



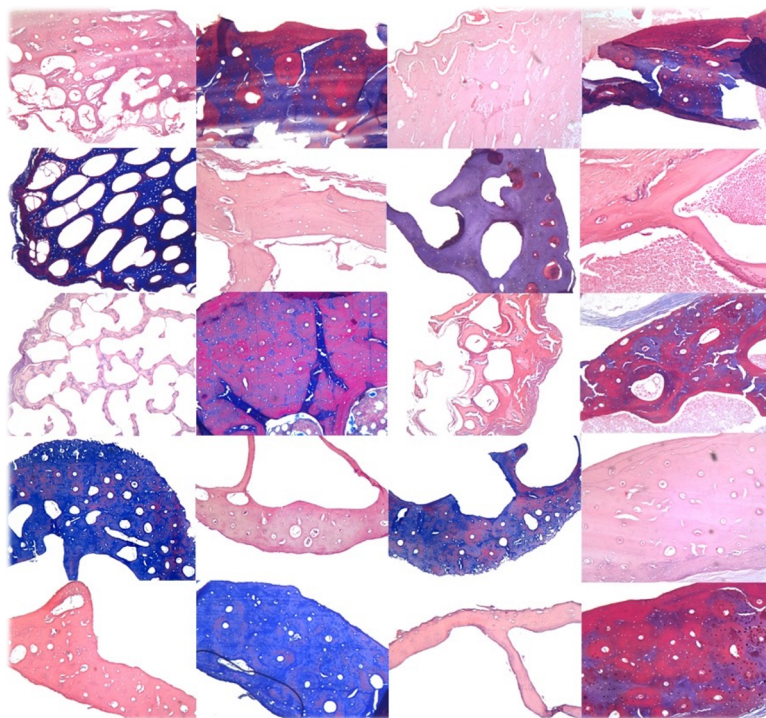
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Συγκριτική ιστολογική μελέτη τμημάτων πλευρών
οικόσιτων ζώων: Εφαρμογή στην αναγνώριση
μικροτεμαχίων οστών δικαστικού ενδιαφέροντος**



Όνοματεπώνυμο: Βασιλεία Ψαρρά, Κτηνίατρος
Α.Μ. 41815

Επιβλέπων: Κωνσταντίνος Μωραΐτης
Αν. Καθηγητής Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Αθήνα, 2021

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κωνσταντίνος Μωραΐτης, Αν. Καθηγητής Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ (Επιβλέπων)

Δημήτριος Βλαχοδημητρόπουλος, Αν. Καθηγητής Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Χαρά Σπηλιοπούλου, Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Δεν είναι σπάνιες οι περιπτώσεις ανεύρεσης και αποστολής μικροτεμαχίων οστών άγνωστης προέλευσης στα εργαστήρια Δικαστικής Ανθρωπολογίας. Αρκετές φορές τα οστά εμφανίζονται κατακερματισμένα και δεν διασώζονται τα μακροσκοπικά ανατομικά τους χαρακτηριστικά, ώστε να είναι δυνατή η ταυτοποίηση του είδους εκ του οποίου προέρχονται. Στις περιπτώσεις αυτές εφαρμόζονται μέθοδοι ιστολογικής διερεύνησης με σκοπό την επιβεβαίωση ή τον αποκλεισμό της ανθρώπινης προέλευσής τους.

Ο οστίτης ιστός των ανθρώπων και των υπόλοιπων θηλαστικών συγκροτείται από κοινά δομικά στοιχεία, ενώ εμφανίζει ομοιότητες και διαφορές στη μικροαρχιτεκτονική του δομή. Έχουν προηγηθεί συγκριτικές ιστολογικές μελέτες που αφορούν ανθρώπινα και ζωικά οστά αξιοποιώντας τα ποιοτικά, καθώς και τα ιστομορφομετρικά χαρακτηριστικά των ιστών. Ωστόσο, η πλειοψηφία αυτών εφαρμόζεται σε εφαιλατωμένους ιστούς μακρών οστών, ενώ οι αναφορές στα οστά των πλευρών και σε εφαιλατωμένους ιστούς είναι περιορισμένες.

Για το σκοπό της μελέτης περισυλλέχθηκαν οστά πλευρών σκύλων και γατών από κοιμητήριο ζώων της Αττικής και οστά πλευρών βοοειδών, αιγοπροβάτων και χοίρων από κρεαταγορά της Αττικής, με την προϋπόθεση ότι το κάθε οστό ανήκε σε διαφορετικό άτομο. Από τα ζωικά οστά ελήφθησαν συνολικά 21 ιστοτεμάχια και παρασκευάστηκαν ιστολογικά δείγματα στο παρασκευαστήριο της Μονάδας Ιστοπαθολογίας του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ. Επιπλέον, για λόγους αντιπαραβολής συμπεριλήφθηκαν δύο ιστοτεμάχια ανθρώπινων πλευρών από δείγματα της Μονάδας Δικαστικής Ανθρωπολογίας και Ιστοπαθολογίας του Εργαστηρίου. Από το σύνολο των ιστοτεμαχίων προέκυψαν 142 ιστολογικά παρασκευάσματα.

Για την παρασκευή των δειγμάτων οστίτη ιστού επιλέχθηκε η μέθοδος της εφαιλάτωσης των οστέινων ιστοτεμαχίων με τη χρήση διαλυμάτων νιτρικού οξέος διαφορετικών συγκεντρώσεων και τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν.

Για την παρατήρηση των δομικών στοιχείων των ιστών με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου εφαρμόστηκαν στα ιστολογικά παρασκευάσματα οι χρώσεις αιματοξυλίνης-ηωσίνης, καθώς και η τρίχρωμη Masson. Η χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης απέδωσε ιστολογικές εικόνες ικανοποιητικής ποιότητας, ενώ η τρίχρωμη

χρώση Masson αποτύπωσε ευκρινέστερα τα όρια των δευτερογενών οστεώνων στους ιστούς των θηλαστικών που εξετάστηκαν.

Από τα 142 ιστολογικά παρασκευάσματα επιλέχθηκαν τα καταλληλότερα και με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου και ψηφιακής κάμερας του Εργαστηρίου Ιστολογίας-Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ ελήφθησαν συνολικά 511 ψηφιακές μικροφωτογραφίες. Ακολούθησε η ποιοτική ιστολογική ανάλυση και η σύγκριση των ιστολογικών χαρακτηριστικών μεταξύ των ειδών με σκοπό τη διερεύνηση σημείων ποιοτικής ιστολογικής διαφοροποίησης.

Η πλειονότητα των ιστολογικών δειγμάτων που προέρχονταν από σφάγια ζώων εμφάνισε κυρίως δοκιδώδες οστό, το οποίο καταλάμβανε μικρότερη ή μεγαλύτερη έκταση στον ιστό, ενώ τα ανθρώπινα ιστολογικά δείγματα και εκείνα που προέρχονταν από σκύλους, γάτες και ένα αιγοπρόβατο εμφάνισαν κυρίως δευτερογενή οστίτη ιστό με Αβέρσεια συστήματα. Ωστόσο, στα εσωτερικά στρώματα της φλοιώδους μοίρας των πλευρών των βοοειδών παρατηρήθηκε εκτεταμένη εναπόθεση δευτερογενούς οστίτη ιστού με οστεώνες.

Τα ιστολογικά παρασκευάσματα των τμημάτων πλευρών ζώων και ανθρώπου παρουσίασαν ομοιότητες και διαφορές αναφορικά με τα ποιοτικά ιστολογικά τους χαρακτηριστικά. Για τη διαφοροποίηση τόσο μεταξύ των ζωικών ιστών, όσο και μεταξύ των ζωικών και των ανθρώπινων ιστών ήταν απαραίτητη η συναξιολόγηση των ποιοτικών ιστολογικών χαρακτηριστικών που εμφάνιζε η έσω και η έξω φλοιώδης μοίρα των πλευρών. Τα ποιοτικά ιστολογικά χαρακτηριστικά που οδήγησαν στη διαφοροποίηση των ειδών των θηλαστικών στα ιστολογικά παρασκευάσματα που εξετάστηκαν ήταν οι ιστολογικοί τύποι που παρατηρήθηκαν, τα χαρακτηριστικά των Αβέρσειων συστημάτων, καθώς και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των υπόλοιπων ιστολογικών δομών του ιστού, όπως οι αγγειακοί σωλήνες και οι σωλήνες του Volkmann.

Υψηλή δυσκολία εμφάνισε η διαφοροποίηση μεταξύ των ειδών που παρουσίασαν αποκλειστικά δευτερογενή οστίτη ιστό με Αβέρσεια συστήματα και ιδιαίτερα μεταξύ του ανθρώπου, των σκύλων και των γατών. Ωστόσο, εντοπίστηκαν ιστολογικές δομές ικανές για να οδηγήσουν στην ποιοτική ιστολογική διαφοροποίηση της ανθρώπινης πλευράς από εκείνες των ζώων στα ιστολογικά παρασκευάσματα που εξετάστηκαν. Αντιθέτως, το είδος του θηλαστικού δεν ήταν δυνατόν να ταυτοποιηθεί επιτυχώς στις θέσεις όπου ο ιστός στερούταν αγγείωσης.

Τα αποτελέσματα αυτής της αρχικής συγκριτικής μελέτης είναι ενθαρρυντικά και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως οδηγός για την ποιοτική ιστολογική διερεύνηση αφαλατωμένων μικροτεμαχίων οστών άγνωστης προέλευσης με σκοπό την ταυτοποίηση του είδους. Ωστόσο, είναι απαραίτητη η ποιοτική ιστολογική ανάλυση μεγαλύτερου μεγέθους δείγματος, διαφορετικών οστών του σκελετού, καθώς και οστών που προέρχονται από ανήλικα άτομα για την ασφαλέστερη διεξαγωγή συμπερασμάτων.

ABSTRACT

It is not uncommon for skeletal remains of unknown origin to be sent to Forensic Anthropology laboratories for examination. Frequently, the remains appear extremely fragmented and their macroscopic features are not well preserved. In these cases, histological methods are applied in order to confirm or exclude the human origin of the bone fragments.

Human and non-human bone tissue is composed of common structural elements and its microarchitecture shows similarities and differences between the species. A number of qualitative and quantitative studies of the histomorphology as well as the histomorphometric characteristics have been carried out for the species determination of the osseous tissues. However, the majority of them have been applied on ground bone samples of long bones, while information on ribs and decalcified tissue is limited.

For the aim of this study, dogs' and cats' rib bones were collected from an animal cemetery in Attica and cattle's, sheep's and pigs' rib bones were collected from a meat market in Attica, provided that each bone belonged to a different animal. A total of 21 bone samples were taken from the animals' ribs for the preparation of the histological samples. In addition, two human bone samples from the Forensic Anthropology Unit and the Histopathology Unit of the Department of Forensic Medicine and Toxicology of the Medical School of NKUA, were included for comparison purposes. A total of 142 histological samples for transmitted light microscopy were prepared.

For the preparation of the histological slides, the bone sections were decalcified by nitric acid solutions of different concentrations. Light microscopy was used to evaluate the results of the bone decalcification.

Hematoxylin-eosin and Masson's trichrome stains were applied to the histological samples. Hematoxylin-eosin stain provided histological samples of good quality and reflected histological structures consistently. In the other hand, Masson's trichrome stained more clearly the cement lines of secondary osteons in the human and non-human bone samples.

A total of 511 digital microphotographs from the most appropriate samples were taken with the use of an optical microscope and a digital camera of the Laboratory of Histology-Embryology of the Medical School of NKUA. A qualitative and comparative

histological analysis was further performed in order to investigate points of qualitative histological differentiation between the examined species.

The majority of the cattle's, sheep's and pigs' bone samples was composed of trabecular bone in different degrees, while human's, dogs', cats' and one sheep's osseous tissues were composed mainly of Haversian bone tissue. However, extensive deposition of secondary bone tissue was observed in the inner layers of cattle's cortex as well.

The histological samples of human and non-human rib sections showed similarities and differences regarding their qualitative histological characteristics. In order to differentiate the species, it was necessary to evaluate the qualitative histological features of the inner and outer rib cortex. The qualitative histological features that led to the species differentiation, were the histological types of bone and the characteristics of the Haversian systems as well as additional histological structures of the tissues, such as vascular and Volkmann's canals.

Determination of species that presented exclusively Haversian bone was challenging, especially regarding the differentiation of human, dogs and cats. However, some histological structures that were able to differentiate the human from the non-human origin of the bone samples that were examined in this study were observed. On the contrary, species determination was invalid at tissue sites where exclusively avascular bone was observed.

