.
53. de la Torre J., Sholar A. (2006). Wound healing: Chronic wounds. Emedicine.com. Accessed January 20, 2008.

54. Expert Reviews in Molecular Medicine. (2003). The phases of cutaneous wound healing Archived 17 December 2008 at the Wayback Machine. 5: 1. Cambridge University Press. Accessed January 20, 2008.
55. Lorenz HP and Longaker MT, Wounds: Biology, Pathology, and Management. (2003). Archived 31 October 2005 at the Wayback Machine. Stanford University Medical Center. Accessed January 20, 2008.
56. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, Figueiredo JL, Kohler RH, Chudnovskiy A, Waterman P, Aikawa E, Mempel TR, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ (July 2009). "Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites". *Science*. 325 (5940): 612–6. Bibcode:2009Sci...325..612S. doi:10.1126/science.1175202. PMC 2803111. PMID 19644120.
57. Jia T, Pamer EG, "Immunology. Dispensable but not irrelevant", *Science*. 325 (5940): 549–50. (2009) Bibcode:2009Sci...325..549J. doi:10.1126/science.1178329. PMC 2917045. PMID 19644100.
58. Deodhar AK, Rana RE. "Surgical physiology of wound healing: a review". *Journal of Postgraduate Medicine*. 43 (2): 52–6. (1997), PMID 10740722.
59. Rosenberg L., de la Torre J. "Wound Healing, Growth Factors". Emedicine.com. (2006). Accessed January 20, 2008.
60. Newton PM, Watson JA, Wolowacz RG, Wood EJ. "Macrophages restrain contraction of an in vitro wound healing model". *Inflammation*. 28 (4): 207-14. (2004) doi:10.1023/B:IFLA.0000049045.41784.59. PMID 15673162.
61. Greenhalgh DG. "The role of apoptosis in wound healing". *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 30 (9): 1019–30. (1998) doi:10.1016/S1357-2725(98)00058-2. PMID 9785465.

62. ^ Stashak TS, Farstvedt E, Othic A. "Update on wound dressings: Indications and best use". *Clinical Techniques in Equine Practice*. 3 (2): 148–163. (2004). doi:10.1053/j.ctep.2004.08.006.
63. Macrophage is sometimes abbreviated Mφ or MΦ.
64. "Regenerative Medicine Partnership in Education".
65. Ovchinnikov DA. "Macrophages in the embryo and beyond: much more than just giant phagocytes". *Genesis*. 46 (9):447–62. (2008)doi:10.1002/dvg.20417. PMID 18781633.
66. Mills CD. "M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease". *Critical Reviews in Immunology*. 32 (6): 463–88. (2012). doi:10.1615/CritRevImmunol.v32.i6.10. PMID 23428224.
67. Krombach F, Münzing S, Allmeling AM, Gerlach JT, Behr J, Dörger M. "Cell size of alveolar macrophages: an interspecies comparison". *Environmental Health Perspectives*. 105 Suppl 5 (Suppl 5): 1261-3. (1997). doi:10.2307/3433544. PMID 9400735.
68. Khazen W, M'bika JP, Tomkiewicz C, Benelli C, Chany C, Achour A, Forest C. "Expression of macrophage-selective markers in human and rodent adipocytes". *FEBS Letters*. 579 (25): 5631–4. (2005). doi:10.1016/j.febslet.2005.09.032. PMID 16213494.
69. Semyon Zalkind . "Ilya Mechnikov: His Life and Work". Honolulu, Hawaii: University Press of the Pacific. pp. 78, 210. (2001). ISBN 978-0-89875-622-7.
70. Kikuchi G, Yoshida T, Noguchi M . "Heme oxygenase and heme degradation". *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 338 (1): 558–567. (2005). doi:10.1016/j.bbrc.2005.08.020. PMID 16115609.
71. Ryter SW, Alam J, Choi AM . "Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications". *Physiological Reviews*. 86 (2): 583–650. (2006). doi:10.1152/physrev.00011.2005. PMID 16601269.

72. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. "Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme". *The Journal of Biological Chemistry*. 244 (23): 6388–6394. (1969). PMID 4390967.
73. Motterlini R, Otterbein LE. "The therapeutic potential of carbon monoxide". *Nature Reviews. Drug Discovery*. 9 (9): 728–743. (2010). doi:10.1038/nrd3228. PMID 20811383.
74. Barton SG, Rampton DS, Winrow VR, Domizio P, Feakins RM. "Expression of heat shock protein 32 (hemoxygenase-1) in the normal and inflamed human stomach and colon: an immunohistochemical study". *Cell Stress & Chaperones*. 8 (4): 329–334, (2003). PMC 514904. PMID 15115285.
75. Hopper CP, Meinel L, Steiger C, Otterbein LE. "Where is the Clinical Breakthrough of Heme Oxygenase-1 / Carbon Monoxide Therapeutics?". *Current Pharmaceutical Design*. 24 (20): 2264–2282, (2018).doi:10.2174/1381612824666180723161811. PMID 30039755
76. Breman HJ, Wong RJ, Stevenson DK. "Chapter 15: Sources, Sinks, and Measurement of Carbon Monoxide". In Wang R (ed.). *Carbon Monoxide and Cardiovascular Functions (2nd ed.)*. CRC Press, (2001). ISBN 978-0-8493-1041-6.
77. Lin P. "Ubiquitin–proteasome system mediates heme oxygenase-1 degradation through endoplasmic reticulum-associated degradation pathway". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* (2008). 1783 (10): 1826–1834. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.05.008. PMID 18544348.
78. Elbirt K, Bonkovsky H. "Heme Oxygenase: Recent Advances in Understanding Its Regulation and Role". *Proceedings of the Association of American Physicians*. 111 (5): 438–447, (1999). doi:10.1111/paa.1999.111.5.438.
79. medicalxpress.com/news/2018-11-enzyme-immune-cells-essential-role.html (accessed on 08.11.2019)

80. Brenner DS, Drachenberg CB, Papadimitriou JC. "Structural similarities between hematoidin crystals and asteroid bodies: evidence of lipid composition". *Exp Mol Pathol*. 2001;70: 37-42.
81. Strassmann G. "Formation of hemosiderin and hematoidin after traumatic and spontaneous cerebral hemorrhages". *Arch Pathol (Chic)*. 1949;47:205-210.
82. Tate GA, Schumacher HR, Reginato AJ, Algeo SB, Gratwick GM, Di Battista WT. "Synovial fluid crystals derived from erythrocyte degradation products". *J Rheumatol*. 1992;19:1111-1114.
83. Miller-Keane Encyclopedia and Dictionary of Medicine, Nursing, and Allied Health, Seventh Edition. S.v. "hematoidin." Retrieved November 10 2019 from <https://medical-dictionary.thefreedictionary.com/hematoidin> Bibbo M, Wilbour DC.
84. "Hemosiderin": *Definition, Staining, Function and Treatment*, *Comprehensive Cytopathology, 3rd edition, Saunders, 2008*
85. Kalakonda A, Savio J. "Physiology, Bilirubin". *NCBI Bookshelf*, (2018). PMID [29261920](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29261920/). Retrieved 2019-05-04.
86. Litwack G. "*Micronutrients (Metals and Iodine)*". *Human Biochemistry. Elsevier*. pp. 591–643, (2018). doi:[10.1016/b978-0-12-383864-3.00019-3](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-383864-3.00019-3). ISBN [978-0-12-383864-3](https://www.isbn-international.org/product/978-0-12-383864-3).
87. Goetz R. "A Study of Hemosiderosis with Aid of Electron Microscopy". *The Journal of Experimental Medicine*. 106 (2): 203–218, (1957). doi:[10.1084/jem.106.2.203](https://doi.org/10.1084/jem.106.2.203). PMC [2136742](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2136742/). PMID [13449232](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13449232/).
88. Fischbach FA, Gregory DW, Harrison PM, Hoy TG, Williams JM. "On the structure of hemosiderin and its relationship to ferritin". *Journal of Ultrastructure Research*. 37 (5): 495–503, (1971). doi:[10.1016/S0022-5320\(71\)80020-5](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(71)80020-5). PMID [5136270](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5136270/).
89. Kumar, Abbas, Aster, Vinay, Abul K., Jon C. Robbins & Cotran *Pathologic Basis of Disease, 9th Edition*. (2015). Elsevier. p. 650. ISBN [978-1-4557-2613-4](https://www.isbn-international.org/product/978-1-4557-2613-4).

