

UNIVERSITATEA “OVIDIUS” DIN CONSTANTA
ȘCOALA DOCTORALĂ DE MEDICINĂ
DOMENIUL MEDICINĂ
ANUL UNIVERSITAR 2021/2022

TEZĂ DE DOCTORAT

**Studiul unor markeri
imunohistochimici utili în practica
medico-legală în determinarea
reacției vitale în leziuni cutanate**

Conducător de doctorat : **Prof. Univ. Dr. Mariana Aschie**

Doctorand : **Sorin Deacu**

Cuprins

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....	1
INTRODUCERE.....	1
Capitolul 1. Noțiuni de histologie	3
Capitolul 2 Plăgile în medicina legală	7
Capitolul 3 Procesul de vindecare a plăgilor cutanate	16
Capitolul 4 Reacția vitală și importanța ei în medicină legală	23
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ.....	31
Capitolul 5 Metodologie generală	32
Capitolul 6 Studiul 1 Caracteristicile lotului de studiu din punct de vedere demografic, macroscopic și histopatologic	50
Capitolul 7. Studiul 2 — Studiu imunohistochimic comparativ al VAP-1 cu P-selectina în plăgi cu timp de supraviețuire cunoscut.....	74
Capitolul 8 Studiul 3 Explorarea imunohistochimică a axei HMGB1-RAGE-TLR4-NFκB și utilitatea ei în atestarea reacției vitale în plăgi	98
Capitolul 9 Concluzii generale	143
Capitolul 10 Originalitatea și contribuțiile inovatoare ale tezei	144

Cuvinte cheie: Imunohistochimie, medicina legala, reactie vitala, VAP-1, HMGB1, RAGE, TLR4, NFκB.

INTRODUCERE

Moartea violentă (cel mai frecvent datorată acțiunii unui agent traumatic asupra organismului) face obiectul anchetelor judiciare. Ea poate surveni în urma unor accidente (rutiere, precipitare, deficiente în acordarea asistentei medicale), sinucideri sau omucideri. Primul organ care absoarbe socul agentului traumatic este pielea.

De foarte multe ori, anchetatorii sunt puși în postura de a evalua cadavre la care decesul a survenit fără martori, cu multiple leziuni, fiind necesară diferențierea între leziunile vitale și cele non-vitale și, de asemenea, determinarea cronologiei acestora.

Problematică sunt, în special, leziunile produse cu scurt timp înainte (stadiu agonic) sau la scurt timp după momentul decesului (perioada supravitală). În acest interval de timp, aspectul histologic nu este de ajutor, modificările neputând fi puse în evidență prin tehnica standard (Hematoxilina-Eozina).

Astfel, diagnosticul actual de reacție vitală, în intervalul de timp mai sus menționat, are un caracter speculativ, necesitând un “cocktail” alcătuit din numeroși markeri. Acest lucru presupune un efort însemnat financiar din partea instituțiilor medico-legale cât și timp mai mult

Dorința de a identifica un factor de încredere în aceasta zonă m-a determinat să aleg aceasta temă de studiu pentru teza de doctorat. De aceea, propun studierea unor noi markeri, markeri care si-au dovedit utilitatea si implicarea in procesele inflamatorii si al progresiei tumorale, dar al caror rol in practica medico-legal nu a fost evaluat inca sau a fost evaluat prea putin.

Acesti markeri sunt Vascular adhesion protein-1 (-1 (VAP-1), high-mobility group box 1 protein (HMGB1), receptor for advanced glycation end products (RAGE), Toll Like Receptor 4 (TLR4) si nuclear factor kappa b (NFkB). Acestia au fost determinati imunohistochimic în plăgi cutanate cu vârste diferite, cu momentul producerii cunoscut.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

A fost structurat în patru capitole care au trecut în revista principalele direcții de cercetare în domeniul medico-legal, în general, și în reacția vitală, în special.

Capitolul 1. Noțiuni de histologie

În cap. 1 s-au trecut în revistă elemente de histologie cutanată și vasculară.

Capitolul 2 Plăgile în medicina legală

În cap. 2 am abordat mecanismele de producere ale plagilor cutanate, am clasificat agenții traumatici mecanici și am discutat principalele diferențe dintre plagile produse intravital și cele produse postmortem.

Leziunile postmortem produse în mod intenționat sunt întâlnite în situația în care pentru a ascunde, spre exemplu, o crimă, cadavrul poate fi ars, prin provocarea unui incendiu sau poate fi așezat pe calea ferată pentru a simula un accident de trafic feroviar sau se poate simula o sinucidere prin spânzurarea unui cadavru, etc. Acestea sunt doar câteva exemple din împrejurările în care precizarea caracterului vital al leziunilor capătă o importanță primordială în justiție. [9]

Problematica diagnosticului diferențial al leziunilor produse ante și postmortem referindu-se cu predilecție la plăgi, presupune o colaborare interdisciplinară medic legist-anatomo patolog, în sensul în care la autopsie medicul legist trebuie să asigure recoltarea fragmentelor de organ/țesut care prezintă plaga cu toate caracteristicile ei, pe cât posibil (margini, unghiuri) și să ofere detalii anatomo-patologului cu privire la datele de anchetă.

Există modificări de acompaniament ale fiecărei leziuni produse intravital cum ar fi hemoragia-infiltratul sangvin, coagularea, inflamația și retracția țesutului. Deși acestea și-au dovedit aportul în predicția intervalului de producere a unei leziuni traumatice, retracția țesuturilor, studiată mai ales în situația plăgilor, rămâne discutabilă.

Capitolul 3 Procesul de vindecare a plăgilor cutanate

Cele mai multe informații pe care le avem despre acest fenomen se suprapun cu procesul normal de vindecare al leziunilor cutanate [10].

Procesul de vindecare este foarte complex, dinamic și implică numeroase celule, mecanisme umorale și moleculare care încep imediat după producerea leziunii [13].

Exista patru (trei sau cinci, după unii autori) faze distincte, dar care se suprapun în mare parte: hemostază, inflamație, formare de țesut nou și remodelarea acestuia [14].

Hemostaza va avea drept rezultat producerea unei structuri temporare, numită cheag sanguin. Astfel, se limitează cantitatea de sânge pierdut prin hemoragie, se previne infectarea plăgii și se formează o matrice provizorie unde vor migra toate celulele implicate în procesul de inflamație [15].

Faza inflamatorie poate fi subîmpărțită în faza timpurie, cea a răspunsului neutrofilic și târzie, în care celulele predominante sunt macrofagele [21].

Faza proliferativă este caracterizată de apariția țesutului de granulație [25]. În această etapă, fibroblastele sunt cele mai importante celule datorită capacității lor de a produce fibre de colagen, astfel înlocuindu-se matricea temporară, constituită în special din fibrină [24].

Faza de maturare este caracterizată de transformarea fibroblastelor în miofibroblaste iar cantitatea de colagen produsă va scădea gradual. Densitatea capilarelor de la nivelul plăgii scade, precum și numărul fibroblastelor rezultând o cicatrice matură relativ acelulară [35].

Capitolul 4 Reacția vitală și importanța ei în medicină legală

Reacția vitală reprezintă totalitatea modificărilor locale (țesuturi, organe) și generale (ale corpului întreg) care apar în organismul viu, ca răspuns la acțiunea unei traume (mecanice, fizice, chimice, biologice), permițând diferențierea leziunilor produse intravital de cele produse postmortem (accidental sau intenționat) [40].

Având în vedere că organismul declanșează procesul de vindecare imediat după ce o leziune a fost produsă, eforturile anatomopatologilor care lucrează în domeniul medico-legal au fost concentrate în direcția evidențierii sau absenței acestui proces de la nivelul plăgilor investigate.

Toate etapele procesului normal de vindecare au fost investigate în speranța identificării unui component care să permită diferențierea clară dintre plăgile produse antemortem de cele produse postmortem, cât și intervalul de timp scurs de la producerea leziunii până la decesul victimei. Dintre moleculele investigate amintim: peptide vasoactive și enzime [51], factori implicați în hemostază/coagulare [58, 61], molecule de adeziune [63, 65], chemokine și citokine [70, 71, 77], factori de creștere [78].

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Capitolul 5 Metodologie generală

Scopul prezentului studiu este reprezentat de identificarea expresiei unor markeri imunohistochimici în leziuni cutanate cu interes medico-legal, în vederea stabilirii vitalității acestora și relațiilor dintre expresia acestor markeri.

Pentru îndeplinirea scopului propus, am urmărit mai multe obiective, după cum urmează:

5.1.1 Obiective:

1. Stabilirea loturilor de studiu și crearea unei baze de date în care să fie cuprinse cazurile.
2. Caracterizarea lotului de studiu din punct de vedere demografic și macroscopic.
3. Evaluarea histopatologică prin colorațiile Hematoxilina-Eozina, Van Gieson Verhoeff și Perls.
4. Evaluarea expresiei VAP-1 la nivelul vaselor sanguine din vecinătatea plăgii și în fragmente de tegument control, recoltat în timpul autopsiei.
5. Evaluarea axei HMBG1-RAGE-TLR4-NF- κ B la nivelul vaselor sanguine din vecinătatea plăgii precum și în fragmente de tegument-control, recoltat în timpul autopsiei.
6. Evaluarea expresiei axei HMBG1-RAGE-TLR4-NF- κ B în keratinocitele de la nivelul plăgii precum și în fragmente de tegument-control, recoltat în timpul autopsiei.
7. Stabilirea unui scor pentru gradarea expresiei pozitive a celor cinci markeri.
8. Prelucrarea statistică a informațiilor rezultate din evaluarea expresiei imunohistochimice.
9. Elaborarea concluziilor.

Pentru acest studiu prospectiv, în lotul de studiu principal au fost incluse cazuri autopsiate în cadrul Serviciului Clinic Județean de Medicină Legală Constanța, în perioada 01.01.2018 – 31.12.2021. Din totalul de 4404 cazuri autopsiate în această perioadă, 1353 au fost decese violente, iar dintre acestea, 690 au avut în mecanismul tanatogenerator implicată cel puțin o leziune cutanată traumatică.

Din cele 690 de cazuri, 117 au fost selectate. De la fiecare caz a fost recoltat unul până la 4 fragmente cutanate recoltate din plăgi precum și un fragment control din inciziile

efectuate în cursul autopsiei. În total, au fost recoltate 167 fragmente cutanate și 117 fragmente cutanate control. Lotul principal a fost segregat în șase loturi secundare (LS) pe baza intervalului de supraviețuire (IS).