The encouraging results of the present comparative study could be used as a guide for qualitative histological examination of decalcified bone for the species determination of unknown bone fragments. However, additional research on qualitative histological analysis of a larger sample size of different bones, and bone samples from juvenile humans is necessary for safer conclusions.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους ανθρώπους οι οποίοι συνέβαλαν καθοριστικά στην ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, καθώς και τους ανθρώπους που με στήριξαν σε αυτήν την προσπάθεια.

Αρχικά, τον καθηγητή μου και επιβλέποντα κ. Κωνσταντίνο Μωραΐτη για την ευκαιρία που μου έδωσε να έρθω σε επαφή με το ενδιαφέρον αντικείμενο της Δικαστικής Ανθρωπολογίας και για την επιστημονική καθοδήγηση, τις υποδείξεις, την ενθάρρυνση και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά την εκπόνηση της παρούσας μελέτης.

Τον συνεπιβλέποντα καθηγητή κ. Δημήτριο Βλαχοδημητρόπουλο για τις χρήσιμες υποδείξεις και το ενδιαφέρον του, καθώς και για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου με την παραχώρηση του οπτικού μικροσκοπίου της Μονάδας Ιστοπαθολογίας ώστε να μελετήσω τα ιστολογικά δείγματα. Επίσης, τη συνεπιβλέπουσα καθηγήτρια κα Χαρά Σπηλιοπούλου για το ενδιαφέρον της και τη συμβολή της στην περάτωση των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην κα Χρύσα Φανάκη και στην κα Ιωάννα Τζελίλη, καθώς χωρίς την πολύτιμη συμβολή τους στην προετοιμασία των δειγμάτων δεν θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας.

Ακόμη, στο προσωπικό του Εργαστηρίου Ιστολογίας-Εμβρυολογίας και ιδιαίτερα στην καθηγήτρια κα Σοφία Χαβάκη για την παραχώρηση του εργαστηριακού εξοπλισμού με σκοπό τη λήψη των ψηφιακών μικροφωτογραφιών, αλλά και στους φοιτητές που προσάρμοσαν το πρόγραμμά τους έτσι ώστε να με διευκολύνουν.

Στο προσωπικό του κοιμητηρίου ζώων «Άγιος Φραγκίσκος», καθώς και στο προσωπικό του «Κρεοπωλείο της Αγοράς» για την προμήθεια των ζωικών οστών.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω και τους συναδέλφους μου από το Τμήμα Ζωοανθρωπονόσων του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων για την κατανόησή, την παρότρυνση και το ειλικρινές ενδιαφέρον τους για την πρόοδό μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου τους αγαπημένους μου ανθρώπους. Τους φίλους μου, που ήταν δίπλα μου και σε αυτήν την προσπάθεια. Τον σύζυγό μου, που ήταν πάντα δίπλα μου δείχνοντας αμέριστη στήριξη, κατανόηση, αγάπη και υπομονή. Τους γονείς μου, για τη στήριξη, την εμπιστοσύνη και την αγάπη τους που καθόρισαν την πορεία της ζωής μου και την αδερφή μου που υπήρξε συνοδοιπόρος μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	1
ABSTRACT	4
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	6
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	13
1. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΟΣΤΙΤΗ ΙΣΤΟΥ	14
1.1. Λειτουργική σημασία του σκελετού.....	16
1.2. Μακροσκοπικά χαρακτηριστικά	16
1.3. Μικροσκοπική δομή του οστίτη ιστού	20
1.3.1. Οστεοβλάστες.....	22
1.3.2. Οστεοκύτταρα	25
1.3.3. Οστεοκλάστες.....	27
1.3.4. Διάμεση θεμέλια ουσία.....	29
1.3.5. Αιμάτωση και νεύρωση	31
1.3.6. Περίοστεο και ενδόστεο	33
1.4. Αρχιτεκτονική οργάνωση του οστίτη ιστού	36
1.5. Οστεογένεση.....	45
1.5.1. Ενδομεμβρανική οστέωση.....	46
1.5.2. Ενδοχόνδρινη οστέωση	47
1.6. Οστική ανακατασκευή.....	52
1.6.1. Φάσεις οστικής ανακατασκευής.....	54
1.6.2. Ορμονική ρύθμιση οστικής ανακατασκευής.....	59
2. ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΟΣΤΙΚΩΝ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ.....	61
2.1. Μέθοδοι που εφαρμόζονται.....	62
2.2. Ποιοτική μικροσκοπική διαφοροποίηση	66
2.2.1. Άνθρωπος	68

2.2.2.	Βοοειδή.....	79
2.2.3.	Αιγοπρόβατα.....	84
2.2.4.	Χοίρος.....	88
2.2.5.	Σκύλος	92
2.2.6.	Γάτα	95
2.3.	Ποσοτική μικροσκοπική διαφοροποίηση.....	97
2.4.	Μακροσκοπικά χαρακτηριστικά των πλευρών	104
2.4.1.	Άνθρωπος	106
2.4.2.	Βοοειδή.....	107
2.4.3.	Αιγοπρόβατα.....	108
2.4.4.	Χοίρος.....	109
2.4.5.	Σκύλος	110
2.4.6.	Γάτα	110
2.5.	Ιστολογικά γνωρίσματα οστίτη ιστού πλευρών	111
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ		114
3.	ΣΚΟΠΟΣ.....	115
4.	ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	117
4.1.	Υλικό	117
4.2.	Μεθοδολογία	120
4.2.1.	Λήψη ιστοτεμαχίων.....	120
4.2.2.	Μονιμοποίηση	122
4.2.3.	Αφαλάτωση	123
4.2.4.	Αφυδάτωση και διαύγαση	125
4.2.5.	Έγκλειση σε παραφίνη	126
4.2.6.	Λήψη τομών	127
4.2.7.	Χρώσεις και επικάλυψη.....	128
4.2.8.	Παρατήρηση και λήψη ψηφιακών εικόνων.....	130

5.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	132
5.1.	Άνθρωπος	132
5.2.	Βοοειδή.....	136
5.3.	Αιγοπρόβατα.....	140
5.4.	Χοίρος.....	143
5.5.	Σκύλος	147
5.6.	Γάτα	151
6.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	157
6.1.	Περιορισμοί της μελέτης	157
6.2.	Αφαλάτωση	158
6.3.	Χρώσεις	160
6.4.	Ποιοτικά ιστολογικά χαρακτηριστικά	161
6.5.	Σύγκριση ποιοτικών ιστολογικών χαρακτηριστικών τμημάτων πλευρών οικόσιτων ζώων και εφαρμογή στην αναγνώριση μικροτεμαχίων οστών δικαστικού ενδιαφέροντος.....	166
6.5.1.	Δοκιδώδες οστό	170
6.5.2.	Δευτερογενής οστίτης ιστός	171
6.5.3.	Αναγνώριση ανθρώπινης προέλευσης.....	173
7.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	180
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	182
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΜΙΚΡΟΦΩΤΟΓΡΑΦΙΩΝ.....	195

“Bones can be puzzles, but they never lie”

Clyde Collins Snow (1928-2014)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η δικαστική ανθρωπολογία είναι η επιστήμη που ασχολείται με την ανθρωπολογική διερεύνηση σκελετικού υλικού και αποτελεί κλάδο της φυσικής ανθρωπολογίας καθώς και των ιατροδικαστικών επιστημών [1]. Κατά την ανθρωπολογική διερεύνηση του σκελετικού υλικού ο δικαστικός ανθρωπολόγος καλείται πρωτίστως να προσδιορίσει την προέλευσή του αποκλείοντας την πιθανότητα να πρόκειται για οστεόμορφο υλικό¹ ή για ζωικά σκελετικά υπολείμματα [1,2] και στη συνέχεια να εκτιμήσει τον αριθμό των ατόμων στα οποία αντιστοιχεί, την ηλικία, το φύλο και τη φυλετική καταγωγή καθώς και τα αίτια και το χρόνο θανάτου κ.ά. [1,3].

Σε περίπτωση ανεύρεσης ανθρώπινου σκελετικού υλικού το κύριο μέλημα κατά την ανθρωπολογική διερεύνηση είναι η επιβεβαίωση ή ο αποκλεισμός του δικαστικού του ενδιαφέροντος καθώς και η ταυτοποίηση του ατόμου από το οποίο προήλθε. Η επιβεβαίωση επιτυγχάνεται βάση της συνεκτίμησης βιολογικών, φυσικοχημικών και ανθρωπογενών παραγόντων στους οποίους οφείλονται οι μεταθανάτιες αλλοιώσεις που παρουσιάζουν τα σκελετικά υπολείμματα [1,2].

Στις περιπτώσεις όπου τα ανευρεθέντα οστά εμφανίζονται κατακερματισμένα, αλλοιωμένα ή αποτεφρωμένα, είναι απαραίτητος ο προσδιορισμός της προέλευσής τους. Ελλείπει των ιδιαίτερων για κάθε είδος μακροσκοπικών χαρακτηριστικών των οστών είναι πολύ πιθανό τα ζωικά οστικά υπολείμματα να ταυτοποιηθούν, λανθασμένα, ως ανθρώπινα [1,4-6]. Στις περιπτώσεις αυτές χρησιμοποιούνται κυρίως διαγνωστικές μέθοδοι συγκριτικής ιστολογίας [1,4] οι οποίες και αναλύονται στο πλαίσιο της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας.

Η χρήση μεθόδων συγκριτικής ιστολογίας για τον προσδιορισμό του είδους εκ του οποίου προέρχεται το ανευρεθέν σκελετικό υλικό, βασίζεται στο γεγονός ότι ο οστίτης αποτελεί έναν φυλογενετικά καλά συντηρημένο ιστό, που εμφανίζει παρόμοια σύνθεση και οργάνωση στα διαφορετικά είδη θηλαστικών [7].

Ο οστίτης ιστός του ανθρώπου εμφανίζει διαφορετική μικροαρχιτεκτονική δομή σε σχέση με άλλα θηλαστικά, γεγονός που οφείλεται στις διαφορές που παρουσιάζει στο

¹ Οστεόμορφα υλικά είναι εκείνα που μιμούνται τη μακροσκοπική εικόνα των οστών και ενδέχεται να αφορούν εκπαιδευτικά προπλάσματα σκελετικού υλικού, αλλοιωμένα τεμάχια πλαστικού και φυσικά υλικά όπως κοράλλια, πετρώματα ή ξύλα, τα οποία έχουν δεχτεί την επίδραση φυσικοχημικών παραγόντων [2].

ρυθμό ανάπτυξής του, στις φορτίσεις που δέχεται καθώς και στις θρεπτικές του ανάγκες [4]. Ωστόσο, οι ταφονομικές αλλοιώσεις που προκαλούν απόσπαση των περιφερικών τμημάτων του φλοιώδους οστού, καθώς και οι ομοιότητες της μικροδομής των οστών των ανήλικων ανθρώπων και ιδιαίτερα των βρεφών με εκείνη των οστών των λοιπών θηλαστικών δυσχεραίνουν την αναγνώριση του είδους σε μικροσκοπικό επίπεδο και αυξάνουν τις πιθανότητες λανθασμένης ταυτοποίησης [1,4,8]. Σε αυτές τις περιπτώσεις επιστρατεύονται μέθοδοι ιστομορφομετρίας έτσι ώστε να ταυτοποιηθεί ή να αποκλειστεί, κατά το δυνατόν, η ανθρώπινη προέλευση των οστικών υπολειμμάτων [1,4].

Επιπλέον, αρκετά από τα οστά των χοίρων παρουσιάζουν παρόμοια μακροσκοπικά χαρακτηριστικά με τα αντίστοιχα του ανθρώπου [1], ενώ οστέινα μικροτεμάχια προερχόμενα από μεγάλους σκύλους και βοοειδή ενδέχεται να παρουσιάζουν ομοιότητες με τα ανθρώπινα στη μικροαρχιτεκτονική δομή του ιστού τους [9]. Οστικά υπολείμματα μικρών θηλαστικών, όπως γατών και σκύλων καθώς και σφάγιων οικόσιτων ζώων όπως χοίρων, μεγάλων και μικρών μηρυκαστικών ανευρίσκονται στις ευρύτερες αστικές περιοχές και αποστέλλονται συχνά για διερεύνηση σε εργαστήρια δικαστικής ανθρωπολογίας [1,4,9-11].