90. Ritossa F. "A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila". *Experimental*. 18 (12): 571–573, (1962).
doi:[10.1007/BF02172188](https://doi.org/10.1007/BF02172188). ISSN 0014-4754.
91. Matz JM, Blake MJ, Tatelman HM, Lavoï KP, Holbrook NJ.
"Characterization and regulation of cold-induced heat shock protein expression in mouse brown adipose tissue". *The American Journal of Physiology*. 269 (1 Pt 2): R38–47, (1995).
doi:[10.1152/ajpregu.1995.269.1.R38](https://doi.org/10.1152/ajpregu.1995.269.1.R38). PMID 7631901.
92. Cao Y, Ohwatari N, Matsumoto T, Kosaka M, Ohtsuru A, Yamashita S.
"TGF-beta1 mediates 70-kDa heat shock protein induction due to ultraviolet irradiation in human skin fibroblasts". *Pflügers Archiv*. 438 (3): 239–44,
(1999). doi:[10.1007/s004240050905](https://doi.org/10.1007/s004240050905). PMID 10398851.
93. Laplante AF, Moulin V, Auger FA, Landry J, Li H, Morrow G, Tanguay RM, Germain L. "[Expression of heat shock proteins in mouse skin during wound healing](#)". *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 46 (11): 1291–301,
(1998). doi:[10.1177/002215549804601109](https://doi.org/10.1177/002215549804601109). PMID 9774628..
94. Stankov A. "Mikrogljalnata aktivacija i nejzinata primena vo odredovanjeto na vremeto na nastanuvanje na kortikalnite mozocni nagmecuvanja"(2015).
95. Hausmann R. Timing of Cortical Contusions in *Human Brain Injury Morphological Parameters for a Forensic Wound-Age Estimation*, in Tsokos editor, *Forensic pathology reviews vol.1, 2004; 53-75*.
96. Mouton, Peter R. (2002). Principles and Practices of Unbiased Stereology: An Introduction For Bioscientists. Baltimore: Johns Hopkins University Press. ISBN [0-8018-6797-5](https://doi.org/10.1007/978-0-8018-6797-5).
97. P.R. Mouton (2011). Unbiased Stereology: A Concise Guide. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD. ISBN [978-0-8018-9984-3](https://doi.org/10.1007/978-0-8018-9984-3)

98. Jensen Eva BV. (1998) Local Stereology. Advanced Series on Statistical Science & Applied Probability Vol. 5. World Scientific Publishing. [ISBN 981-02-2454-0](#)
99. Baddeley A, Vedel Jensen EB (2005), Stereology For Statisticians, Chapman & Hall/CRC. [ISBN 9781584884057](#)
100. West MJ, Slomianka L, Gundersen HJG. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the Optical Fractionator. *Anatomical Record* 231: 482–497, 1991.
101. Raekallio J. Determination of the age of wounds by histochemical and biochemical methods. *Forensic science*, 1972; vol.1 (1); p:3-16.
102. Ramos-Vara JA, Miller MA . "When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry--the red, brown, and blue technique". *Veterinary Pathology*. 51 (1): 42–87, 2014. [doi:10.1177/0300985813505879](#). [PMID 24129895](#).
103. Coons AH, Creech HJ, Jones RN: Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1941; 47: 200-202.
104. Muñoz-Sánchez J, Cháñez-Cárdenas ME . "[A review on hemeoxygenase-2: focus on cellular protection and oxygen response](#)". *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014 (1): 1–16. [doi:10.1155/2014/604981](#). [PMC 4127239](#). [PMID 25136403](#).
105. Takamiya M, Saigusa K, Kumagai R, Nakayashiki N, Yasuhiro A. Studies on mRNA expression of tissue type plasminogen activator in bruises for wound age estimation. *Int J Legal Med* 2005;119:16-21.
106. Garner WL, Rodrigues JL, Miller CG, Till GO, Rees RS, Smith DJ, Remick DG. Acute skin injury releases neutrophil haemoattractants. *Surgery* 1995;116:42-8.