Celor șase loturi segregate din lotul principal li s-a adăugat un lot control alcătuit din 10 fragmente cutanate recoltate de la pacienți care au fost supuși unor intervenții chirurgicale pentru excizia unor tumori cutanate. Fragmentele cutanate au provenit din tranșele de secțiune.

Toate fragmentele au fost supuse procesării histopatologice și coloratelor cu Hematoxilina-Eozina, Perls (albastru de Prusia) și Van Gieson Verhoeff.

De asemenea, s-au efectuat și următoarele colorări imunohistochimice:

Antigen	Clona	Gazda	Tip	Izotop	Companie	Concentrație
VAP-1	E-10	șoarece	monoclonal	IgG _{2a}	Santa Cruz Biotechnology	1:50-1:500
P-selectina	AK-6	șoarece	monoclonal	IgG ₁	eBioscience	1:100-1:1000
HMGB1	GT348	șoarece	monoclonal	IgG _{2a}	Invitrogen	1:100-1:1000
RAGE	A-9	șoarece	monoclonal	IgG ₁	Santa Cruz Biotechnology	1:50-1:500
TLR4	25	șoarece	monoclonal	IgG ₁	Santa Cruz Biotechnology	1:50-1:500
NF-κB	F-6	șoarece	monoclonal	IgG ₁	Santa Cruz BioT.	1:50-1:500

Cuantificarea markerilor s-a realizat în zonele de interes, vasele din buza plagilor, din aria de hemoragie și periferia leziunilor (pentru toți markerii) respective în epiteliul din buza plagii și din vecinătatea ei pentru HMGB1, RAGE, TLR4 și NFκB. S-au stabilit scoruri pentru a grada expresia markerilor cuprinse între 0 și 3 sau 0 și 4 (cuantificarea în epiteliu).

Preparatele astfel obținute au fost examinate la microscopul optic Accuscope EXC-500 și au fost achiziționate pe calculator cu ajutorul unei videocamere Excelis HD.

Analiza statistică a datelor a fost efectuată în programul R, versiunea 3.1, R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. R utilizează o serie de mărimi medii (media, mediana și modulul) precum și indicatori ai dispersiei (deviația standard și varianța). Caracterul gaussian al variabilelor a fost evaluat cu ajutorul testului Shapiro-Wilk.

Capitolul 6 Studiul 1 Caracteristicile lotului de studiu din punct de vedere demografic, macroscopic și histopatologic

Scopul studiului.

Scopul prezentului studiu este de a analiza lotul descris în capitolul 5 din punct de vedere demografic, macroscopic și histopatologic.

Rezultate:

Vârsta medie a pacienților incluși în studiu a fost de 49,57 ani $\pm$ 9,9, cu o vârstă minimă de 1 an și o maximă de 88 de ani. Șapte pacienți au fost minori, iar 12 au fost vârstnici de peste 75 de ani.

Fiecare plagă în parte a fost caracterizată în ceea ce privește modul în care a fost produsă, mecanismul de producere și regiunile implicate. Astfel, se observă că cele mai multe plăgi sunt contuze, urmate de cele delabrante și tăiate. O altă categorie importantă a fost reprezentată de plăgile înțepat-tăiate (aproximativ 12%). La polul opus, plăgile împușcate și mușcate, au constituit grupele cel mai slab reprezentate, atingând un procent de 4-5%.

În privința modului în care au fost produse, se poate constata că 59 dintre acestea provin din accidente rutiere. Dintre modalitățile de producere, acestea au cea mai mare proporție deoarece accidentele rutiere sunt foarte frecvente și prezintă un risc ridicat de fatalitate.

Evaluând regiunile din care au provenit plăgile, constatăm că peste 33% dintre acestea (56) sunt reprezentate de scalp, urmate de torace (27) și abdomen (17). Astfel, faptul că plăgile din aceste zone predomină, nu este întâmplător, ele fiind sediul organelor vitale.

Aspecte macroscopice ale leziunilor traumatiche (plăgi) incluse în studiu :

Din punct de vedere macroscopic, la nivelulul tuturor leziunilor traumatiche analizate, s-au constatat infiltrate sanguine de dimensiuni și profunzime variabile, în special la nivelul buzelor plăgilor. Chiar și în plăgile postmortem (în special la cele produse în prima jumătate de oră după decesul persoanei) s-a observat infiltrat hematic, deși de intensitate mai scăzută.

Un alt parametru macroscopic evaluat a fost retractoria țesuturilor. Mult timp a fost considerat un element specific plăgilor produse intravital. Însă, în cadrul cercetării noastre, am constatat că în LS1, aproximativ 11% dintre plăgi (8 plăgi), deși erau produse cu

certitudine în timpul vieții, nu prezentau retracție tisulară. Acest fapt poate preta la confuzie cu plăgile post mortem, care prezintă retracție redusă a marginilor.

Caracterizarea microscopică a loturilor de studiu:

În toate loturile colorațiile de rutină efectuate din bateria de teste standard nu au adus foarte multe informații utile. Colorația Hematoxilina-Eozina a pus în evidență ariile de hemoragie și infiltratul inflamator (acolo unde acesta a fost prezent). În LS1, pe 15 fragmente din LS2, 6 din LS3 și 1 din LS4 nu s-a identificat infiltrate. În LS5 HE a identificat hematii ratatinate precum și existența de țesut de granulație (la plăgile cu supraviețuire de 24-72 de ore), precum și aspect cicatriceal al dermului, la plăgile cu supraviețuire de peste 8 zile.

Colorația Perls a fost negativă în toate loturile, cu excepția LS 5 unde a pus în evidență depozite de hemosiderină pe 18 dintre cele 20 de fragmente constitutive ale lotului.

Colorația Van Gieson Verhoeff a evidențiat fibrele elastice din structura dermului, fibre care au fost inconstant modificate (fragmentate pe 4 fragmente cutanate din LS3) sau reducerea numerică moderată la nivelul buzei plăgii în LS4. În LS5 a pus în evidență scăderea densității firelor elastice până aproape de dispariție în zonele cu aspect cicatriceal.

Discuții:

Deși în majoritatea cazurilor, evaluarea macroscopică este suficientă pentru a afirma caracterul vital/non vital al unei leziuni, așa cum am văzut și în studiul de mai sus, există un mic procent în care nu există certitudine.

Scripcaru-Terbancea consideră că în practica medico-legală există un “interval de incertitudine” de aproximativ 10 min antemortem și 5 min postmortem. [85] iar Simonin îl consideră chiar de 3 ore postmortem [86]

Există studii [87-91] care demonstrează că zone hemoragice pot apărea chiar după oprirea pompei cardiace, în așa numita perioadă supravitală.

Având în vedere că observațiile macroscopice pot fi alterate în diverse situații este necesară completarea acestora cu un examen microscopic.

De departe cea mai cunoscută și mai folosită colorație din patologia generală sau medico-legală, Hematoxilina-Eozina, este foarte utilă în diferențierea leziunilor produse post-mortem de cele intravital cu o condiție: să fie prezent infiltratul inflamator pentru a putea fi obiectivat. Bineînțeles, colorația HE va evidenția foarte bine și ariile de hemoragie, însă, la fel ca și în situațiile abordate la examinarea macroscopică, acestea pot avea origine postvitală.

Infiltratul inflamator este singurul element de certitudine acceptat în afirmarea reacției vitale și un marker extrem de important în aprecierea vârstei leziunii [11].

Studiile au aratat ca un interval minim de la care incepe infiltrarea neutrofilică este de 10-30 minute și poate ajunge și la o extremă maximă de 12 ore. Cel mai frecvent, această infiltrare neutrofilică apare dupa 1-2 ore de la producerea leziunii. [11, 60, 95]

În privința colorației Perls (albastru de Prusia), utilitatea acesteia a fost destul de limitată, referindu-ne aici la lotul de plagi cu vârsta de supraviețuire de peste 24 ore.

Colorația Van Gieson Verhoeff a evaluat prezenta, în special, a fibrelor elastice. Patternul acestora de colorare nu a permis estimarea vârstei leziunii, decât într-un numar limitat de cazuri din lotul de plăgi cu vârsta de supraviețuire de peste 24 ore, unde s-a observat reducerea sau dispariția fibrelor elastice în ariile cu aspect cicatriceal [10].

În general, colorațiile de rutină sunt utile în leziunile cu o vechime de peste 1-2 ore, odată ce infiltratul inflamator este prezent la nivelul ariei hemoragice.

Concluzii:

1. Distribuția cazurilor pe anii 2018-2021 a fost afectată de suprapunerea pandemiei de SARS Cov2, cu perioada martie 2020-iulie 2020 cu foarte puține cazuri încorporate în studiu. Din punct de vedere demografic, în toate categoriile de vârstă a predominat sexul masculin cu un sex ratio de 4.31.
2. Din punctul de vedere al tipului de plagă, cele mai multe au făcut parte din categoria plăgilor contuze (45% din totalitatea leziunilor), provenite în special din accidente rutiere (35% din totalitatea modalităților de producere ale plăgilor), iar localizarea cea mai frecventă a fost la nivelul scalpului (30%).
3. Examinarea macroscopică a permis aprecierea caracterului vital-non vital al unei leziuni în aproximativ 80% dintre plăgi folosind parametrii clasici (infiltrat hemoragic, retractor marginilor plagilor, activarea coagularii, prezența inflamației).
4. Evaluarea microscopică a fost superioară celei macroscopice prin evidențierea ariilor de hemoragie și infiltratului inflamator.
5. În lotul cu interval de supraviețuire de sub 5 minute, nicio plagă nu a prezentat infiltrat inflamator făcând astfel dificil diagnosticul diferențial cu o plagă produsă postmortem.
6. Colorația Hematoxilina Eozina a fost utilă în aprecierea vitalității unei plăgi după un interval de timp de aproximativ o oră.
7. Colorația Perls a avut o utilitate redusă, ea evidențiind depozite de hemosiderină după mai mult de 24 de ore de la producerea leziunilor.
8. Colorația Van Gieson Verhoeff a avut, de asemenea, o utilitate redusă, fibrele elastice evidențiate de aceasta apărând uneori fragmentate sau reduse numeric, dar fără a putea aprecia caracterul leziunii pe baza acestora.