Οι παραπάνω λόγοι, καθώς και η προτροπή των ερευνητών για περαιτέρω έρευνα [1,4,12] ιδιαίτερα όσον αφορά τα πλατέα οστά [13-15] μας οδήγησε στην επιλογή της συγκριτικής μελέτης του οστίτη ιστού τμημάτων πλευρών οικόσιτων ζώων, η οποία περιγράφεται στο Ειδικό Μέρος της εργασίας.

Τέλος, η κατανόηση των χαρακτηριστικών του οστίτη ιστού, που περιγράφονται στο Γενικό Μέρος, αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την περιγραφή των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών της μικροδομής του οστίτη ιστού των ζώων που πραγματεύεται η εργασία και των διαφορών τους από εκείνη που συναντάται στον ιστό των ανθρώπινων οστών. Στο Γενικό Μέρος της εργασίας περιγράφονται επίσης, οι ομοιότητες, οι διαφορές, καθώς και οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται σε αντίστοιχες μελέτες σκελετικού υλικού. Επιπλέον, επιχειρείται μια σύντομη περιγραφή των μακροσκοπικών και μικροσκοπικών χαρακτηριστικών των ανθρώπινων και ζωικών πλευρών, καθώς σε αυτά τα οστά εστιάζεται το ερευνητικό ενδιαφέρον της εργασίας.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΟΣΤΙΤΗ ΙΣΤΟΥ

Ο οστίτης ιστός αποτελεί ένα είδος ερειστικού ιστού μεσεγγυματικής προέλευσης στην πλειοψηφία του, με εξαίρεση τα οστά της σπονδυλικής στήλης και των πλευρών, τα οποία προκύπτουν από τη μετάπλαση των σκληροτομιών του παραξονικού μεσοδέρματος κατά τη μορφογένεση του εμβρύου [16]. Στο αναπτυσσόμενο έμβρυο η οστεογένεση λαμβάνει χώρα στις χόνδρινες καταβολές των οστών, καθώς και στα υμενώδη υποθέματα κυρίως των πλατέων οστών και χαρακτηρίζεται αντιστοίχως ως ενδοχόνδρινη και ενδομεμβρανική οστέωση [17-19].

Κατά το ένα τρίτο του (περίπου 30%), ο οστίτης ιστός αποτελείται από οργανική ουσία (κύτταρα και κολλαγόνες ίνες) [17,19], κατά 45% από ανόργανα άλατα και κατά 25% από νερό [17]. Από τα ανόργανα άλατα της θεμέλιας ουσίας (bone matrix) του οστίτη ιστού εκείνο που απαντάται κυρίως, είναι το φωσφορικό ασβέστιο υπό τη μορφή υπερμικροσκοπικών κρυστάλλων υδροξυαπατίτη, σε ποσοστό 80-90% [18]. Ακολουθούν το ανθρακικό ασβέστιο, το φθοριούχο ασβέστιο, το χλωριούχο ασβέστιο, το φωσφορικό μαγνήσιο και τα αλκαλικά άλατα [17,18]. Τα οστά διαθέτουν το 99% του ασβεστίου του οργανισμού [17] και για το λόγο αυτό αποτελούν τους βασικούς ρυθμιστές της ομοιοστασίας του² [17-21].

Οι κολλαγόνες ίνες της διάμεσης ουσίας είναι εκείνες που προσδίδουν στον ιστό μεγάλη δύναμη τάσης με αποτέλεσμα την εμφάνιση μιας σχετικής ελαστικότητας, ενώ τα άλατα ασβεστίου ευθύνονται για την μεγάλη δύναμη συμπίεσης [17,18]. Αυτές οι ιδιότητες των επιμέρους στοιχείων, η στενή τους σύνδεση και η οργάνωσή τους σε επίπεδο μικροαρχιτεκτονικής προσδίδουν στο οστό την χαρακτηριστική του σκληρότητα και αντοχή [18,21,22].

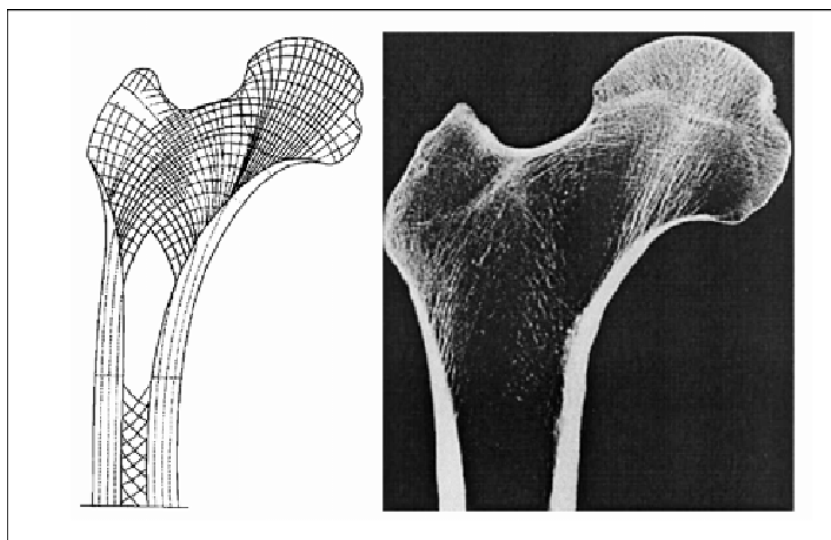
Κατά τη διάρκεια της ζωής ο οστίτης ιστός υπόκειται σε διαρκή ανανέωση μέσω της συζευγμένης, υπό φυσιολογικές συνθήκες, απορρόφησης και ανακατασκευής του (bone remodeling) [4,17,18,23]. Η οστική ανακατασκευή εξασφαλίζει την αρχιτεκτονική προσαρμογή του ιστού στις μηχανικές δυνάμεις κατά τη διάρκεια της

² Βασικός είναι ο ρόλος των οστών και για την ομοιοστασία του φωσφόρου στον οργανισμό [17,19] καθώς αποτελεί το 18,5% της ανόργανης ουσίας τους [17].

ανάπτυξης³ και της ενήλικης ζωής, τη μερική αντικατάστασή του, όπως συμβαίνει κατά την πώρωση καταγμάτων, καθώς και τη διατήρηση της ομοιοστασίας του ασβεστίου και του φωσφόρου στον οργανισμό [17,18,24].

Η ανάπτυξη και η ανακατασκευή των οστών επηρεάζονται από μηχανικούς, διαιτητικούς και ορμονικούς παράγοντες [18]. Αναφορικά με τους μηχανικούς παράγοντες, οι δυνάμεις φόρτισης που εξαρτώνται από το σωματικό βάρος των θηλαστικών και τη μυϊκή τους μάζα, καθώς και η χαρακτηριστική για κάθε είδος κινησιολογία, επιδρούν στα ιδιαίτερα μορφολογικά χαρακτηριστικά του οστίτη ιστού [4,7]. Ακόμη, εξωγενείς δυνάμεις έκτασης και συμπίεσης έχουν ως αποτέλεσμα την οστική προσαρμογή στις νέες συνθήκες [4,25,26], με ιδιαίτερη επιρροή στην αρχιτεκτονική των οστεδοκίδων του σπογγώδους οστού (Εικόνα 1) [18,23,26].

Οι κύριοι ορμονικοί παράγοντες που επιδρούν στην οστική ανάπτυξη και ανακατασκευή είναι η παραθορμόνη, η καλσιτονίνη, η καλσιτριόλη, η αυξητική ορμόνη, η σωματομεδίνη, τα γλυκοκορτικοειδή, τα οιστρογόνα, τα ανδρογόνα και οι θυρεοειδικές ορμόνες [17,24,27].



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση από τον Julius Wolff των οστεοδοκίδων της σπογγώδους μείρας του άνω άκρου του μηριαίου οστού (αριστερά) και επιμήκης διατομή του μηριαίου οστού (δεξιά). Οι οστεοδοκίδες ακολουθούν τις γραμμές των δυνάμεων. Πηγή: [28]

³ Η συζευγμένη απορρόφηση-ανακατασκευή του οστού κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης αναφέρεται ως bone modeling [4].

1.1. Λειτουργική σημασία του σκελετού

Ο σκελετός των σπονδυλωτών εξυπηρετεί μηχανικές και μεταβολικές λειτουργίες [18,29]. Στις μηχανικές του ιδιότητες ανήκουν η στήριξη του σώματος και η επικουρία των κινήσεων, καθώς αποτελεί έδαφος πρόσφυσης των τενόντων του μυϊκού συστήματος [18-21,30].

Ακόμη, λειτουργεί ως προστατευτικό πλαίσιο για τα ζωτικά όργανα του οργανισμού [18-20,29]. Συγκεκριμένα, τα οστά του κρανίου προστατεύουν τον εγκέφαλο, η σπονδυλική στήλη τον νωτιαίο σωλήνα, τα οστά του θώρακα τους πνεύμονες, την καρδιά και το ήπαρ και τα οστά της πυέλου το κατώτερο ουροποιητικό σύστημα [19].

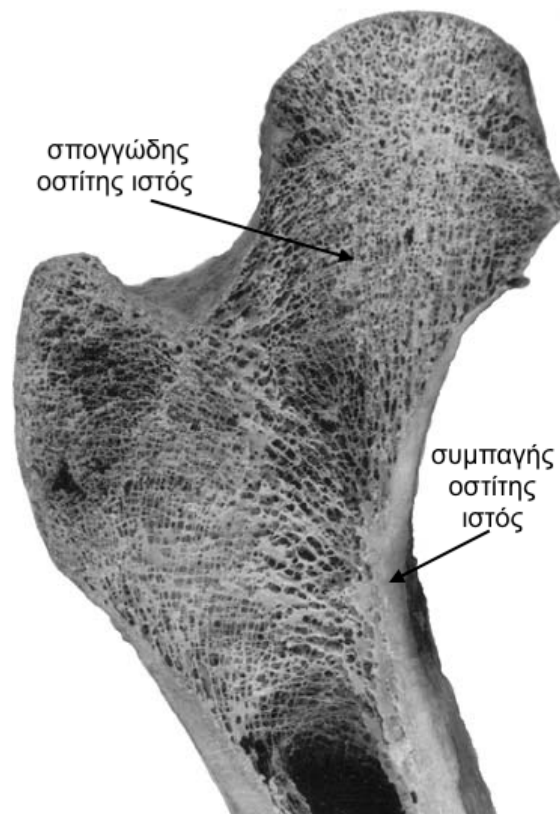
Ο βασικός μεταβολικός του ρόλος είναι η διατήρηση της ομοιοστασίας του ασβεστίου, καθώς ο οστίτης ιστός αποτελεί τη βασική αποθήκη ασβεστίου στον οργανισμό [18-21,24,29]. Ακόμη, σημαντικός είναι ο ρόλος του στην ομοιοστασία του φωσφόρου [19,20,29]. Τέλος, λειτουργεί ως αιμοποιητικό όργανο φιλοξενώντας τον ερυθρό μυελό [19-21,29].

1.2. Μακροσκοπικά χαρακτηριστικά

Σε εγκάρσιες και επιμήκειες διατομές, ο οστίτης ιστός αποτελείται από φλοιώδες ή συμπαγές οστό εξωτερικά (cortical, compact bone) και σπογγώδες οστό εσωτερικά (cancellous, trabecular bone) [20,21,29].

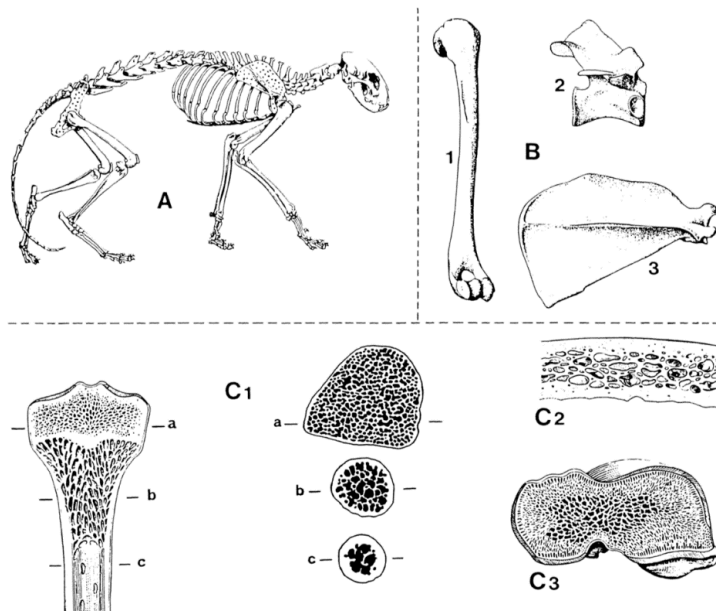
Το φλοιώδες οστό αποτελεί το 80% της συνολικής μάζας του οστού [21], εμφανίζεται συμπαγές μακροσκοπικά, ενώ οι κοιλότητες που διαθέτει στη λεπτή κατασκευή του είναι ορατές μόνο με τη βοήθεια τεχνικών μικροσκοπίας [29].