107. Harris BH, Gelfand JA. The immune response to trauma. *Semin Pediatr Surg* 1995;4:77-82.
108. Kienle A, Lilge L, Vitkin A, Patterson MS, Wilson BC, Hibst R, Steiner R. Why do veins appear blue? A new look at an old question. *Appl Optics* 1996;35:1151-1160.
109. Kollias N. The physical basis of skin color and its evaluation. *Clin Dermatol* 1995;13:361-367.
110. Pimstone NR, Tenhunen R, Seitz PT, Marver HS, Schmid R. The enzymatic degradation of hemoglobin to bile pigments by macrophages. *J Exp Med* 1971;133:1264-81.
111. Olson RL, Gaylor J, Everett MA. Skin color, melanin and erythema. *Arch Dermatol* 1973;108:541-544.
112. Gemsa D, Woo CH, Fundenberg HH, Schmid R. Erythrocyte catabolism by macrophages in vitro. The effect of hydrocortisone on erythrophagocytosis and on the induction of heme oxygenase. *J Clin Invest* 1973;52:812-822.
113. Otterbein LE, Choi AMK. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279:L1029-L1037.
114. Randeberg LL, Winnem AM, Larsen ELP, Haaverstad R, Haugen OA, Svaasand LO. In vivo hyperspectral imaging of traumatic skin injuries in a porcine model. *Proc SPIE* 2007;6424:642408.
115. Trujillo O, Vanezis P, Cermignani M. Photometric assessment of skin color and lightness using a tristimulus colorimeter: reliability of inter and intra-investigator observations in healthy adult volunteers. *Forensic Sci Int* 1996;81:1-10.

116. Robinson S. The examination of the adult victim of assault. In: Mason JK, Purdue BN, editors. *The pathology of trauma*. London: Arnold; 2000. p. 144-148.
117. Randeberg LL, Winnem A, Blindheim S, Haugen OA, Svaasand LO. Optical classification of bruises. *Proc SPIE* 2004;5312:54-64.
118. Laiho K, Tenhunen R. hemoglobin-degrading enzymes in experimental subcutaneous hematomas. *Z Rechtsmed* 1984;93:193-198.
119. Hamdy MK, Deatherage FE, Shinowara G. Bruised tissue I. Biochemical changes resulting from blunt injury. *Proc R Soc Med* 1957;95:255-258.
120. Fullerton A, Fischer T, Lahti A, Wilhelm K-P, Takiwaki H, Serup J. Guidelines for measurement of skin color and erythema: a report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis. *Contact Dermatitis* 1996;35:1-10.
121. Hamdy MK, Kunkle LE, Rheins MS, Deatherage FE. Bruised tissue III: some factors affecting experimental bruises. *J Anim Sci* 1957;16:496-501.
122. Gerstein AD, Phillips TJ, Rogers GS, Gilchrest BA. Wound healing and aging. *Dermatol Clin* 1993;11:749-757.
123. Ashcroft GS, Mills SJ, Ashworth JJ. Aging and wound healing. *Biogerontology* 2002;3:337-345.
124. Stephenson T. Ageing of bruising in children. *J R Soc Med* 1997;90:312-314.
125. Nakajima T, Hayakawa M, Yajima D et al. Time-course changes in the expression of heme oxygenase-1 in human subcutaneous haemorrhage. *Forensic Science International* 2006;158:157-163.

126. Maines MD, Cohn J. Bile pigment formation by skin heme oxygenase: studies on the response of the enzyme to heme compounds and issue injury. *J Exp Med* 1977;145:1054-1059.
127. *Furie B, Furie BC (2005). "[Thrombus formation in vivo](#)". *J. Clin. Invest.* 115(12):3355-62.*
128. Cohen S, Burns RC (2002). *Pathways of the Pulp* (8th ed.). St. Louis: Mosby. p. 465.