Capitolul 7. Studiul 2 — Studiu imunohistochimic comparativ al VAP-1 cu P-selectina în plăgi cu timp de supraviețuire cunoscut

Ipoteza de lucru și scopul studiului

Pentru acest studiu, am plecat de la premisa că rolul pe care VAP-1 îl îndeplinește în procesul de diapedeză datorită funcției de moleculă de adeziune și celei oxidative ar putea avea aplicabilitate în practica medico-legală.

Scopul studiului este reprezentat de cuantificarea expresiei acestui marker, cuantificare care a fost efectuată concomitent cu expresia P-selectinei, un marker care, deși are limitele lui, oferă, în continuare un suport important în aprecierea vitalității în plăgile produse recent.

Material și metodă

Pentru acest studiu imunohistochimic s-au utilizat markerii imunohistochimici VAP-1 și P-selectina și s-au efectuat colorațiile conform protocolului menționat în capitolul 5.

Marker	Diluție	Antigen Retrieval	Control extern
VAP-1	1:150	EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, high PH	Placentă
P-selectina	1:250	EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, high PH	Amigdală

Rezultate:

Expresia VAP-1 în plăgile produse intravitam

În aria de hemoragie, expresia VAP-1 a fost accentuată obținându-se în peste 90 % din cazuri scorurile 2 și 3 în LS1. Comparând expresia VAP-1 în aria de hemoragie cu cea din periferie, respectiv buza plăgii, constatăm diferențe semnificative statistic ($p < 0.003$ vs periferia plăgii și $p < 0.001$ vs buza plăgii). Comparând expresia VAP-1 în buza plăgii cu cea de la periferie, nu au existat diferențe statistice ($p = 0.43$). Compararea cu fragmentele control au condus la aceeași expresie semnificativ statistică, pe toate cele trei zone evaluate ($P < 0,001$).

În LS2, expresia VAP-1 în zona de hemoragie (figura 83) nu a fost diferită de cea din buza plăgii ($p = 0.24$) sau din periferie ($p = 0.5$). Compararea cu fragmentele control a fost în continuare semnificativ statistică ($P < 0.001$).

În LS3 s-a păstrat aceeași tendința ca și în LS2, fără diferențe majore în expresia imunohistochimică între cele trei zone evaluate. Diferențele constatate cu fragmentele control au fost semnificativ statistic și în acest lot.

LS4, a avut expresii asemănătoare în evaluarea imunohistochimică a VAP-1 în cele trei zone țintă și o discrepanță clară ($p < 0.001$) cu fragmentele control.

În LS5 s-a constatat reducerea expresiei VAP-1 în aria de hemoragie, dar fără diferențe statistice cu celelalte două zone (expresia din periferia plăgii $P = 0.23$ iar expresia din buza plăgii $p = 0.84$).

Expresia VAP-1 în plăgile postmortem

În plăgile post-mortem, indiferent de aria de evaluare a expresiei, scorurile 0 și 1 au fost constant întâlnite, fără o diferență semnificativ statistică ($p = 0.37$ vs periferia leziunii, respectiv 0.79 buza plăgii)

Expresia VAP-1 în fragmentele control provenite de la decedați și vii

Tendința constatăată în plăgile postmortem s-a păstrat și la nivelul fragmentelor recoltate în cursul autopsiei (figura 90) precum și în LS7 ($p = 0.43$).

Expresia P-selectinei în LS1-LS5 a fost destul de variabilă.

În LS1 a predominat scorul 1, scorurile 2 și 3 întâlnindu-se în aproximativ 40% din cazuri. De asemenea, 12 dintre cele 69 de fragmente din acest lot au avut scor 0 în aria de hemoragie. O ușoară accentuare a expresiei a fost constatată la periferia leziunii, dar fără a fi evidentă statistic ($p = 0.73$).

În LS2 s-au constatat o accentuare a expresiei în aria de hemoragie (peste 70% dintre fragmente înregistrând scoruri 2 și 3) ($p < 0.05$). În periferie, colorația vaselor a fost asemănătoare cu a celor din LS1 ($p = 0.2$).

În LS3, expresia s-a păstrat accentuată în aria de hemoragie, cu scăderea colorabilității în periferia leziunii ($P = 0.07$).

În LS4 distribuția pe cele 4 scoruri a fost aproximativ egală în aria de hemoragie, pe când în periferia leziunii a predominat scorul 1 ($p = 0.1$).

În LS5, s-au înregistrat scoruri reduse atât în aria de hemoragie cât și în periferia leziunii, fără diferențe statistice semnificative ($p = 0.37$).

LS6 și LS7 au avut caracteristici similare, precum și cu fragmentele control recoltate în cursul autopsiei ($p < 0.05$).

Comparația VAP 1 cu P-selectina

Expresia în aria de hemoragie în LS1 pune în evidență superioritatea VAP-1, aceasta obținând mult mai multe scoruri 2 și 3 în primele cinci minute de la producerea leziunii ($P < 0.001$).

Expresia la periferia leziunii a fost, de asemenea, mai accentuată în cazul marker-ului VAP-1 ($P < 0.001$)

În aria de hemoragie din LS2, expresiile celor doi markeri sunt asemănătoare, cu un mic plus pentru P-selectina, dar fara semnificație statistica ($p=0.43$)

În LS3 pana la LS5, atât în aria de hemoragie, cat și în periferia plăgilor (fig. 118), nu s-au evidentiat diferențe notabile între cei doi markeri. ($p=0.38$)

În LS6 si in loturile cu fragmente control, expresia este asemănătoare, cu majoritatea fragmentelor avand scorurile de 0 și 1, expresie considerată bazală.

Discutii:

În condiții normale, VAP-1 este exprimat în trei tipuri celulare: celule endoteliale, celule musculare netede (inclusiv pericite [106]) și adipocite [107]. La nivelul vaselor, VAP-1 se găsește în forma inactivă, în vezicule citoplasmatiche diferite de corpusculii Weidel-Palade ai celulelor endoteliale [102].

Într-un studiu efectuat de un grup de cercetători finlandezi s-a constatat că în fragmentele de piele prelevate de la indivizi fără boli cutanate sunt prezente rare vase sanguine cu expresie scăzuta sau moderată a VAP-1. [110]. Am notat aceasta expresie scăzută sau moderată cu scorurile 0 respectiv 1.

În timpul inflamației, se induce expresia VAP-1 în celulele endoteliale și proteina este translocată din veziculele citoplasmatiche pe membrana plasmatică, printr-un proces asemănător cu cel al P-selectinei [110]. Această moleculă mediază pasul diapedezei și de asemenea intervine în momentul rostogolirii și al adeziunii ferme [112].

Activitatea enzimatică a VAP-1 declanșează sinteza și expresia moleculelor endoteliale de adeziune ICAM-1, MadCAM-1, E-selectina și P-selectina, induc secreția chemokinei CXCL8 și activează factori de transcripție precum NF-kB [115, 116]. Așa cum am observat și în studiul nostru, în primele minute după producerea unei leziuni se constată o supraexprimare a VAP-1, urmată de creșterea numărului de vase pozitive la P-selectina în loturile de studiu 2 și 3.

În procesul de inflamație cutanată indusă chimic și prin administrare intravenoasă de anticorp antiVAP-1 s-a constatat legarea acestui anticorp de celulele endoteliale în care expresia VAP-1 a fost consecutiva exprimării crescute a acestuia. În celulele endoteliale din vasele cutanate neexpuse stimulării chimice nu s-a constatat legarea anticorpului [110]. Acest fapt a fost evident în studiul meu în cazul fragmentelor control, atât cele recoltate în timpul autopsiei cat și în LS7.

În același studiu s-a demonstrat că translocarea VAP-1 din citoplasmă la nivelul membranei celulare se produce la aproximativ 60 minute după aplicarea soluției chimice cu

un maximum atins la 8 ore. Apoi s-a constatat o descreștere a intensității imunoreacției în 24-48 ore post inducerea stimulului inflamator [110].

În studiul meu am constatat descreșterea intensității imunoreacției în plăgile cu IS de peste 24 ore (LS5). Însă, comparand expresia imunohistochimică din LS1 (plăgi cu IS de sub 5 minute) cu expresia fragmentelor control, am putut pune în evidență o supraexprimare în primele, cu semnificație statistic ($p < 0.001$), ceea ce vine să contrazică rezultatele studiului citat mai sus.

P-selectina a fost un marker foarte promițător în atestarea reacției vitale și a tanatocronologiei leziunilor.

Însă, pe măsură ce a fost studiată mai intens, s-a constatat că expresia acesteia nu este caracteristică plăgilor intravital ci se poate pozitiva și în leziunile postmortem.

Nu a fost cazul în studiul nostru, expresia P-selectinei în acestea fiind redusă, cu rare scoruri 2 întâlnite în aria de hemoragie.

În studiul lui Ortiz-Rey et al. s-a demonstrat, folosind fragmente cutanate din plăgi intravital și fragmente postmortem, că P-selectina nu a permis diferențierea acestora [64]

Concluzii:

1. Deși cei doi markeri prezintă modalitate de pozitivare asemănătoare în vase, expresia VAP-1 este superioară în LS1 (cu IS de sub 5 minute) ($P < 0,05$)
2. Examinarea în vasele aflate în aria de hemoragie conferă acuratețe mai bună decât examinarea în buza plăgii sau la periferia acesteia.
3. Expresia VAP-1 din toate loturile continând plăgi produse intravital a permis diferențierea acestora de plăgile postmortem
4. Nu s-au constatat diferențe semnificativ statistic între expresiile VAP-1 și P-selectină pe loturile LS2-LS5.
5. Un mic procent dintre fragmentele control (10%) au obținut scoruri 2 și 3 subliniind existența unei variabilități interindividuale și, prin urmare, se impune păstrarea în protocolul de recoltare a acestor fragmente, de preferință din regiunea controlaterală leziunii.

Capitolul 8 Studiul 3 Explorarea imunohistochimică a axei HMGB1-RAGE-TLR4-NFkB și utilitatea ei în atestarea reacției vitale în plăgi

8.1 Introducere

Modalitatea de adaptare la mediul extern are la bază un proces vechi de când lumea, dar, în continuare, extrem de eficient. Inflamația.

S-au scris multe articole și cărți despre bazele fiziopatologice ale inflamației, despre mecanismele care declanșează și întrețin acest proces.

Printre nenumăratele molecule eliberate în cursul acestui proces, există una neschimbată încă de la apariția vieții, HMGB1. În momentul în care această moleculă este eliberată din nucleu, celulele din zonă știu că există un pericol și vor începe să secrete diferite componente necesare declanșării procesului de inflamație.