Το σπογγώδες οστό αποτελεί το 20% της μάζας του οστού [21] και εμφανίζει ένα δίκτυο διακλαδιζόμενων οστεδοκίδων που σχηματίζουν κοιλότητες, τις μυελοκυψέλες, όπου φιλοξενείται ο μυελός των οστών, που αποτελεί το κύριο αιμοποιητικό όργανο του οργανισμού (Εικόνα 2) [19,21,29,30].



Εικόνα 2. Επιμήκης διατομή του άνω άκρου του μηριαίου οστού, όπου διακρίνεται η σπογγώδης και η συμπαγής μοίρα του οστού. Πηγή: [31]

Τα οστά του σκελετού ταξινομούνται ανάλογα με τις τρεις διαστάσεις που καταλαμβάνουν στο χώρο σε επιμήκη, βραχέα και πλατέα οστά [23,30]. Ακόμη, υπάρχουν τα ακανόνιστα οστά, τα οποία εξαιτίας του σχήματός τους δεν μπορούν να ταξινομηθούν σε κάποια από τις ανωτέρω κατηγορίες (Εικόνα 3) [19,32].



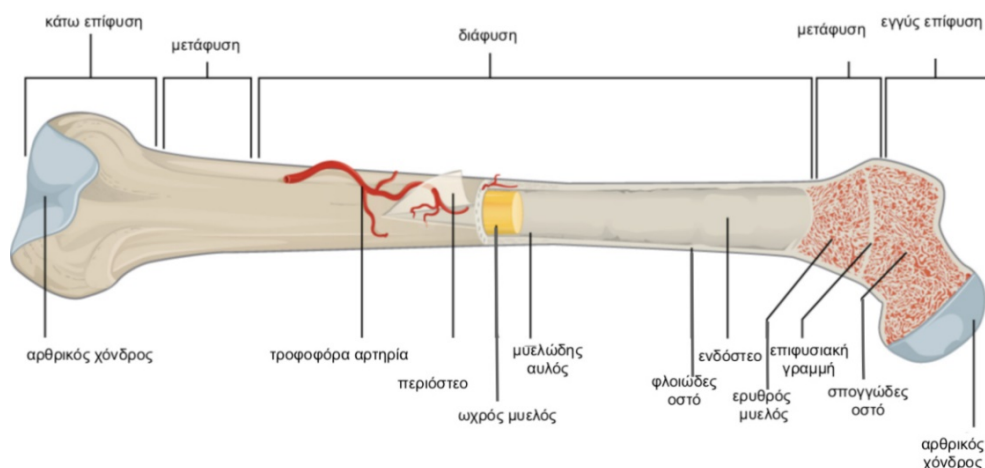
Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση σκελετικών στοιχείων. Α: Σκελετός σαρκοφάγου θηλαστικού. Β: 1. Επίμηκες οστό. 2. Βραχύ οστό κατά τον Francillon-Vieillot (με τη σύγχρονη ταξινόμηση εμπίπτει στα ακανόνιστα οστά). 3. Πlatύ οστό. C1: Απεικόνιση μακρού οστού σε επιμήκη και εγκάρσια τομή στην περιοχή της α. επίφυσης, b. μετάφυσης, c. διάφυσης. C2: Τομή πλατέως οστού, όπου διακρίνονται τα πέταλα συμπαγούς οστού και η σπογγώδης μοίρα εσωτερικά. C3: Τομή ακανόνιστου οστού, όπου διακρίνεται η εκτεταμένη ανάπτυξη του σπογγώδους οστού εσωτερικά της φλοιώδους μοίρας μικρής διαμέτρου. Πηγή: [23]

Επιμήκη οστά

Τα επιμήκη ή μακρά οστά αποτελούνται από τα δύο άκρα, τις επιφύσεις και ένα μέσο, σχεδόν κυλινδρικό, επίμηκες τμήμα, τη διάφυση [21,23,30]. Οι αρθρικές επιφάνειες των επιφύσεων καλύπτονται από ένα λεπτό στρώμα υαλοειδούς χόνδρου, τον αρθρικό χόνδρο, ενώ η διάφυση περιβάλλεται από έναν υμένα συνδετικού ιστού, το περιόστεο [21,23]. Οι επιφύσεις των μακρών οστών συνενώνονται με τη διάφυση δια μέσου των μεταφύσεων, όπου εντοπίζεται ο συζευκτικός χόνδρος που είναι υπεύθυνος για την κατά μήκος αύξηση των οστών, ο οποίος οστεοποιείται κατά την τελείωση της ανάπτυξης [21,23,30].

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης οι έσω περιφέρειες των επιφύσεων υπόκεινται σε μείωση, μέσω της οστικής απορρόφησης, στην περιοχή της μετάφυσης (μεταφυσική μείωση), έτσι ώστε να συγχωνευτούν με τη μικρότερης διαμέτρου διάφυση [23]. Η διάφυση των μακρών οστών αποτελείται κυρίως από φλοιώδες οστό στην περιφέρειά της, ενώ στο εσωτερικό της σχηματίζεται ο μυελώδης αυλός [19,21,23,30], που περιέχει τον ερυθρό μυελό στα νεαρά, τον ωχρό μυελό (λιπώδης) στα ηλικιωμένα άτομα και αφορίζεται εξωτερικά από το ενδόστεο [21].

Σε αντίθεση με τη διάφυση, η επίφυση των μακρών οστών διαθέτει μια λεπτή περιοχή φλοιώδους οστού στην εξωτερική της επιφάνεια, ενώ το σπογγώδες οστό καταλαμβάνει τη μεγαλύτερη περιοχή της, εσωτερικά της φλοιώδους μοίρας (Εικόνα 4) [21,23,30].



Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση επιμήκους οστού. Πηγή: [33]

Πλατέα οστά

Τα πλατέα οστά συνήθως εμφανίζουν καμπυλότητα και αποτελούνται από δύο επιφάνειες: μία κυρτή εξωτερικά και μια κοίλη εσωτερικά, που σχηματίζονται από τις αντίστοιχες πλάκες της φλοιώδους μοίρας και ενώνονται μεταξύ τους κατά τα χείλη τους [19,23,30]. Ανάμεσα στις πλάκες της συμπαγούς οστέινης ουσίας παρεμβάλλεται η σπογγώδης ουσία, η οποία στα πλατέα οστά του κρανίου ονομάζεται διπλόη [19,21,23,30]. Ακόμη, ορισμένα πλατέα οστά στερούνται επιφύσεων [23,30].

Σε ορισμένα πλατέα οστά του κρανίου η σπογγώδης ουσία απορροφάται και οι δύο πλάκες του συμπαγούς οστού απομακρύνονται μεταξύ τους σχηματίζοντας τους αεροφόρους κόλπους [30], ενώ απουσιάζει από τα οστά της ωμοπλάτης, την κλείδα (στα είδη όπου υπάρχει) και τα οστά της πυέλου, όπου συνενώνονται τα δύο πέταλα της συμπαγούς οστέινης ουσίας [19].

Βραχέα οστά

Τα βραχέα οστά εμφανίζουν σχεδόν ίσες τις τρεις διαστάσεις τους στο χώρο [30]. Τα βραχέα, καθώς και τα ακανόνιστα οστά αποτελούνται από συμπαγή οστέινη ουσία η οποία περιβάλλει μικρές περιοχές σπογγώδους ουσίας [19,21].

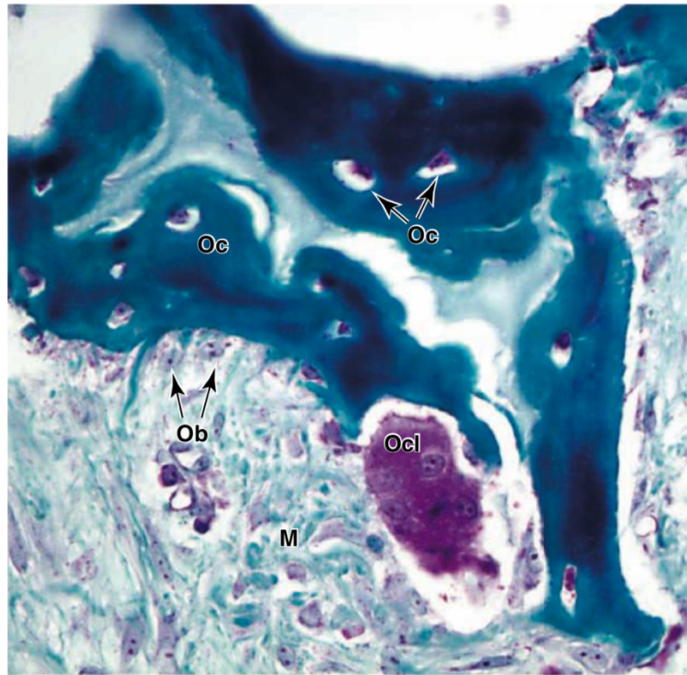
Στα μακροσκοπικά χαρακτηριστικά ανήκουν και τα διάφορα οστέινα μορφώματα που συναντώνται στην επιφάνεια των οστών, όπως οι αποφύσεις, τα φύματα, οι κόνδυλοι και οι ακρολοφίες [30]. Συνήθως, αυτά τα μορφώματα αποτελούν σημεία πρόσφυσης τενόντων και συνδέσμων [23,30]. Ακόμη, συναντώνται κοιλώματα, όπως τα βοθρία, τα εντυπώματα, οι αύλακες και οι εντομές που αποτελούν σημεία πίεσης από τους προσκείμενους μύες και τα γειτονικά όργανα ή σημεία ολίσθησης των τενόντων [30]. Τέλος, συναντώνται μεγαλύτερα και μικρότερα τρήματα που αποτελούν σημεία διόδου αγγείων και νεύρων [30].

1.3. Μικροσκοπική δομή του οστίτη ιστού

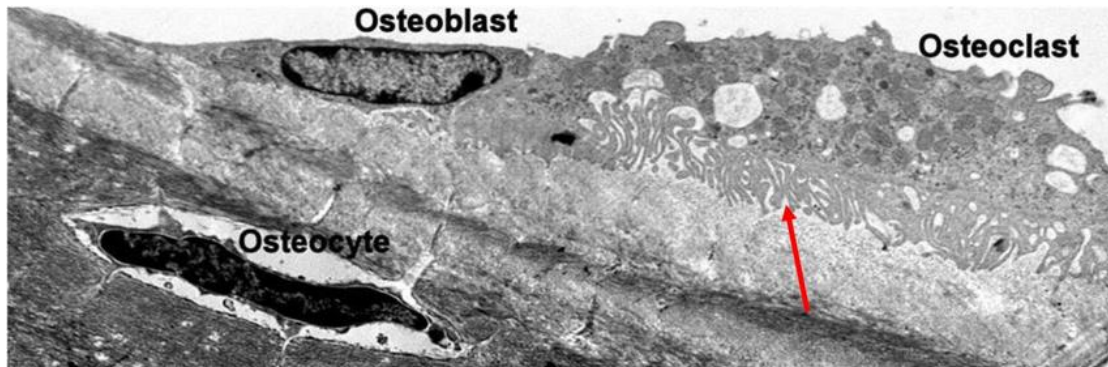
Τα βασικά κύτταρα του οστίτη ιστού είναι οι οστεοβλάστες, που προέρχονται από διαφοροποιημένα μεσεγχυματικά κύτταρα, τα οστεοκύτταρα τα οποία προκύπτουν από τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών καθώς και οι οστεοκλάστες, οι οποίες προέρχονται από πολυδύναμα κύτταρα του μυελού [4,18,21,22,24,29].

Σε ιστολογικές τομές οι οστεοβλάστες εντοπίζονται στο περίοστεο, στο ενδόστεο, καθώς και στις επιφάνειες του νεοσχηματιζόμενου οστίτη ιστού και ο λειτουργικός τους ρόλος είναι η παραγωγή οστεοειδούς (μη επιμεταλλωμένη οστέινη ουσία). Τα οστεοκύτταρα βρίσκονται στις οστικές κοιλότητες (lacunae) του οστού και επικοινωνούν μεταξύ τους με τις κυτταροπλασματικές τους αποφυάδες (canaliculi). Οι οστεοκλάστες είναι υπεύθυνες για την απορρόφηση του οστού και εντοπίζονται στα βοθρία του Howship (Howship lacunae) (Εικόνα 5, 6) [4,18,20,22-24,29].