RAGE și TLR4 sunt receptorii prin care celulele sunt avertizate de schimbarea homeostaziei locale, iar NFkB este cel care va asigura *traducerea* acestor semnale și va obliga practic celulele să susțină efortul inflamator.

8.2 Ipoteza de lucru/obiective

Având în vedere datele din literatura care indică HMGB1 drept un pivot în procesul de inflamație, am decis să testăm expresia acestuia, precum și a doi dintre receptorii acestuia, împreună cu *ținta finală* a acestei activări, NFkB, în plăgi de vârste diferite.

Obiectivul principal este evaluarea acestor expresii și potențiala ei aplicabilitate în practica medico-legală.

8.3. Material și metodă

Markerii utilizați au fost HMGB1, RAGE, TLR4 și NFkB și s-au efectuat colorațiile conform protocolului descris în Capitolul 5 și tabelului XIX. S-au folosit controale externe pozitive (fragmente de placentă).

Marker	Diluție	Antigen Retrieval	Control extern
HMGB1	1:200	EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, high PH	Placentă
RAGE	1:100	EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, high PH	Placentă
TLR4	1:50	EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, high PH	Placentă
NFkB	1:50	EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, high PH	Placentă

Tabel XIX: Diluția, soluția de recuperare epitopi și controlul extern folosite pentru cei patru markeri din acest studiu

Scorul utilizat în evaluarea expresiei markerilor în epiteliul de suprafață și în vasele de sange a fost detaliat în cap 5.

8.4. Rezultate

8.4.1. Expresia HMGB1: aspecte microscopice imunohistochimice

În cazul HMGB1, se poate observa, în toate fragmentele reprezentând controlul extern și pe fragmentele cutanate control din lotul 7, o expresie accentuată în peste 90% dintre nuclei, cu o expresie moderată/ slabă citoplasmatică

Când am evaluat epiteliul din buza plăgii, am observat un aspect foarte interesant și anume că expresia marker-ului este foarte redusă, chiar absentă în epiteliul din buza plăgii în cazul plăgilor realizate înaintea decesului (scor 4). Acest aspect a fost întâlnit în majoritatea plăgilor aparținând grupurilor LS1-LS5. Celelalte fragmente au obținut majoritar un scor 2 sau 3. De remarcat că niciun fragment nu a avut scor 0.

Se observă o diferență semnificativă cu plăgile realizate post-mortem ($P < 0.05$) (LS6). În acest grup, scorurile care au predominat au fost 2 (9 fragmente) și 1 (3 fragmente). De menționat că au existat două fragmente care au obținut scorul 4, chiar și în acest subgrup.

Fragmentele control recoltate în cursul autopsiei au fost apreciate cu scorurile 0 și 1 în peste 99% din cazuri. Aceeași tendință a fost constatată și la fragmentele cutanate din LS7.

La evaluarea expresiei epiteliului din adiacența buzei plăgii sau la distanță de plagă, am observat în 45 de cazuri o expresie accentuată citoplasmatică sau pozitivare extracelulară a HMGB1 în LS1. Această expresie a fost notată cu scorul 3. De asemenea, nu s-a obținut niciun scor 0 la nivelul acestui epiteliu în niciuna dintre cele cinci loturi care includ plăgi produse intravital ($p < 0,001$). Niciun scor 4 nu a fost înregistrat pe niciunul dintre cele 155 de plăgi produse antemortem ($p < 0,001$).

La examinarea vaselor s-a constatat că expresia nucleară tinde să fie pierdută în loturile conținând plăgi produse în timpul vieții ($p = 0,061$). Cel mai evident, acest aspect devine în LS1 ($p < 0,05$)

Expresia citoplasmatică în vase scade cu cât timpul între realizarea plăgii și apariția decesului este mai lung, dar fără o diferență statistic semnificativă între perioadele intravital ($p = 0,079$).

8.4.3 Expresia RAGE: aspecte microscopice imunohistochimice

La fel ca și în cazul HMGB1, și în cazul markerului RAGE, s-a observat o exprimare redusă până la dispariție în buza plăgii în primele 5 minute, care poate să persiste până la 24 de ore, ea fiind absentă în plăgile post mortem ($p < 0,05$). Se observă, de altfel o colorație care scade în intensitate pe măsură ce intervalul între producerea plăgii și momentul decesului se

mărește în straturile spinos și granular, fără o diferență statistic semnificativă între diversele intervale studiate ($p=0,84$)

Ceea ce este de menționat este faptul că în cazul plăgilor realizate post mortem, expresia RAGE este limitată la stratul bazal și în foarte rare cazuri se observă o colorație slabă a straturilor spinos și granular, aceste modificări fiind întâlnite și la fragmentele cutanate recoltate în timpul autopsiei ($p<0,05$).

La distanță de plagă tendința este similară, cu expresia accentuată la nivel membranar sau citoplasmatică, în straturile spinos și granular în primele 5 minute.

În cazul RAGE, expresia citoplasmatică în vase se păstrează relativ constantă, fără o diferență statistic semnificativă între diferitele perioade intravital ($p=0,91$).

8.4.5. Expresia TLR4: aspecte microscopice imunohistochimice

Pentru markerul TLR4 se observă o exprimare redusă, chiar absentă în buza plăgii în primele 5 minute, care poate să persiste până la 24 de ore, ea fiind absentă în plăgile post mortem ($p<0,05$).

Ceea ce este de menționat este faptul că în cazul fragmentelor cutanate recoltate în cursul autopsiei, expresia TLR 4 este limitată la stratul bazal și în foarte rare cazuri se observă o colorație slabă a straturilor spinos și granular ($p<0,05$). Această observație a fost făcută și în cazul fragmentelor control.

În epiteliul situat la distanță de plagă, se observă scoruri 2 și 3 în majoritatea cazurilor (60%) . Tot în epiteliul situat la distanță de plagă s-a observat un aspect foarte interesant al pozitivării nucleare. Am notat cu 0 fragmentele care au avut sub 10% nuclei pozitivi și cu 1 fragmentele care au avut peste 10% nuclei pozitivi. În aproximativ 50% dintre fragmentele din LS1 s-a întâlnit această pozitivare, proporția crescând pentru următoarele două categorii, LS2 și LS3. Expresia cea mai redusă a fost întâlnită în LS6 și în fragmentele recoltate în cursul autopsiei.

Expresia TLR4 în vase pentru fragmentele recoltate intravital, nu s-au constatat diferențe semnificative ($p=0,43$) În cadrul plăgilor control, diferența este statistic semnificativă, celulele endoteliale fiind slab pozitive sau absente ($p<0,05$).

8.4.7 Expresia NFkB: aspecte microscopice imunohistochimice

În cazul markerului NFkB se observă o exprimare redusă sau absentă în buza plăgii în plăgile produse intravital (p<0,05) Expimarea nucleară (echivalentul scorului 3) este relativ puțin întâlnită în epiteliul din buza plăgii

În epiteliul situat la distanță de plagă se observă pozitivarea nucleară (Scor 3) în proporție de aprox 25% in LS1. Pe fragmentele din celelalte loturi se păstrează o proporție asemănătoare (p=0,33), cu excepția fragmentelor control și a celor din LS6.

8.4.8 Analiza combinată a markerilor

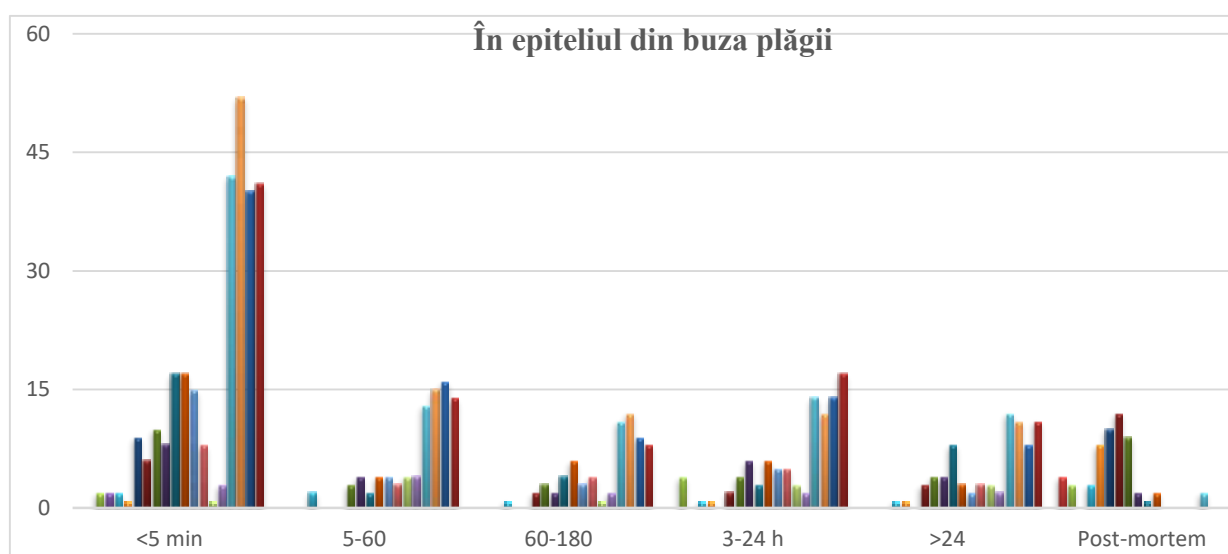


Figura 1: Scorurile obținute de cei 4 markeri în buza plăgii

Se observă cu ușurință predominanța scorurilor 4 în epiteliul de la nivelul buzei plăgii în toate loturile conținând plăgi vitale (fig. 1). În LS1, frecvența scorului 4 este mult mai des întâlnită, cu HMGB1 și RAGE având expresia cea mai accentuată.