Η διάμεση ουσία (μεσοκυττάρια θεμέλια ουσία) του οστίτη ιστού αποτελείται κυρίως από κολλαγόνες ίνες και ανόργανα άλατα υπό τη μορφή κρυστάλλων υδροξυαπατίτη [18,23,24,29].



Εικόνα 5. Αφαλατωμένο ιστολογικό παρασκεύασμα νεοσχηματιζόμενου οστίτη ιστού, κεχρωσμένο με τρίχρωμη ιστολογική χρώση Mallory, όπου οι κολλαγόνες ίνες χρωματίζονται κυανές, το κυτταρόπλασμα μωβ και οι πυρήνες μαύροι. Oe: οστεοκύτταρα στις οστικές κοιλότητες, Ocl: οστεοκλάστη στο βοθρίο του Howship, Ob: οστεοβλάστες στην ελεύθερη επιφάνεια του οστού, M: Μεσέγγυμα. (400X, Mallory trichrome) Πηγή: [29]

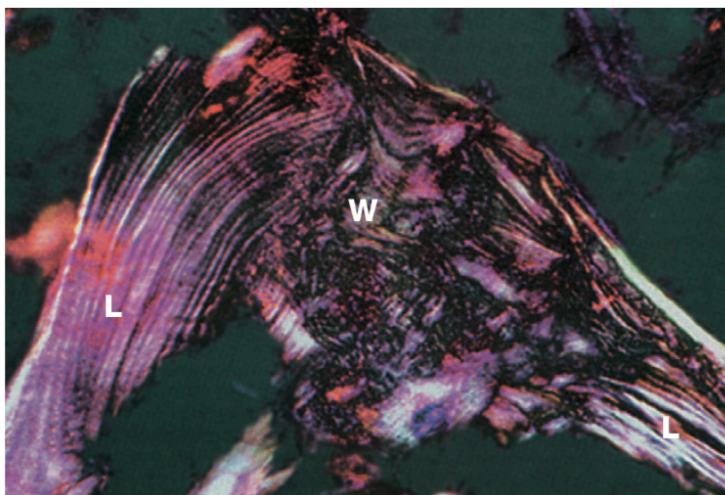


Εικόνα 6. Απεικόνιση ιστοτεμαχίου οστού με χρήση Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Διέλευσης (TEM). Απεικονίζονται ένα οστεοκύτταρο στην οστική κοιλότητα, μια οστεοβλάστη στην ελεύθερη επιφάνεια του οστού και μια οστεοκλάστη όπου είναι εμφανής η ραβδωτή παρυφή της (κόκκινο βέλος). Πηγή: [34]

Σε μικροσκοπικό επίπεδο ο οστίτης ιστός εμφανίζει δύο κύριους τύπους αρχιτεκτονικής οργάνωσης, τόσο στη φλοιώδη όσο και στη σπογγώδη μοίρα: τον δικτυωτό οστίτη ιστό (woven bone) και τον πεταλιώδη οστίτη ιστό (lamellar bone). (Εικόνα 7) [18,21,24,29].

Το δικτυωτό οστό χαρακτηρίζεται από την τυχαία οργάνωση των κολλαγόνων ινών, ενώ το πεταλιώδες οστό χαρακτηρίζεται από την οργάνωση της τιτανωμένης οστέινης ουσίας σε ομόκεντρα πετάλια και εμφανίζει τις κύριες δομικές μονάδες του οστίτη ιστού που ονομάζονται οστεώνες ή Αβέρσεια συστήματα (osteons /Havers systems)

[4,18,21,24,29]. Κάθε οστεώνας διαθέτει ένα κεντρικό σωλήνα (haversian canal) που περιέχει τα αρτηρίδια και τα νεύρα του ιστού και διακλαδίζεται με τους σωλήνες του Volkmann [18,20,21,23,35].



Εικόνα 7. Ιστολογικό παρασκεύασμα οστίτη ιστού. L: Πεταλιώδες οστό, W: Δικτυωτό οστό. Παρατήρηση σε πολωτικό μικροσκόπιο, χρώση Αιματοξυλίνη–Ηωσίνη (H&E). Πηγή: [22]

Εξωτερικά το οστό επικαλύπτεται από έναν κυτταροβριθή υμένα, το περίοστεο (periosteum), το οποίο τροφοδοτεί το οστό με τριχοειδή αγγεία και λειτουργικά κύτταρα, ενώ εσωτερικά επαλείφεται από το ενδόστεο που εμφανίζει παρόμοιες λειτουργικές ιδιότητες [18,19,21,29].

Στα επιμέρους υποκεφάλαια περιγράφονται αναλυτικά τα στοιχεία της μικροσκοπικής οργάνωσης του οστίτη ιστού, καθώς και η διαδικασία της οστεογένεσης, της τελείωσης και της ανακατασκευής του.

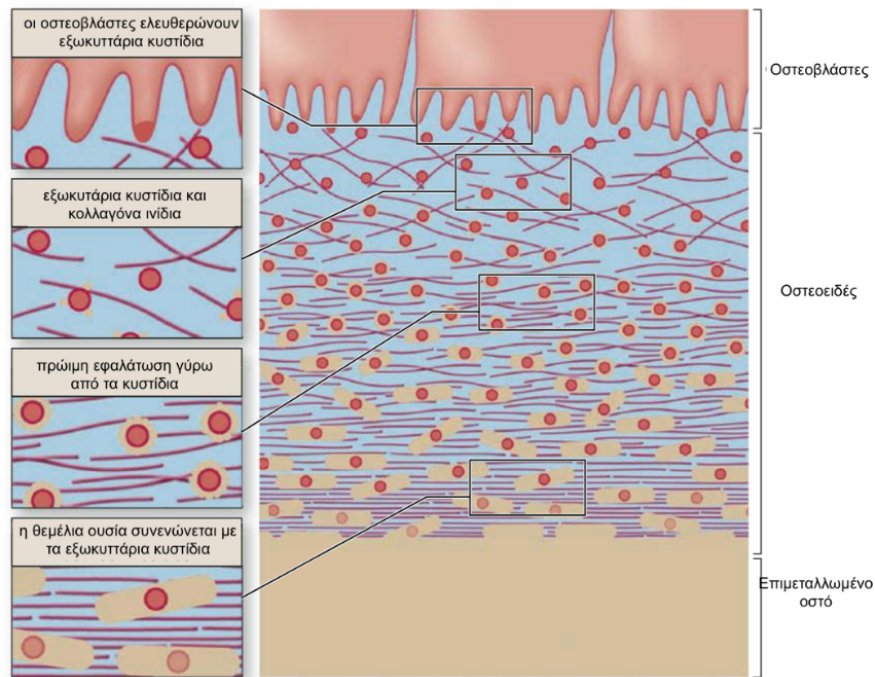
1.3.1. Οστεοβλάστες

Οι οστεοβλάστες προκύπτουν από πολυδύναμα μεσεγχυματικά προγονικά κύτταρα, από τα οποία προέρχονται επίσης οι χονδροβλάστες και οι ινοβλάστες [21]. Κατά τη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων σε οστεοβλάστες προκύπτει το ενδιάμεσο στάδιο των ελαφρώς διαφοροποιημένων οστεοπρογονικών κυττάρων ή οστεοπρογεννήτορες που συναντώνται στην εσωτερική στοιβάδα του περιόστεου, καθώς και στο ενδόστεο [18]. Τα κύτταρα αυτά δεν εμφανίζουν κάποια τυπική μορφολογική εικόνα, αλλά αναγνωρίζονται από την έκφραση μορίων επιφάνειας κατά τη διαφοροποίησή τους [21]. Η πρωτεΐνη που παίζει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων σε οστεοβλάστες, είναι η οστική

μορφογενετική πρωτεΐνη (bone morphogenetic protein-BMP) και απαντάται στη μεσοκυττάρια ουσία του οστίτη ιστού [21].

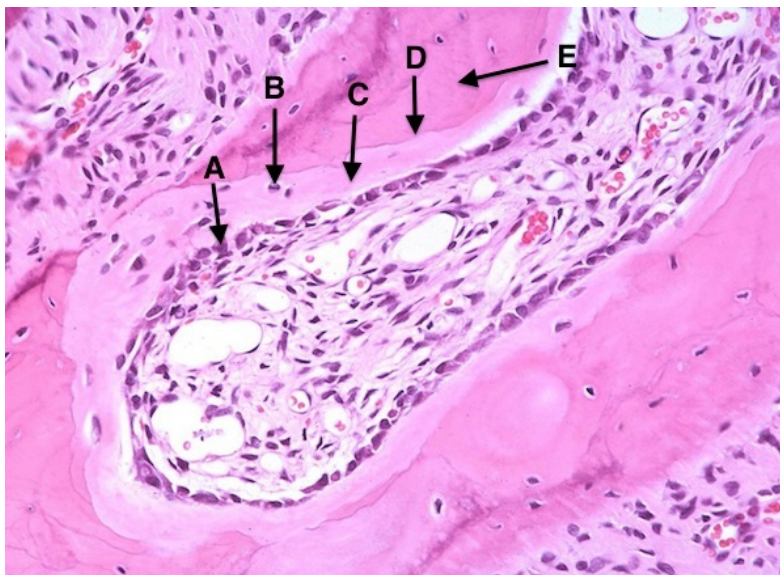
Οι οστεοβλάστες είναι υπεύθυνοι για την ενεργό παραγωγή της οστέινης ουσίας του οστίτη ιστού [18,21,23,29]. Παράγουν τα οργανικά στοιχεία της οστέινης ουσίας, όπως είναι οι κολλαγόνες ίνες τύπου I, οι πρωτεογλυκάνες και οι γλυκοπρωτεΐνες [21,29]. Η έκκριση αυτών των μορίων έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία ενός πλούσιου σε κολλαγόνο στρώματος (οστεοειδές) στο σημείο επαφής του κυττάρου με την διάμεση ουσία (Εικόνα 8, 9) [29].

Σημαντικός είναι ο ρόλος της εκκρινόμενης από τους οστεοβλάστες οστεοκαλσίνης, η οποία με τη συμμετοχή γλυκοπρωτεϊνών δεσμεύει ιόντα ασβεστίου (Ca^{2+}) και αυξάνει τη συγκέντρωσή τους τοπικά. Ακόμη, τα εκκρινόμενα από τους οστεοβλάστες κυστίδια που περιέχουν αλκαλική φωσφατάση (ALP), καθώς και άλλα ένζυμα που προκαλούν τοπικά αύξηση της συγκέντρωσης των φωσφορικών ιόντων (PO_4^{3-}), λειτουργούν ως «εστίες» ασβεστοποίησης της διάμεσης ουσίας με κύριο προϊόν τους κρυστάλλους υδροξυαπατίτη ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) [29].



Εικόνα 8. Σχηματική αναπαράσταση παραγωγής οστεοειδούς και οστέινης ουσίας από τις οστεοβλάστες. Πηγή: [29]

Τέλος, ο αναβολικός ρόλος των οστεοβλαστών συμπληρώνεται από την έκκριση διάφορων αυξητικών παραγόντων, όπως η σωματομεδίνη (IGF), ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (FGF) και πρωτεΐνες της οικογένειας του μετατρεπτικού αυξητικού παράγοντα β (TGF- β .) [21].



Εικόνα 9. Ιστολογικό παρασκεύασμα οστίτη ιστού. A: Οστεοβλάστες που σχηματίζουν μονόστιβο ψευδοεπιθήλιο στην επιφάνεια του νεοσχηματιζόμενου οστού, B: Οστεοκύτταρο, C: Οστεοειδές, D: Γραμμή οστεοποίησης, E: Διάμεση ουσία. Πηγή: [36]

Η ενεργοποίηση των οστεοβλαστών προκύπτει κατά τη διάρκεια της διάπλασης και της αύξησης των οστών, καθώς και σε περιπτώσεις όπου είναι απαραίτητη η ανακατασκευή του οστίτη ιστού, όπως κατά την προσαρμογή σε μηχανικές τάσεις, στην πόρωση καταγμάτων, σε παθολογικές καταστάσεις, κ.ά [18].