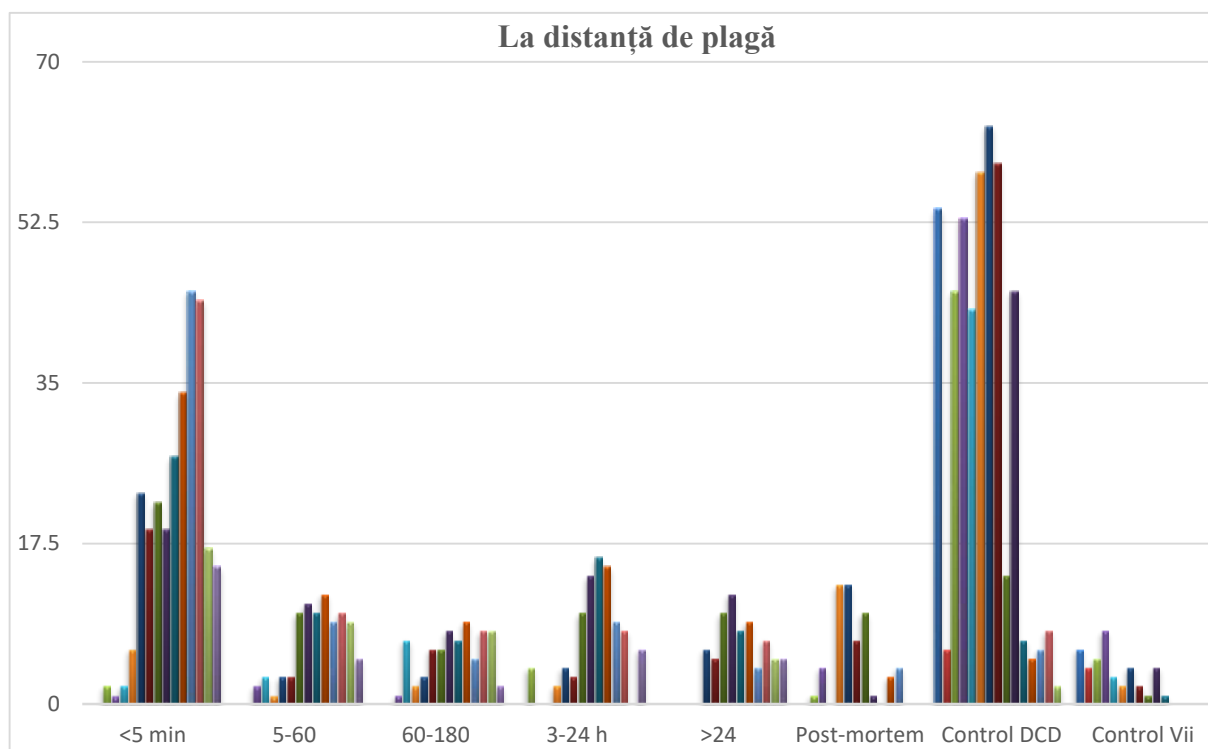


Figura 2: Scorurile obținute de cei 4 markeri în epiteliul adiacent buza plăgii

În epiteliul la distanță de plagă se observă în LS1 un scor maxim 3 pentru majoritatea fragmentelor colorate cu HMGB1 și RAGE (fig. 2). De asemenea, se observă, în fragmentele control precum și în cele postmortem predominanța scorurilor 0 și 1.

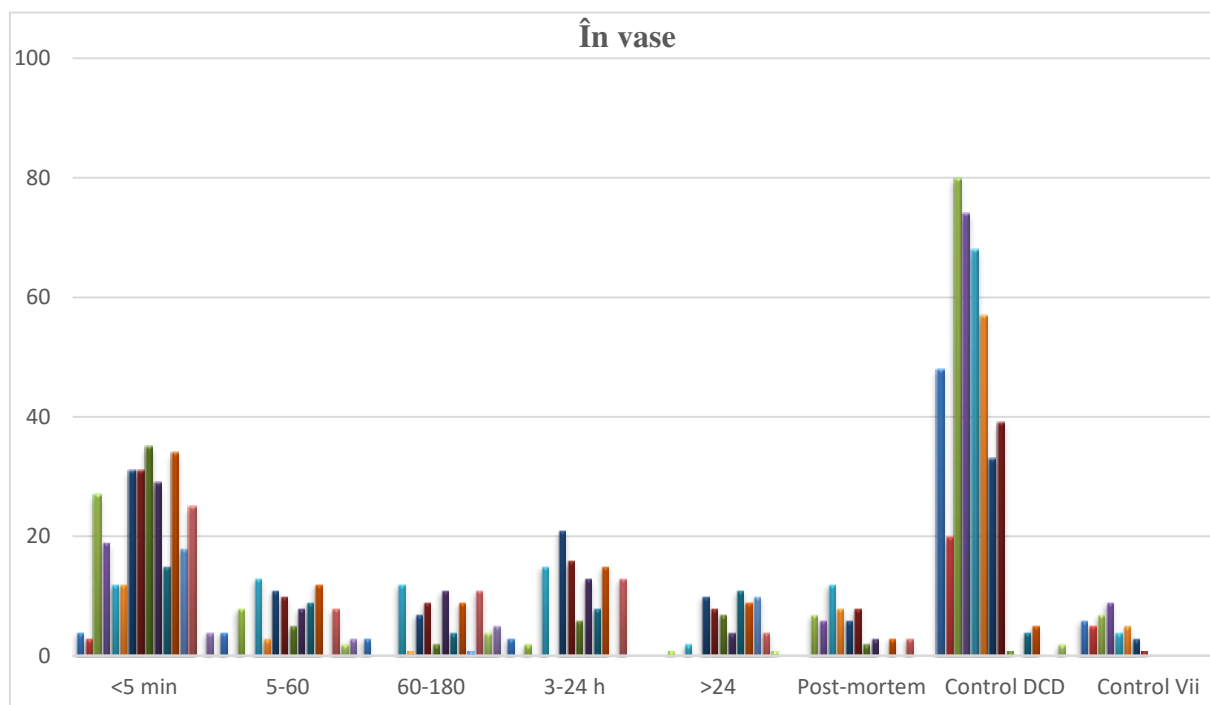


Figura 3: Scorurile obținute de cei 4 markeri în vase.

În vase, expresia celor 4 markeri este distribuită aproximativ uniform între categoriile de scor, indiferent de categoria din care fragmentele fac parte (fig. 3).

S-a creat un tablou comparativ al celor patru markeri în diferitele zone de prelevare. În funcție de timpul scurs între apariția plăgii și deces și, folosind statistica bayesiană, s-au calculat probabilitățile ca o leziune să facă parte dintr-o anumită categorie în funcție de scorul obținut:

a) În epiteliul din buza plăgii: în primele cinci minute toți cei patru markeri sunt semnificativi. Dintre aceștia, HMGB1 și RAGE, au fost cel mai frecvent cotați cu scorul 4, iar o combinație a acestor doi markeri ar avea probabilitatea de a încadra o plagă în LS1 de peste 70%. Pe de altă parte, un scor 0 al acestor markeri are o probabilitate de peste 90% în a încadra leziunea în grupul fragmentelor control sau postmortem.

b) La distanța de plagă: toți cei patru markeri sunt semnificativi, cu un plus evident pentru HMGB1 și RAGE. În ceea ce privește scorul acordat, se poate constata că dacă scorul este 2 sau 3 în privința markerilor HMGB1 și RAGE, atunci probabilitatea ca leziunea să fie produsă cu mai puțin de 5 min înaintea decesului este de 70-80% față de celelalte perioade.

c) În vase: nu s-a constatat o distribuție pe vreunul dintre markeri care să depășească mai mult de 30%.

8.5. Discuții

Într-un review foarte amplu al studiilor privind reacția vitală, Casse et al subliniază rolul foarte important al imunohistochimiei în cercetarea în medicina legală, deși sunt plauzibile și alte soluții de cercetare precum RT-PCR, hibridizarea in situ, tehnici Elisa sau Western Blot [57].

Autorii susțin că imunohistochimia rămâne metoda preferată în medicina legală pentru că este ușor de implementat pe țesuturi fixate și înglobate în blocuri de parafină, are un cost relativ scăzut (comparativ cu celelalte tehnici) și permite localizarea componentei cercetate la nivelul țesutului sau celulei [57].

Deși element de certitudine în atestarea reacției vitale, infiltratul inflamator nu a fost un element definitoriu pentru studiu, având în vedere că ne-am concentrat pe plăgi unde acesta nu a fost prezent (LS1, parțial, LS2 și LS3, LS6, precum și fragmente control).

8.5.1. Discuții privind expresia HMGB1

HMGB1 este o proteină non-histonice, asociată cromatinei nucleare, este exprimată în toate celulele eucariote, și, într-un procent de 99%, are aceeași structură la toate mamiferele [121].

HMGB1 crește afinitatea factorilor de transcriere precum p53, p73, factorul nuclear- κ B (NF- κ B) și receptorul pentru estrogen. [123]

În mod normal, în celulele în repaus fiziologic, HMGB1 este localizat în nucleu și mai puțin în citoplasmă (raportul dintre HMGB1 nuclear și HMGB1 citoplasmatic este de 30:1) [124]. În studiul nostru, am demonstrat că atât în LS6 cât și LS7 în peste 90% dintre celule s-a păstrat exprimarea nucleară evidentă, ceea ce a corespuns în majoritatea cazurilor scorului 0 și într-o, foarte mică proporție, scorului 1. Acest fapt s-a aplicat pe întreaga grosime a epiteliului precum și la nivelul vaselor.

În privința fragmentelor recoltate în cursul autopsiei, cele mai multe dintre acestea s-au încadrat în scorurile 0 și 1, cu o mică parte dintre acestea fiind scorificate cu scorurile 2 și 3.

Pentru că acestea păreau a fi în discordanță cu pattern-ul general de colorare, am decis să investigăm posibila cauză.

Am consultat articolul elaborat de El Din et al și am descoperit un aspect foarte interesant. Autorii, în urma evaluării unor loturi de animale de laborator și de fragmente cutanate recoltate în cursul autopsiei, au ajuns la concluzia că se produce o exprimare citoplasmatică la fragmentele cu un interval de aproximativ 24 de ore scurs de la momentul decesului [125].

Urmând aceeași traiectorie, am reevaluat și noi cazurile care aveau scor 2 sau 3, iar 18 din cele 20 de cazuri aveau momentul autopsiei la 48 de ore după momentul decesului.

Această descoperire vine să tragă un semnal de alarmă în privința expresiei HMGB1 în tegumentul persoanelor decedate.

În momentul în care este expusă extracelular, HMGB1 devine un DAMP, și nu oricum, ci cel mai cunoscut dintre aceștia [126].

HMGB1 este legată nu foarte strâns de cromatina celulelor și ajunge rapid extracelular dacă integritatea membranelor s-a pierdut [127]

Este cea mai mobilă proteină nucleară, ajungând în citoplasmă în 1-2 secunde [128]. Acest fapt vine în sprijinul constatarilor noastre și anume că în LS1 (adică în primele minute de la producerea traumatismului) în buza plăgii și în epiteliul de la periferia leziunii se produc schimbări de dinamică a HMGB1 cu translocarea acestuia din nucleu (pe când expresia citoplasmatică tinde să devină accentuată).