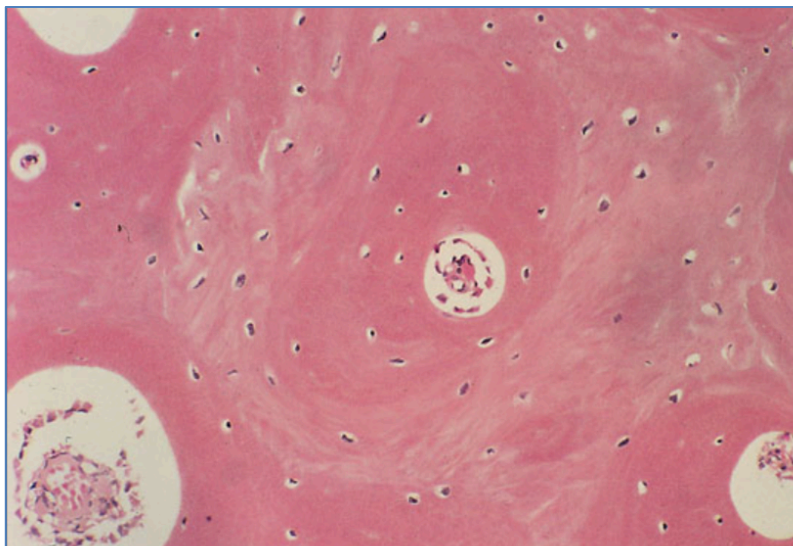
Οι ενεργοί οστεοβλάστες είναι κυβοειδή κύτταρα που, τυπικά, σχηματίζουν ένα μονόστιβο ψευδοεπιθήλιο στις επιφάνειες του αναπτυσσόμενου οστίτη ιστού [18,23,29]. Το κυτταρόπλασμά τους είναι έντονα βασίφιλο⁴ και εμφανίζουν πολικότητα, με το ανεπτυγμένο κοκκώδες ενδοπλασματικό δικτυωτό και τη συσκευή Golgi να βρίσκονται κοντά στην εκκριτική επιφάνεια (εφαπτόμενη στη μεσοκυττάρια οστέινη ουσία), ενώ ο έκκεντρος και σχετικά σφαιρικός πυρήνας βρίσκεται στον αντίθετο πόλο του κυττάρου [18,21]. Τέλος, οι ενεργοί οστεοβλάστες δεν εμφανίζουν μιτωτική δραστηριότητα [23].

⁴ Εξαιτίας του ανεπτυγμένου κοκκώδους ενδοπλασματικού δικτυωτού.

Όταν η συνθετική τους δραστηριότητα έχει ολοκληρωθεί, οι οστεοβλάστες αποπλατύνονται και το κυτταρόπλασμά τους γίνεται λιγότερο βασίφιλο, καθώς το κοκκώδες ενδοπλασματικό δικτυωτό και η συσκευή Golgi εμφανίζουν ένα λιγότερο εκτεταμένο δίκτυο [18,21,29], ενώ η χρωματίνη του πυρήνα τους εμφανίζεται περισσότερο συμπυκνωμένη [18,29]. Ορισμένοι από αυτούς διαφοροποιούνται σε οστεοκύτταρα και παραμένουν στην οστέινη ουσία που έχουν παραγάγει [18,29], ενώ οι περισσότεροι αποπίπτουν [29]. Άλλοι οστεοβλάστες διαφοροποιούνται σε επενδυματικά κύτταρα (bone lining cells), τα οποία αποτελούν αποπλατυσμένα κύτταρα που συναντώνται στη μεσοκυττάρια ουσία του οστίτη ιστού των ενηλίκων και μπορούν να επανενεργοποιηθούν σε παραγωγικούς οστεοβλάστες έπειτα από κατάλληλο ερέθισμα [21,29].

1.3.2. Οστεοκύτταρα

Τα οστεοκύτταρα προέρχονται από οστεοβλάστες, οι οποίοι περιβάλλονται από την οστέινη ουσία που οι ίδιοι παράγουν και καταλαμβάνουν πλήρως και μεμονωμένα τις οστικές κοιλότητες (lacunae) της μεσοκυττάριας ουσίας (Εικόνα 10) [4,18,21,29]. Συχνά, συναντώνται οστεοκύτταρα που περιβάλλονται από άμορφο υλικό και κολλαγόνες ίνες στο χώρο των οστικών κοιλοτήτων [23].

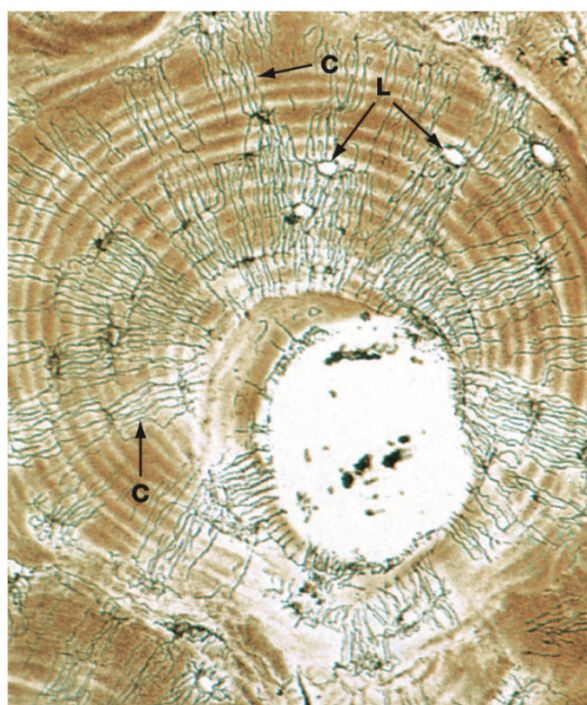


Εικόνα 10. Ιστολογικό παρασκεύασμα αφαιρωμένης τομής συμπαγούς οστίτη ιστού σκύλου. Διακρίνονται τα οστεοκύτταρα στις οστικές τους κοιλότητες, περιμετρικά του σωλήνα του Havers. (H&E, X250) Πηγή: [20]

Το σχήμα και το μέγεθος των οστεοκυττάρων ποικίλει αν και συνήθως εμφανίζεται ωοειδές [18,23]. Τα κύτταρα αυτά αναπτύσσουν λεπτές κυτταροπλασματικές αποφυάδες που περικλείονται από τα οστικά σωληνάρια και μέσω χασματοσυνδέσεων (gap junctions) επικοινωνούν με τα γειτονικά οστεοκύτταρα [4,18,20,21,23,29], καθώς και με τους γειτονικούς οστεοβλάστες (Εικόνα 11) [23,29].

Οι κυτταροπλασματικές αποφυάδες των οστεοκυττάρων γειτνιάζουν με τα αιμοφόρα αγγεία των οστικών σωληνάρων και ανταλλάσσουν προϊόντα μεταβολισμού και ορμόνες μέσω της διάχυσης στο διάμεσο υγρό [18,29]. Ακόμη, η ικανότητα της αυξομείωσης του μήκους των αποφυάδων, πιθανόν να λειτουργεί σαν αντλία με σκοπό τη μετακίνηση των μεταβολιτών από την επιφάνεια του οστού προς τα οστεοκύτταρα των οστικών κοιλοτήτων, δια μέσου των οστικών σωληνάρων [21].

Αυτό το ανεπτυγμένο δίκτυο οστικών σωληνάρων/κοιλοτήτων, των εκτεταμένων οστεοκυτταρικών συνδέσεων και της επικοινωνίας τους με τα υπόλοιπα κύτταρα του οστίτη ιστού, καθιστούν τα οστεοκύτταρα ικανά να ανιχνεύουν μικροβλάβες του ιστού και να προκαλούν την ενεργοποίηση των επιδιορθωτικών μηχανισμών των οστεοκλαστών και των οστεοβλαστών [4,20,29].



Εικόνα 11. Ιστολογικό, μη κερωσμένο παρασκεύασμα, εφαλατωμένης τομής οστού. Απεικονίζεται ένας οστεώνας με τον κεντρικό σωλήνα του Havers και τα ομόκεντρα οστίνα πετάλια. L: οστικές κοιλοότητες, C: Οστικά σωληνάρια δια μέσου των οποίων πορεύονται οι κυτταροπλασματικές αποφυάδες των οστεοκυττάρων. Πηγή: [22]

Σε τοπικό επίπεδο, τα οστεοκύτταρα είναι ικανά να προκαλούν οστεολυσία της οστικής κοιλότητας που τα περιβάλλει, κατά 1 μm (οστεοκυτταρική οστεολυσία), ενώ κατά την απόπτωσή τους ενεργοποιούνται σηματοδοτικά μονοπάτια με αποτέλεσμα να προσελκύνονται οστεοκλάστες για την απορρόφηση του οστού της περιοχής. Ως εκ τούτου, φαίνεται πως ο ρόλος τους είναι σημαντικός στην ανακατασκευή του οστίτη ιστού [21,29].

Τα οστεοκύτταρα παίζουν ακόμη ρόλο στην ομοιοστασία του ασβεστίου στον οργανισμό κινητοποιώντας, επικουρικά με τους οστεοκλάστες, το ασβέστιο από τον οστίτη ιστό προς τη συστηματική κυκλοφορία [18,21].

1.3.3. Οστεοκλάστες

Οι οστεοκλάστες προέρχονται από πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα του μυελού των οστών, τα οποία διαφοροποιούνται επίσης σε μονοκύτταρα και μακροφάγα του αίματος [21,37]. Ειδικότερα, οι οστεοκλάστες προκύπτουν από τη συγχώνευση των κυκλοφορούντων μονοκυττάρων [21,24,29] και συναντώνται στις περιοχές ανακατασκευής του οστού [20,21]. Σε αυτές τις περιοχές, που συνήθως βρίσκονται στην ελεύθερη επιφάνεια του οστού, δημιουργείται, εξαιτίας της απορρόφησής τους από τις οστεοκλάστες, μια κοιλότητα που ονομάζεται βοθρίο του Howship, όπου και ανευρίσκονται τα εν λόγω κύτταρα [18,20,21,23,24,29].

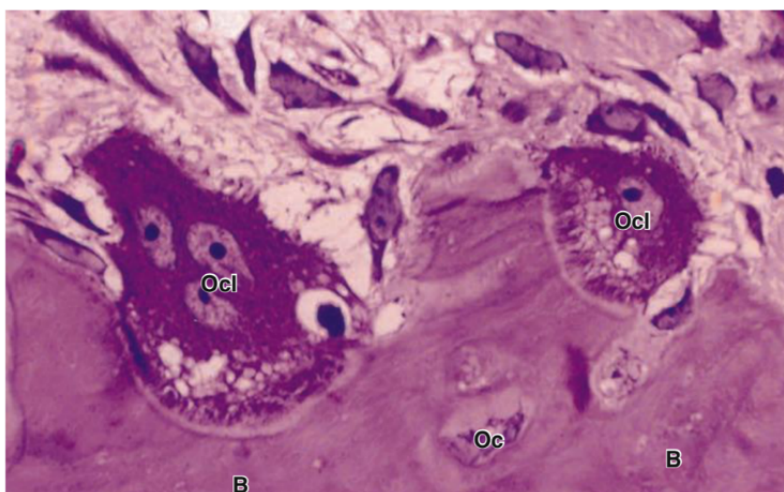
Το μέγεθος των οστεοκλεαστών ποικίλει, ωστόσο εμφανίζεται μεγαλύτερο από τα υπόλοιπα κύτταρα που απαντώνται στον οστίτη ιστό, με διάμετρο που φτάνει ως τα 100 μm . Οι οστεοκλάστες διαθέτουν πολλούς πυρήνες, ο αριθμός των οποίων ποικίλει, με διαφορετικές εκτιμήσεις από τους συγγραφείς και πάντως με κατώτερο όριο τους 2 και ανώτερο τους 100 πυρήνες ανά κύτταρο [18,21,23,24]. Απαντώνται επίσης μονοκύτταρες οστεοκλάστες, οι οποίες δεν αναγνωρίζονται εύκολα, ενώ είναι συχνή η εντόπισή τους στον οστίτη ιστό των ιχθύων [21,23]. Το κυτταρόπλασμα τους εμφανίζεται ελαφρώς βασίφιλο στις πρώιμες οστεοκλάστες [18,24] και οξύφιλο στις ώριμες που εμφανίζουν αυξημένη κυτταρική λειτουργία, όπου συναντώνται πολλαπλές συσκευές Golgi, πολυάριθμα μιτοχόνδρια και λυσοσώματα [18,21,24].