De asemenea, în același lot LS1 s-a constatat, deși nu cu aceeași intensitate ca în cazul epiteliului de acoperire, translocarea HMGB1 din nucleu în citoplasmă la nivelul celulelor endoteliale care tapetează vasele din aria de hemoragie.

HMGB1 ajunge în mediul extracelular fie pasiv, din celulele necrozate sau distruse, sau prin mecanisme active (secretat de celulele sistemului imun, monocite, macrofage și celule dendritice (fig.213) [128]. Odată eliberat în spațiul extracelular, HMGB1 promovează inflamația, proliferarea, migrarea și diferențierea celulară [129].

Un aspect foarte interesant a fost reprezentat de pattern-ul de colorare de la nivelul epitelului din buza plăgii. Într-o proporție foarte mare de cazuri, expresia HMGB1 a fost atenuată sau dispărută de la acest nivel. În literatura de specialitate nu am găsit un studiu care să abordeze acest aspect în tegument. Însă, avansăm ipoteza că în buza plăgii necroza keratinocitelor se produce la foarte scurt timp după realizarea leziunii și printr-un mecanism de secreție pasivă, întâlnit în necroza celulară, HMGB1 ajunge rapid în mediul extracelular.

Un alt articol publicat de Gao et al a evaluat expresia HMGB1 și RAGE în leziunile traumatiche cerebrale, iar autorii au ajuns la concluzii care concordă oarecum cu ceea ce am găsit noi în studiul nostru. Acest studiu a fost executat pe fragmente cerebrale provenind de la animale de laborator și oameni și a relevat faptul că expresia HMGB1 a dispărut din neuronii din aria contuzată în aproximativ 30 de minute după producerea traumatismului. Mai mult decât atât, neuronii care au înconjurat aria de contuzie, au prezentat translocare citoplasmatică a HMGB1 la aproximativ două ore după producerea leziunii. [130]

Alt studiu condus de Qingjie et al a evidențiat pe un lot de animale de laborator care au suferit traumatisme prin strivire la nivelul ficatului că expresia citoplasmatică HMGB1 devine accentuată după aproximativ 6 ore de la producerea leziunii. [131]

Aceste date trebuie interpretate cu precauție. În ambele studii s-au examinat organe cu structura total diferită față de a pielii, creier, respectiv, ficat.

De asemenea, agentul traumatic nu a acționat direct asupra celor două organe menționate, acestea fiind bine protejate în cutia craniană și cea abdominală. În schimb, toate leziunile examinate în loturile noastre de studiu au fost produse prin acțiunea directă, nemijlocită, a agentului traumatic asupra pielii. De aceea, e posibil ca valorile noastre înregistrate (dispariția expresiei HMGB1 în epitelul din buza plăgii sau supraexpresia citoplasmatică a HMGB1 în epitelul din vecinătatea plăgii în primele minute după producerea leziunii) să fie direct proporționale cu forța acestui agent agresor.

8.5.2. Discuții despre expresia RAGE

RAGE face parte dintr-o superfamilie de immunoglobuline, asemănătoare ca funcție cu familia Toll-like receptorilor (TLR) [139].

Pentru că are o paletă largă de liganzi (exogeni și endogeni) RAGE este considerat un receptor care recunoaște pattern-uri (PRR) [142].

Într-un studiu din 2005, Cheng et al, au demonstrat că există mai multe pattern-uri de colorare (patru) a țesuturilor normale cu RAGE [152]. Pielii i-au atribuit pattern-ul B, cu mici granule supranucleare, limitate la stratul bazal. În același studiu, celulele endoteliale au avut pattern de colorare A, cu expresie difuză citoplasmatică [152].

În 2015, Iwamura et al, au demonstrat imunohistochimic, că RAGE colorează celulele stratului bazal și rare celule din stratul spinos. De asemenea, nu au găsit o legătură între expresia RAGE în tegumentul normal și regiunea din care provenea aceasta (tegument expus sau nu la soare) sau vârsta persoanei de la care a fost recoltată. [153] . în studiul nostru am atribuit aceasta expresie scorului 0.

În studiul lui Gao et al, pe langa expresia HMGB1 s-a determinat și expresia RAGE în leziuni cerebrale la animale și la oameni. Acestia au observat că expresia RAGE este accentuată începând cu șase ore în aria din jurul zonei contuze [130].

În studiul nostru am identificat, la nivelul epitelului din buza plăgii, un pattern de colorare care nu a mai fost raportat, și anume dispariția expresiei bazale a RAGE. Aceasta expresie a fost notată, exact că și în cazul HMGB1, cu scorul 4. în epitelul din adiacența plăgii, s-a evidențiat o supraexprimare a RAGE, în special membranar, începând cu LS1 și până la LS5. Această supraexprimare s-a suprapus în cazurile în care s-a înregistrat scor 3 pentru expresia HMGB1.

Ipoteza noastră e că după eliberarea HMGB1, acesta se leagă de RAGE, aceasta interacțiune facilitând expresia unor molecule de adeziune, citokine proinflamatorii, dar, așa cum am menționat mai sus, și supraexpresia RAGE.

Expresia RAGE în vase a fost constantă indiferent de grupul din care fragmentele au făcut parte.

Deși studiile care să ateste expresia RAGE în reacția vitală în plăgi cutanate lipsesc cu desăvârșire, în domeniul medico-legal acesta a fost testat în cazurile de înec și expresia acestuia în pneumocite a permis diferențierea între decesele provocate prin submersie și submersia postmortem sau fragmentele control [154].

8.5.3 Discuții privind expresia TLR4

În 1996, s-a descoperit la musculița de oțet (*Drosophila Melanogaster*) o proteină transmembranară care media răspunsul acesteia antifungic și dezvoltarea embrionară care era expresia unei gene numită Toll. [158]

Tocmai pentru această asemănare s-a optat pentru denumirea de Toll-like Receptors (TLR) și au fost identificați 10 asemenea receptori la oameni. [160]

Ei sunt considerați a face parte din PRR, un grup foarte divers de molecule, cu rol de interceptare a patogenilor (PAMPS) sau a moleculelor endogene eliberate de celulele aflate în suferință (DAMPS). [161]

Kawai et al au evidențiat că expresia TLR este redusă în culturile keratinocitare, chiar și după stimularea cu LPS. Totuși, o expresie moderată este prezentă în pielea normală, la nivelul stratului bazal. [178, 180]. Aceasta expresie a corespuns în studiul nostru scorului 0.

Date in vivo și in vitro sugerează că TLR4 devine upregulat în primele 24h după producerea leziunii, scade la nivel bazal în ziua 10 și este cantonat preponderent la nivelul keratinocitelor. [182]

Vindecarea cutanată este afectată la șoarecii de laborator cărora le lipsește TLR4, cu reducerea infiltrării neutrofilice sau macrofagice, iar TLR4 este exprimat în buzele plăgii între 6h până la 3 zile de la producerea plăgii. Expresia a fost mult mai accentuată în epidermul situat la distanță de marginile plăgii. [182]. Acest fapt vine să confirme ceea ce am constatat noi în loturile studiate, cu accentuarea expresiei TLR4 în primele 3 ore în epidermul din proximitatea plăgii. De asemenea, în buza plăgii, frecvent s-a întâlnit pattern-ul de colorare 4, cu absența exprimării bazale a TLR.

Un aspect deosebit de interesant a fost constatat, în studiul nostru, în privința expresiei nucleare a TLR4.

Deși receptorii TLR sunt receptori cu exprimare membranară (așa cum este și cazul TLR4) sau intracelulară/citoplasmatică, se pare că au fost raportate studii în care a apărut exprimarea nucleară, cele mai multe dintre acestea sunt realizate pe loturi tumorale [186], [187], [188]. Într-un studiu coordonat de Huhta et al s-a pus în evidență această pozitivare nucleară a TLR4 în epiteliul intestinal, iar Janardhan et al au demonstrat-o în pneumocite și celule bronșice stimulate cu lipopolizaharide de origine bacteriană. [189, 190]

Posibilele explicații pentru acest pattern de colorare nucleară al TLR ar putea fi următoarele: Expunerea tegumentului la soare, cu afectarea acestuia de radiațiile ultraviolete. [191]

Deși posibilă, aceasta ipoteză nu s-a confirmat în cazul studiului nostru, reevaluarea cazurilor aducând date contradictorii în privința localizării fragmentelor cutanate, fără semnificație statistică între diferitele loturi.

Putem presupune că existența unei cantități mai mari de ligand existent (în cazul nostru HMGB1) ar putea să favorizeze translocarea TLR4 din citoplasma în nucleu.

Ultima variantă, și probabil cea mai plauzibilă, este existența unei căi alternative de semnalizare intracelulară mediată de TLR4 care permite translocarea TLR4 în nucleu. Această potențială cale alternativă rămâne să fie abordată de studii ulterioare.

8.5.4. Discuții privind expresia factorul nuclear kappa B (NF-κB)

NF-κB a fost descoperit în 1986 de către Baltimore și colab. și a fost descris că fiind un factor de transcriere din nucleul celulelor limfocitare B și este prezent în citoplasma tuturor celulelor, dar sub formă inactivă. În momentul în care este translocat în nucleu, acesta devine activ. [192]

NF-κB (nuclear factor-κB) controlează expresia genelor implicate în răspunsul la stresul inflamator și oxidativ, diferențierea, proliferarea celulară, adeziunea celulară și apoptoza. [196]

Ca și răspuns la stimularea PAMP și DAMP, macrofagele se activează rapid și secretă o paletă largă de citokine și chemochine [203]

În studiul publicat de Salles et al. s-a pus în evidență pe un lot de animale de laborator activarea NFκB în focarele de fractură de la nivelul femurului în primele ore după provocarea leziunilor, cu un vârf la 6 ore [210]. În studiul nostru am observat o pozitivare nucleară (scor 3) începând cu LS1 până la LS5 în epiteliul aflat la distanță de plagă. Această pozitivare nu s-a întâlnit în niciun fragment aparținând LS6 sau 7 sau fragmentelor recoltate în cursul autopsiei.