Σημαντική για τη λειτουργία τους είναι η μορφολογία της κυτταρικής τους μεμβράνης στο σημείο επαφής της με την τιτανωμένη οστέινη ουσία. Στο σημείο αυτό, όπου λαμβάνει χώρα η αποδόμηση και η απορρόφηση της οστέινης ουσίας από τις οστεοκλάστες, η κυτταρική τους μεμβράνη εμφανίζει έντονες, λεπτές πτυχώσεις που

παρεισφρέουν στην επιφάνεια του επιμεταλλωμένου οστού και ονομάζεται ραβδωτή παρυφή [18,21,23,24,29]. Η ραβδωτή παρυφή περιβάλλεται από μια κυτταροπλασματική περιοχή που ονομάζεται διαυγής ζώνη ή ζώνη σφράγισης, η οποία εξασφαλίζει τη στενή σύνδεση της οστεοκλάστης με την οστέινη ουσία [24,29]. Το κυτταρόπλασμα έσω της ραβδωτής παρυφής παρουσιάζεται κενοτοπιώδες δίνοντας στην περιοχή αυτή μια αφρώδη όψη (Εικόνα 12) [24].

Όπως αναφέρθηκε, η αποδόμηση της τιτανωμένης οστέινης ουσίας λαμβάνει χώρα στην περιοχή της ραβδωτής παρυφής με την παρακείμενη διαυγή ζώνη. Στη λειτουργία αυτή πιστεύεται ότι παίζει ρόλο η κίνηση των κυτταροπλασματικών προσεκβολών οι οποίες συμβάλλουν στη διάλυση των αλάτων (κυρίως του υδροξυαπατίτη) [24]. Ακόμη, κύριο ρόλο, στη διάλυσή τους παίζουν και οι αντλίες πρωτονίων των οστεοκλαστών που απελευθερώνουν ιόντα υδρογόνου (H^+) και δημιουργούν ένα όξινο μικροπεριβάλλον στην περιοχή απορρόφησης της οστέινης ουσίας [29,38].

Όσον αφορά την αποδόμηση της οργανικής ουσίας στην περιοχή απορρόφησης του οστίτη ιστού επιτυγχάνεται με την έκκριση υδρολυτικών ενζύμων τα οποία αποδομούν το κολλαγόνο και τις πρωτεΐνες της διάμεσης θεμέλιας ουσίας [18,21,23,24,29]. Μελέτες έχουν δείξει ότι ελευθερώνονται λυσοσωματικά εξοκυτταρικά κυστίδια όξινου περιεχομένου (pH 4,7) που συμβάλλουν στη μείωση του pH της περιοχής απελευθερώνοντας λυσοσωματικά ένζυμα [29,37,38] όπως πρωτεάσες κυστεΐνης (κυρίως η καθεψίνη K) [23,37,38], μεταλλοπρωτεΐνάσες [29] και όξινη φωσφατάση [23].



Εικόνα 12. Ιστολογικό παρασκεύασμα αφαλατωμένης τομής οστίτη ιστού. Διακρίνονται δύο οστεοκλάστες (Ocl) στο βοθρίο του Howship που έχει δημιουργηθεί από την απορρόφηση του οστού, ένα οστεοκύτταρο (Oc), καθώς και διάμεση ουσία του οστού (B). Είναι ευδιάκριτοι οι πυρήνες των οστεοκλαστών, η ραβδωτή παρυφή τους και η

διαυγής ζώνη στο σημείο σύνδεσης του κυττάρου με την οστέινη ουσία, καθώς και οι κενοτοπιώδεις περιοχές έσω της ραβδωτής παρυφής (X400, H&E). Πηγή [29]

Η λειτουργία των οστεοκλαστών ενεργοποιείται από πολλούς παράγοντες. Συγκεκριμένα, ενεργοποιείται από το διεγερτικό παράγοντα αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (M-CSF), το σύστημα receptor activator of nuclear factor-κB ligand (RANKL) [21,29,37,39], την παραθορμόνη (PTH) [21,24], από την υπερβιταμίνωση D και A, τις προσταγλανδίνες τύπου E και τον παράγοντα δραστηριοποίησης των οστεοκλαστών που είναι μια λεμφοκίνη [24,38].

Η καταστολή της λειτουργίας τους ρυθμίζεται επίσης από πολλούς παράγοντες, οι κυριότεροι από τους οποίους είναι η καλσιτονίνη και η οστεοπροτεγερίνη (OPG), η οποία παράγεται από τους οστεοβλάστες, ανταγωνίζεται το RANKL και επομένως περιορίζει τη λειτουργία αλλά και το σχηματισμό νέων οστεοκλαστών [21,37,39]. Τα στεροειδή των γονάδων επηρεάζουν, επίσης τη λειτουργία των οστεοκλαστών [21].

Τέλος, μετά την ολοκλήρωση της λειτουργίας τους, οι οστεοκλάστες οδηγούνται σε απόπτωση [21].

1.3.4. Διάμεση θεμέλια ουσία

Η μεσοκυττάρια ουσία του οστίτη ιστού αποτελείται από οργανική ουσία (οστεοειδές) και από ανόργανα άλατα [18,24,29]. Η οργανική ουσία αποτελείται κατά 90% από κολλαγόνες ίνες τύπου I και για το λόγο αυτό η μεσοκυττάρια ουσία εμφανίζεται οξύφιλη⁵ σε αφαιρωμένες ιστολογικές τομές (Εικόνα 13) [18,29], ενώ εντοπίζονται και στοιχεία κολλαγόνου τύπου III, V και X [21]. Επιπλέον, στην οργανική ουσία απαντάται η άμορφη θεμελιακή ουσία που περιέχει πρωτεογλυκάνες συνδεδεμένες μεθειϊκές γλυκοζαμινογλυκάνες (θειϊκή χονδροϊτίνη, θειϊκή κερατάνη, υαλουρονικό οξύ και γλυκοπρωτεΐνες) [21,23,24,29]. Ακόμη, συναντώνται πρωτεΐνες ορού και λιπίδια (κυρίως φωσφολιπίδια) [23].

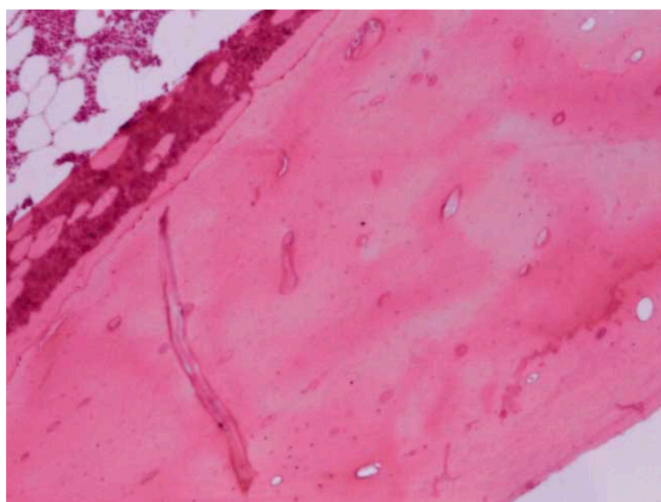
Τα κολλαγόνα ινίδια του οστίτη ιστού συντίθενται από τις οστεοβλάστες [21,24]. Στη συνέχεια, οργανώνονται σε κολλαγόνες ίνες και δέσμες κολλαγόνου, οι οποίες είναι ορατές στο οπτικό μικροσκόπιο και διατάσσονται στην οστέινη ουσία με ειδικό και καθορισμένο τρόπο προσδίδοντας χαρακτηριστική μικροαρχιτεκτονική οργάνωση

⁵ Χρωματίζεται ροζ απορροφώντας την ηωσίνη σε ιστολογικές τομές κεχρωσμένες με αιματοξυλίνη-ηωσίνη.

σε κάθε είδος οστού [18,21,23,24]. Οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες, όπως η αντοχή τους στα οξέα, διαφέρουν από εκείνες των κολλαγόνων ινιδίων τύπου I του συνδετικού ιστού και τους προσδίδουν αυξημένη ανθεκτικότητα [18,23].

Όσον αφορά τις πρωτεΐνες της θεμέλιας ουσίας, μελέτες με χρήση τεχνικών ηλεκτρονικής μικροσκοπίας έχουν δείξει ότι οι πρωτεογλυκάνες συνδέονται περιοδικά σε σημεία πρόσφυσης της επιφάνειας των κολλαγόνων ινών και ενδεχομένως να δρουν ως αναστολείς της τιτάνωσης της οστέινης ουσίας, μη επιτρέποντας την προσκόλληση του ασβεστίου και του φωσφόρου στα κολλαγόνα ινίδια [23,40]. Πράγματι, η τιτάνωση της οστέινης ουσίας συνοδεύεται από αποδόμηση των συνδεδεμένων πρωτεογλυκανών [23].

Οι κυριότερες γλυκοπρωτεΐνες που συναντώνται στη θεμέλια ουσία του οστίτη ιστού είναι η οστική σιαλοπρωτεΐνη, η οστεοκαλσίνη, η οστεοποντίνη και η οστεονεκτίνη [21,23,40]. Η οστική σιαλοπρωτεΐνη σχετίζεται με τη διαδικασία τιτάνωσης του οστού και διαθέτει ισχυρή ικανότητα πρόσδεσης με τα ιόντα ασβεστίου [40]. Η οστεοποντίνη παράγεται στα τελευταία στάδια ωρίμανσης των οστεοβλαστών και η λειτουργία της σχετίζεται με την έναρξη της τιτάνωσης της οστέινης ουσίας [40]. Η οστεονεκτίνη προσδένεται στα ιόντα ασβεστίου και στις ίνες κολλαγόνου, προάγοντας το σχηματισμό των πρώτων πυρήνων υδροξυαπατίτη [23,40]. Η οστεοκαλσίνη διαθέτει επίσης ισχυρή ικανότητα πρόσδεσης με τα ιόντα ασβεστίου και η δραστηριότητα της σχετίζεται με την έναρξη της ανακατασκευής του οστίτη ιστού, ρυθμίζοντας την λειτουργία των οστεοκλαστών [21,40].



Εικόνα 13. Ιστολογικό παρασκεύασμα οστίτη ιστού γάτας. Παρατηρείται η οξύφιλη διάμεση ουσία κεχρωσμένη με ηωσίνη. (X40, H&E) Πηγή: [3]

Τα ανόργανα άλατα αποτελούν περίπου τα 2/3 του ξηρού βάρους της μεσοκυττάριας ουσίας με τους μικροσκοπικούς κρυστάλλους υδροξυαπατίτη (ένωση φωσφορικών με ασβέστιο) με χημικό τύπο: $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ να είναι το κύριο άλας των οστών [18,19,23,24]. Οι κρύσταλλοι αυτοί αναπτύσσονται κατά μήκος των κολλαγόνων ινιδίων, η διάταξη των οποίων καθορίζει τη διάταξη και τη λεπτή αρχιτεκτονική του τιτανωμένου οστίτη ιστού, και προσδίδουν στον ιστό τη χαρακτηριστική του σκληρότητα [18,21,23,24].

Για την εναπόθεση των αλάτων στον ιστό και την τιάνωσή του παίζουν κυρίαρχο ρόλο αρχικά οι οστεοβλάστες, με τα κυστίδια της μεσοκυττάριας ουσίας που περιέχουν γλυκοπρωτεΐνες και λιπίδια, καθώς και τα οστεοκύτταρα και οι πρωτεΐνες του ορού σε μεταγενέστερο στάδιο [23,24]. Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την πορεία της τιάνωσης του οστεοειδούς είναι το είδος του ζώου, το είδος του οστού, η ηλικία, το είδος διατροφής και η κληρονομικότητα [23,24].

Επιπλέον των αλάτων του υδροξυαπατίτη, ο οστίτης ιστός περιέχει μη κρυσταλλωμένες μορφές φωσφορικού ασβεστίου, ανθρακικά ιόντα και ιόντα φθορίου σε μορφή φθοριοαπατίτη, μαγνήσιο και νάτριο [21,23,24,29]. Ακόμη, ο ψευδάργυρος έχει τη δυνατότητα να αποθηκεύεται στα οστά κατά τη διάρκεια της εφάλατωσης του οστεοειδούς [24]. Τέλος, το πυρίτιο φαίνεται να συμβάλει στη σωστή ανάπτυξη των οστών προσδίδοντάς τους επιπλέον ανθεκτικότητα [23].

Τα άλατα της οστέινης ουσίας, εκτός από τη χαρακτηριστική σκληρότητα που προσδίδουν στον ιστό, όπως αναφέρθηκε, αποτελούν παρακαταθήκες ιόντων τα οποία κινητοποιούνται προς τη γενική κυκλοφορία ρυθμίζοντας με αυτόν τον τρόπο την ομοιοστασία του ασβεστίου και του φωσφόρου στον οργανισμό [21,23,29].