În domeniul medicinei legale, activarea NFκB a fost studiată în traumatismele cerebrale, atât la animale de laborator cât și oameni. Nonaka et al. precum și Tao et al au pus în evidență translocarea nucleară a NFκB în aria de la periferia zonei de contuzie la aproximativ o oră de la producerea traumatismului. Vârful acestei translocări a fost la 12-24 ore. [211, 212]

Concluzii:

1. Din studiile noastre, HMGB1 poate reprezenta un marker de încredere pentru afirmarea vitalității unei plăgi când prezintă un scor 4 în epiteliul din buza plăgii, scor 3 în epiteliul din vecinătatea plăgii și scor 3 în vasele din aria de hemoragie.
2. În privința tanatocronologiei, putem afirma că HMGB1 poate fi considerat pozitiv încă din primele minute după producerea leziunii.
3. Expresia RAGE în epiderm este utilă în diferențierea plăgilor intravital de cele postmortem, fără a putea obiectiva cu precizie intervalul de timp scurs de la producerea leziunii. Acest interval poate fi apreciat (cel puțin pentru LS1) în urma analizei combinate HMGB1 +RAGE ceea ce duce la o probabilitate de succes de peste 70%

4. Expresia RAGE în vase este aproape identică în loturile conținând plăgi produse intravital și postmortem, devenind inutilă în practica medico-legală.
5. TLR 4 permite diferențierea plăgilor intravital de cele postmortem, iar expresia lui nucleară trebuie cercetată în continuare pentru că poate reprezenta un indiciu foarte important în practica medico-legală.
6. NFkB a reprezentat un element de certitudine în privința vitalității atunci când a fost gradat cu scorul 3, din păcate, aceasta expresie survenind în proporție destul de redusă, de aproximativ un sfert din totalitatea fragmentelor examinate.
7. Studii ulterioare sunt necesare pentru a evalua eficiența acestor markeri în condiții de autoliză tisulară sau în leziuni cutanate fără soluție de continuitate.

Limitele studiilor

Una dintre limitele acestui studiu a fost reprezentată de numărul redus de fragmente cutanate provenite din leziuni produse post mortem.

O altă limită o reprezintă intervalul de supraviețuire. Deși criteriile de includere au fost foarte stricte (martori, apel 112, camere de supraveghere video), întotdeauna va exista o mică întârziere între momentul producerii unui accident/unei leziuni și momentul în care acesta va fi anunțat. O variantă de depășire a acestei limite este testarea marker-ilor pe un lot de animale de laborator, în care parametrul cronologic este mult mai ușor de monitorizat.

Încă o limită identificată de noi este reprezentată de faptul că VAP-1 se pozitivează și în fibrele musculare netede. Deși intensitatea acestora este redusă, de obicei, pozitivarea aceasta poate interfera cu modalitatea de scorificare a VAP-1 în arteriole și venule. Pentru capilare, această limită este inexistentă, fibrele musculare netede nefăcând parte din structura acestora. Actual, lucrez la depășirea acestei limite prin testarea unei colorații duble prin combinarea unui marker care țintește fibrele musculare netede (α SMA- Actina mușchiului netede Alfa) cu VAP-1.

O nouă limită poate fi reprezentată de faptul că rezultatele nu au fost confirmate prin altă metodă, precum Westernblot sau RT-PCR.

O ultimă limită identificată este reprezentată de faptul că acești markeri nu au fost testați în condiții de autoliză/putrefacție a țesutului. În medicina legală, medicii trebuie să examineze frecvent cadavre un un grad mai mare sau mai mic de autoliză și atunci este imperativă testarea oricărui marker în aceste leziuni provenite de la cadavre cu timp mai mare de expunere condițiilor de mediu.

Capitolul 9 Concluzii generale

1. Evaluarea macroscopică a plagilor trebuie completată întotdeauna cu examenul microscopic, în special în leziunile care au survenit cu scurt timp înainte de deces sau la scurt timp după deces.
2. Colorația HE este varianta cea mai ieftină și aduce cele mai valoroase informații comparativ cu Perls și Van Gieson Verhoeff, dacă este prezent infiltratul inflamator.
3. Informațiile furnizate de tehnicile de colorare clasică nu sunt suficiente în a aprecia caracterul vital-non vital în plăgile în care lipsește infiltratul inflamator, de aceea, de aceea, propunerea mea pentru aceste leziuni este ca diagnosticul microscopic să se limiteze la *plăgă produsă cu puțin timp înainte de deces sau la scurt timp după deces sau cu vitalitate incertă*.
4. După evaluarea comparativă a VAP-1 și P-selectinei, putem concluziona că expresia VAP-1 în aria de hemoragie reprezintă o variantă bună pentru afirmarea vitalității în plăgi cu interval de supraviețuire de sub 24 ore.
5. Deși am căutat *The Holy Grail* al markerilor utili în reacția vitală, rămâne valabilă în continuare recomandarea de a utiliza asocierea acestor markeri. Propunerea mea, în urma finalizării acestei cercetări, este de a utiliza un marker care să investigheze expresia în vase (VAP-1) împreună cu markeri care să evalueze epiteliul (HMGB1 +RAGE).
6. Un scor combinat al markerilor menționați mai sus (Scor 3 în aria de hemoragie pentru VAP-1, Scor 4 în epiteliul din buza plăgii și 2 sau 3 în epiteliul din adiacența plăgii pentru HMGB1 și RAGE) asigură un procent de aproximativ 95% în privința încadrării leziunii în LS1 și, în peste 99% din cazuri, diferențierea cu fragmentele control sau provenind din leziuni postmortem.
7. Fragmentele control sunt indispensabile în a aprecia expresia acestor markeri, în lipsa lor gradul de încredere în rezultatele obținute fiind diminuat.

Capitolul 10 Originalitatea și contribuțiile inovatoare ale tezei

Abordarea unor noi markeri utili în reacția vitală reprezintă un plus valoros adus domeniului medico-legal. Imunohistochimia este o metodă foarte eficientă în a evidenția diferite componente tisulare sau celulare. Pe lângă faptul că este foarte eficientă, costurile acestei metode sunt destul de reduse iar modalitatea de implementare este rapidă.

Rezultatele obținute sunt originale, întrucât:

1. Consultând literatura de specialitate, am constatat că VAP-1 a fost testat pentru prima dată în patologia medico-legală la nivel național și internațional.
2. În urma acestui studiu, testarea imunohistochimică a HMGB1 a constituit o premieră în leziunile cutanate cu soluție de continuitate.
3. Evaluarea expresiei axei constituite din HMGB1, a receptorilor acestei proteine, RAGE și TLR4, precum și gradul de activare al NFκB, sunt elemente de noutate aduse în medicina legală.
4. În urma efectuării studiilor descrise în teză putem afirma că dintre markerii testați, VAP-1 și HMGB1, alături de RAGE, pot constitui repere importante în afirmarea vitalității în plăgi produse cu puțin timp înainte de deces.

Referinte:

9. Belis Vladimir, *Tratat de medicina Legală*, vol. I, Editura Medicală, 1995
10. Grellner W, Madea B. Demands on scientific studies: vitality of wounds and wound age estimation. *Forensic Sci Int*. 2007 ian 17;165(2-3):150–4.
11. Oehmichen M. Vitality and time course of wounds. *Forensic Sci Int*. 2004 sep 10;144(2-3):221–31.
13. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res*. 2012 iul 11;49(1):35–43.
14. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008 mai 15;453(7193):314–21.
15. Baum CL, Arpey CJ. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatol Surg*. 2005 iun;31(6):674–86
21. Eming SA, Krieg T, Davidson JM: Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 514–525
24. Lawrence WT. Physiology of the acute wound. *Clin Plast Surg* 1998;25:321–40
25. Singer AJ, Clark RAF. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999;341:738–46.
35. Coulombe PA. Wound epithelialization: accelerating the pace of discovery. *J Invest Dermatol* 2003;37:219–30
40. Dermengiu Dan, Curca George-Cristian, *Curs de medicina legală*, Bucuresti, 2015
51. Raekallio J and Mañinen PL. Serotonin and histamine contents as vital reactions. II. Autopsy studies. *Zacchia* 1970; 6: 403–414.
56. Cecchi R. Estimating wound age: Looking into the future. *Int J Legal Med* 2010; 124: 523–536.
57. Casse J-M, Martrille L, Vignaud J-M, Gauchotte G. Skin wounds vitality markers in forensic pathology: An updated review. *Med Sci Law*. 2016 apr;56(2):128–37.
58. Laiho K. Immunohistochemical studies on fibrin in vital and postmortem subcutaneous haemorrhages. *Ann Acad Sci Fenn* 1967; 128: 1–85.
60. Van De Goot F. The chronological dating of injury. In *Essentials of autopsy practice*. London: Springer-Verlag, 2008, pp.167–181.
61. Gauchotte G, Wissler M-P, Casse J-M, et al. FVIIIra, CD15, and tryptase performance in the diagnosis of skin stab wound vitality in forensic pathology. *Int J Legal Med* 2013; 127: 957–965.
63. Dressler J, Bachmann L, Koch R, Müller E (1999) Enhanced expression of selectins in human skin wounds. *Int J Legal Med* 112:39–44
64. Ortiz-Rey JA, Suarez-Penaranda JM, San Miguel P, et al. Immunohistochemical analysis of P-Selectin as a possible marker of vitality in human cutaneous wounds. *J Forensic Leg Med* 2008; 15: 368–372.
65. Dressler J, Bachmann L, Kasper M, Hauck JG, Müller E (1997) Time dependence of the expression of ICAM-1 (CD 54) in human skin wounds. *Int J Legal Med* 110:299–304
70. Kondo T, Ohshima T, Mori R, Guan DW, Ohshima K, Eisenmenger W. Immunohistochemical detection of chemokines in human skin wounds and its application to wound age determination. *Int J Legal Med*. 2002 apr;116(2):87–91.
71. Grellner W, Georg T, Wilske J. Quantitative analysis of proinflammatory cytokines (IL-1b, IL-6, TNF-a) in human skin wounds. *Forensic Sci Int*. 2000;113: 251e264.
77. Grellner W (2002) Time-dependent immunohistochemical detection of proinflammatory cytokines (IL-1β, IL-6, TNF-α) in human skin wounds. *Forensic Sci Int* 130:90–96
78. Grellner W, Vieler S, Madea B. Transforming growth factors (TGF-alpha and TGF-beta1) in the determination of vitality and wound age: immunohistochemical study on human skin wounds. *Forensic Sci Int*. 2005 oct 29;153(2-3):174–80.
85. Scripcaru Gh, Terbancea M. *Patologie medico-legală*, Ed. Didactica si Pedagogica, Bucuresti, 1983
86. Simonin C., *Medicine legale judiciaire*, Maloine, Paris, 1962.
87. Prinsloo I and Gordon I. Post-mortem dissection artifacts of the neck; their differentiation from antemortem bruises. *South Afr Med J Suid-Afr Tydskr Vir Geneeskde* 1951; 25: 358–361.
88. Strejc P, Pilin A, Kříř P, et al. The origin, distribution and relocability of supravital hemorrhages. *Soud Lek* 2011; 56: 18–20.
89. Pollanen MS, Perera SDC and Clutterbuck DJ. Hemorrhagic lividity of the neck: Controlled induction of postmortem hypostatic hemorrhages. *Am J Forensic Med Pathol* 2009; 30: 322–326.
90. Sigrist T, Schulz F, Koops E Confusing muscular hemorrhage in a drowned cadaver. A contribution to differentiation between vital and postmortem changes. *Arch Kriminol*. 1994 Mar-Apr;193(3-4):90-6.
91. Nikolic S, Atanasijevic T, Micic J, Djokic V, Babic D. Amount of postmortem bleeding: an experimental autopsy study. *Am J Forensic Med Pathol*. 2004 Mar;25(1):20-2.
95. Dettmeyer R. *Forensic histopathology*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2011.

96. Betz P. Vital reactions and wound healing, Elsevier, 2013
102. Salmi M, Jalkanen S. VAP-1: an adhesin and an enzyme. *Trends Immunol.* 2001;22(4).
106. Marttila-Ichihara F, Elimä K, Auvinen K, Veres TZ, Rantakari P, Weston C, Miyasaka M, Adams D, Jalkanen S, and Salmi M. Amine oxidase activity regulates the development of pulmonary fibrosis. *FASEB J* 31: 2477–2491, 2017
107. Salmi M and Jalkanen S. Cell-surface enzymes in control of leukocyte trafficking. *Nat Rev Immunol* 5: 760–771, 2005.
110. Jaakkola K, Nikula T, Holopainen R, Vähäsilta T, Matikainen MT, Laukkanen ML, Huupponen R, Halkola L, Nieminen L, Hiltunen J, Parviainen S, Clark MR, Knuuti J, Savunen T, Kaapa P, Voipio-Pulkki LM, and Jalkanen S. In vivo detection of vascular adhesion protein-1 in experimental inflammation. *Am J Pathol* 157: 463–471, 2000.
111. Springer, T. A. (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**, 301–314
112. Blixt A, Jonsson P, Braide M & Bagge U. Microscopic studies on the influence of erythrocyte concentration on the post-junctional radial distribution of leukocytes at small venular junctions. *International Journal of Microcirculation: Clinical and Experimental* 1985; 4: 141–156.
115. Jalkanen S, Karikoski M, Mercier N, Koskinen K, Henttinen T, Elimä K, Salmivirta K, and Salmi M. The oxidase activity of vascular adhesion protein-1 (VAP-1) induces endothelial E- and P-selectins and leukocyte binding. *Blood* 110: 1864–1870, 2007.
116. Lalor PF, Sun PJ, Weston CJ, Martin-Santos A, Wakelam MJ, and Adams DH. Activation of vascular adhesion protein-1 on liver endothelium results in an NF-kappaB-dependent increase in lymphocyte adhesion. *Hepatology* 45: 465–474, 2007.
121. Kang R, Chen R, Zhang Q, et al. HMGB1 in health and disease. *Mol Aspects Med.* 2014;40:1–116.
123. Kang R, Zhang Q, Zeh HJ 3rd, Lotze MT, Tang D. HMGB1 in cancer: good, bad, or both? *Clin Cancer Res.* 2013;19(15):4046–4057.
124. Kuehl L, Salmond B, Tran L. Concentrations of high-mobility-group proteins in the nucleus and cytoplasm of several rat tissues. *J Cell Biol.* 1984; 99(2):648–654. [PubMed: 6235236].
125. Ahmed Alaa El-Din E, Mohamed Ahmed S, Abdallah El Shafei D, El-Sayed Mostafa H. Implication of High-mobility group box-1 and skin post mortem changes in estimation of time passed since death: Animal and human study. *Leg Med (Tokyo).* 2021 Nov;53:101949. doi: 10.1016/j.legalmed.2021.101949. Epub 2021 Jul 27. PMID: 34333193.
126. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* (1994) 12:991–1045. doi:10.1146/annurev.iy.12.040194.005015
127. Muller, S. et al. The double life of HMGB1 chromatin protein: architectural factor and extracellular signal. *EMBO J.* 16, 4337–4340 (2001).
128. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. (2002) Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature.* 418:191–5.
129. Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 331–342.
130. Gao TL, Yuan XT, Yang D, Dai HL, Wang WJ, Peng X, Shao HJ, Jin ZF, Fu ZJ. Expression of HMGB1 and RAGE in rat and human brains after traumatic brain injury. *J Trauma Acute Care Surg.* 2012 Mar;72(3):643–9. doi: 10.1097/TA.0b013e31823c54a6. PMID: 22491548.
131. Zhang Q, Lu J, Li X, Liu Y, Liu G, Han X, Gu Z. High mobility group box 1 contributes to the endoplasmic reticulum stress of liver in rats with trauma. 2018 Apr;30(4):306–311. doi: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.04.004. PMID: 29663989.
139. Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pa YCE, Elliston K, Stern DM, Shaw A (1992) Cloning and Expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem* 267:14998–15004
142. Schmidt A, Yan S, Yan S, Stern D: The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *Journal of Clinical Investigation* 2001, 108:949–955.
152. Cheng C, Tsuneyama K, Kominami R, Shinohara H, Sakurai S, Yonekura H, Watanabe T, Takano Y, Yamamoto H, Yamamoto Y. Expression profiling of endogenous secretory receptor for advanced glycation end products in human organs. *Mod Pathol.* 2005 Oct;18(10):1385–96. doi: 10.1038/modpathol.3800450.
154. Lee SY, Ha EJ, Cho HW, Kim HR, Lee D, Eom YB. Potential forensic application of receptor for advanced glycation end products (RAGE) and aquaporin 5 (AQP5) as novel biomarkers for diagnosis of drowning. *J Forensic Leg Med.* 2019 Feb;62:56–62. doi: 10.1016/j.jflm.2019.01.007. Epub 2019 Jan 17. PMID: 30677703

158. Bassett EH, Rich T. Toll receptors and the renaissance of innate immunity. New York: Kluwer Academic/Plenum Publisher; 2005. p. 1–17.
160. Cristofaro P, Opal SM. Role of Toll-like receptors in infection and immunity: clinical implications. *Drugs*. 2006;66:15–29.
161. Takeda K., Akira S. Toll-like receptors. *Current Protocols in Immunology*. 2015;109(1) doi: 10.1002/0471142735.im1412s109.
178. Song PI, Park YM, Abraham T, Harten B, Zivony A, Neparidze N, Armstrong CA, Ansel JC. Human keratinocytes express functional CD14 and toll-like receptor 4. *J Invest Dermatol* 2002;119:424–32.
180. Kawai K. Expression of functional Toll-like receptors on cultured human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2003; 121:217.
182. Chen L, Guo S, Ranzer MJ, DiPietro LA: Toll-like receptor 4 has an essential role in early skin wound healing. *The Journal of investigative dermatology* 2013, 133(1):258-267.
186. Makinen, LK, Atula, T, Hayry, V, Jouhi, L, Datta, N, Lehtonen, S, Ahmed, A, Makitie, AA, Haglund, C, Hagstrom, J. Predictive role of Toll-like receptors 2, 4, and 9 in oral tongue squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2015;51:96–102
187. Ilmarinen, T, Hagstrom, J, Haglund, C, Auvinen, E, Leivo, I, Pitkaranta, A, Aaltonen, LM. Low expression of nuclear Toll-like receptor 4 in laryngeal papillomas transforming into squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2014;151:785–90.
188. Huhta H, Helminen O, Lehenkari PP, Saarnio J, Karttunen TJ, Kauppila JH. Toll-like receptors 1, 2, 4 and 6 in esophageal epithelium, Barrett's esophagus, dysplasia and adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2016 Apr 26;7(17):23658-67. doi: 10.18632/oncotarget.8151. PMID: 27008696; PMCID: PMC5029654.).
189. Huhta H, Helminen O, Kauppila JH, Salo T, Porvari K, Saarnio J, Lehenkari PP, Karttunen TJ. The Expression of Toll-like Receptors in Normal Human and Murine Gastrointestinal Organs and the Effect of Microbiome and Cancer. *J Histochem Cytochem*. 2016 Aug;64(8):470-82. doi: 10.1369/0022155416656154. Epub 2016 Jul 1. PMID: 27370795; PMCID: PMC4971779.
190. Janardhan KS, McIsaac M, Fowlie J, Shrivastav A, Caldwell S, Sharma RK, Singh B. Toll like receptor-4 expression in lipopolysaccharide induced lung inflammation. *Histol Histopathol*. 2006 Jul;21(7):687-96. doi: 10.14670/HH-21.687. PMID: 16598667.
191. Dickinson SE, Wondrak GT. TLR4 in skin cancer: From molecular mechanisms to clinical interventions. *Mol Carcinog*. 2019 Jul;58(7):1086-1093. doi: 10.1002/mc.23016. Epub 2019 Apr 24. PMID: 31020719; PMCID: PMC7906353.
192. Sen, R., and Baltimore, D. (1986). Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47, 921–928.
196. Gupta SC, Sundaram C, Reuter S, Aggarwal BB. Inhibiting NF- κ B activation by small molecules as a therapeutic strategy. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech* 2010;1799(10):775-87
203. Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* 2003; 73: 209–212.
210. Salles MB, Gehrke SA, Shibli JA, Allegrini S Jr, Yoshimoto M, König B Jr. Evaluating Nuclear Factor NF- κ B Activation following Bone Trauma: A Pilot Study in a Wistar Rats Model. *PLoS One*. 2015 Oct 14;10(10):e0140630. doi: 10.1371/journal.pone.0140630. PMID: 26465330; PMCID: PMC4605579.
211. Nonaka M, Chen XH, Pierce JE, Leoni MJ, McIntosh TK, Wolf JA, Smith DH. Prolonged activation of NF- κ B following traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma*. 1999 Nov;16(11):1023-34. Doi;
212. Tao LY, Chen XP, Ding M. [The study on expression of NF- κ B in experimental brain contusion in rats]. *Fa Yi Xue Za Zhi*. 2004;20(2):73-6, 80. Chinese. PMID: 15311518]