1.3.5. Αιμάτωση και νεύρωση

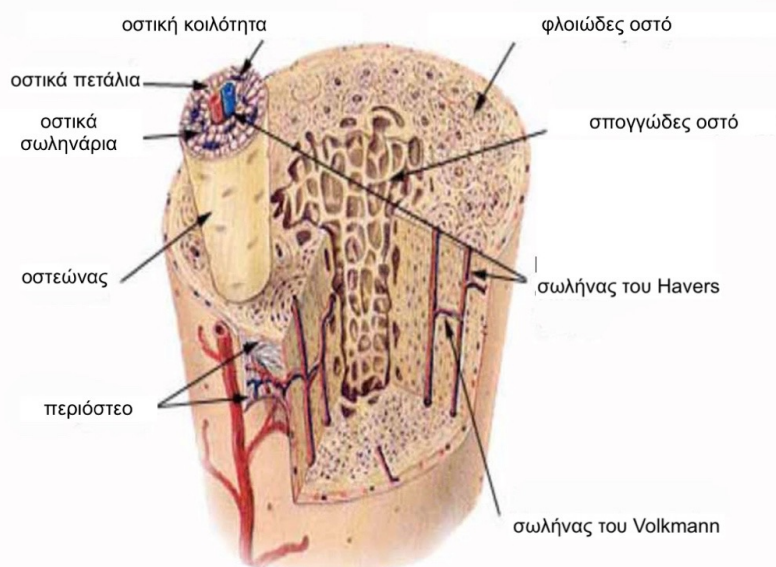
Τα κύτταρα του οστίτη ιστού δεν έχουν τη δυνατότητα ανταλλαγής μεταβολικών προϊόντων μέσω της διάχυσης, εξαιτίας της τιάνωσης της μεσοκυττάριας ουσίας [18,21]. Η ανταλλαγή αυτή επιτυγχάνεται μέσω του δικτύου των οστικών σωληνάρων που επιτρέπουν τη μεταξύ τους επικοινωνία, καθώς και με τα αγγεία της εξωτερικής επιφάνειας του οστού, τα αιμοφόρα αγγεία των σωληνών του Havers και τις μυελοκυψέλες του σπογγώδους οστού [18,21,23].

Στα μακρά οστά, καθώς και σε αρκετά πλατέα και ακανόνιστα οστά η βασική αιμάτωση εξασφαλίζεται από την τροφοφόρο αρτηρία, η οποία εισέρχεται στο

συμπαγές οστό διαμέσου του ομώνυμου τρήματος και φτάνει ως τη μυελική κοιλότητα, όπου διχάζεται σε δύο κεντρικούς κλάδους και αυτοί με τη σειρά τους σε μικρότερα αρτηρίδια που τροφοδοτούν το συμπαγές και το σπογγώδες οστό [19]. Τα παραπάνω αγγεία εισέρχονται στους σωλήνες του Havers των διαφύσεων των μακρών οστών και επικοινωνούν με τους εγκάρσιους προς αυτούς σωλήνες του Volkmann [18,20]. Οι περιοστικές αρτηρίες τροφοδοτούν επίσης τον οστικό φλοιό διαμέσου των σωλήνων του Volkmann και αναστομώνονται με τους μικρούς κλάδους της τροφοφόρου αρτηρίας στα σημεία τομής τους με τους σωλήνες του Havers (Εικόνα 14) [18-20]. Οι επιφύσεις και οι μεταφύσεις των μακρών οστών τροφοδοτούνται από τις ομώνυμες αρτηρίες [35].

Ο μυελός των οστών διαθέτει πλούσια αιμάτωση και ένα εκτεταμένο δίκτυο κολποειδών αγγείων, που χαρακτηρίζονται από το ασυνεχές τους ενδοθήλιο και τη βασική τους μεμβράνη που μπορεί να έχει ασυνέχειες ή να απουσιάζει εντελώς, έτσι ώστε να διευκολύνεται η παροχέτευση των κυτταρικών στοιχείων [41].

Το φλεβικό σύστημα των οστών προκύπτει από τη συνένωση των φλεβωδών κολποειδών που πορεύονται είτε στο περιοστικό φλεβικό δίκτυο, είτε στις τροφοφόρες φλέβες που εξέρχονται από το οστό διαμέσου των αγγειακών τρημάτων [41].



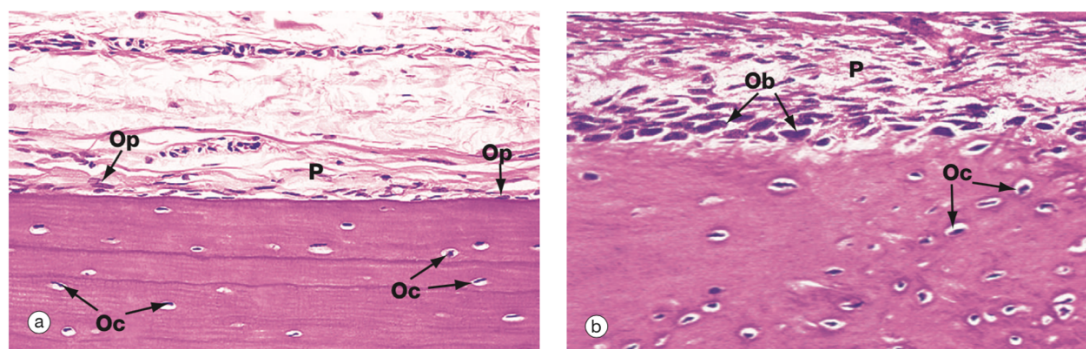
Εικόνα 14. Σχηματική απεικόνιση της αιμάτωσης του οστού. Πηγή: [42]

Στα πλατέα οστά φαίνεται πως η αρχιτεκτονική δομή του αγγειακού δικτύου εξαρτάται από το πάχος του ιστού, με τα παχύτερα οστά να μιμούνται τη μορφολογία της αγγείωσης των μακρών οστών, ενώ τα λεπτότερα να μη διαθέτουν πραγματικό αγγειακό δίκτυο και να αιματώνονται από τα αρτηρίδια του περιόστεου [35].

Τα νεύρα των οστών είναι κυρίως αισθητικά και λειτουργούν ως αμυντικός μηχανισμός σε περίπτωση βλάβης και τραυματισμού. Ακόμη, οι κεντρομόλες και οι συμπαθητικές νευρικές ίνες των οστών φαίνεται ότι διαθέτουν ρυθμιστική δράση στα αγγεία του μυελού [19].

1.3.6. Περίοστεο και ενδόστεο

Οι εξωτερικές και οι εσωτερικές ελεύθερες επιφάνειες των οστών καλύπτονται από συνδετικό ιστό, το περίοστεο και το ενδόστεο αντίστοιχα [18,19,29]. Το περίοστεο μακροσκοπικά εμφανίζεται ως ένας υπόλευκος υμένας, πάχους 1-3 mm, που περιβάλλει το οστό με εξαίρεση τις αρθρικές επιφάνειές του [18]. Παρεμβάλλεται μεταξύ των μυών και των οστών και αναμιγνύεται ελαφρώς με τους τένοντες και τους συνδέσμους στα σημεία πρόσφυσής τους στα οστά. Στα νωπά οστά είναι σχετικά εύκολη η αφαίρεσή του, ιδιαίτερα στα σημεία όπου δεν προσφύονται τένοντες ή σύνδεσμοι [19].



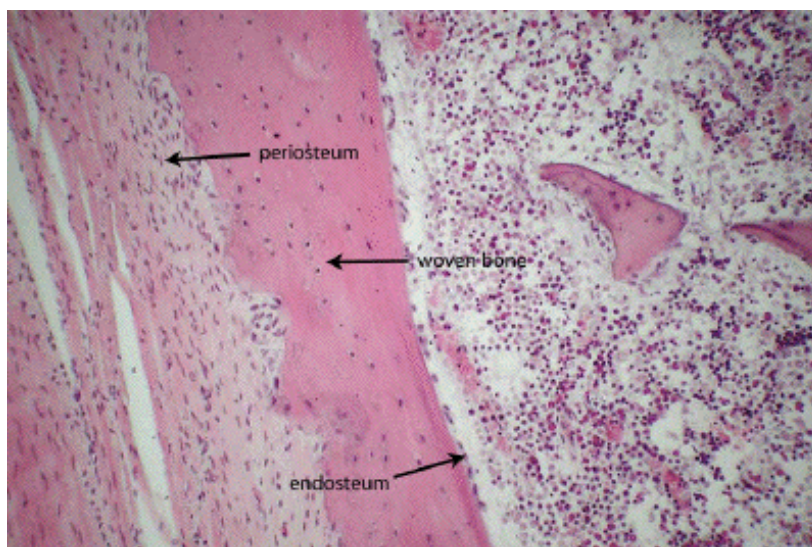
Εικόνα 15. Ιστολογικά παρασκευάσματα αφαιρωμένου οστίτη ιστού. Αριστερά: Ανενεργό περίοστεο (P). Εντοπίζονται οι οστεοπρογενήτορες (Op) στην οστεογόνο στοιβάδα. Δεξιά: Περίοστεο σε ενεργή φάση. Εντοπίζονται οστεοβλάστες (Ob) στην οστεογόνο στοιβάδα του που εναποθέτουν οστεοειδές. (Oc) Οστεοκύτταρα στις οστικές κοιλότητες. (H&E) Πηγή: [22]

Η μικροσκοπική οργάνωση του περίοστεου αφορά δύο στοιβάδες, την εξωτερική ή ινώδη που αποτελείται από πυκνό συνδετικό ιστό με φτωχή κυτταροβρίθεια, υψηλή αγγείωση και νεύρωση και την εσωτερική στοιβάδα που περιέχει οστεογόνα κύτταρα και ελαστικές ίνες [4,18,20,21,29]. Οι ίνες κολλαγόνου του περίοστεου λέγονται ίνες του Sharpey και εισχωρούν στον οστίτη ιστό προσκολλώντας με αυτόν τον τρόπο το περίοστεο στην επιφάνεια του οστού [4,21,29]. Η εσωτερική ή οστεογόνος στοιβάδα του περίοστεου διαθέτει μεγαλύτερη κυτταροβρίθεια και τα κύτταρα που συναντώνται είναι οι οστεοπρογενήτορες και οι οστεοβλάστες [4,29].

Η μορφολογία και ο πληθυσμός των κυττάρων της εσωτερικής στοιβάδας εξαρτώνται από τη λειτουργία τους [4,18]. Έτσι, κατά τη διάρκεια της διάπλασης των οστών ή σε περίπτωση βλάβης του ιστού οι αποπλατυσμένοι οστεοπρογενήτορες εμφανίζουν μεγάλη μιτωτική δραστηριότητα και διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες, οι οποίοι σχηματίζουν ένα πολύστοιβο κυβικό ψευδοεπιθήλιο και εκκρίνουν οστεοειδές (Εικόνα 15) [4,18]. Στα τελειωμένα οστά η εσωτερική στοιβάδα του περιόστεου αποτελείται από έναν ασυνεχή στίχο αποπλατυσμένων κυττάρων [18].

Το ενδόστεο καλύπτει τις κοιλότητες της σπογγώδους ουσίας καθώς και τους σωλήνες του Havers (Εικόνα 16) [18,19]. Εμφανίζει παρόμοια μικροσκοπική εικόνα με το περίοστεο, διαθέτει οστεοπρογενήτορες, οστεοβλάστες, επενδυματικά κύτταρα, οστεοκλάστες και μεσοκυττάρια ουσία με κολλαγόνα ινίδια, άλλα έχει μικρότερο πάχος και απλούστερη δομή [4,20,21,29]. Το ενδόστεο στα οστά των ενηλίκων φαίνεται να εισχωρεί στην οστέινη ουσία μέσω των καναλιών του Volkmann [4,21].

Από λειτουργικής πλευράς το ενδόστεο διαθέτει τις ίδιες ιδιότητες με το περίοστεο, που είναι κυρίως η διάπλαση, η αύξηση και η ανάπλαση των οστών [18], καθώς και η διατήρηση της ομοιοστασίας του ασβεστίου και του φωσφόρου στο αίμα [21].



Εικόνα 16. Ιστολογικό παρασκευάσμα νεοσχηματιζόμενου οστίτη ιστού. Διακρίνεται το δικτυωτό οστό (woven bone), το περίοστεο (periosteum) και το ενδόστεο (endosteum) παραπλεύρως του πρωτογενή μυελοχώρου (δεξιά). (H&E) Πηγή: [43]

Παρόλη την ομοιότητα τους, διαφορετικοί παράγοντες επηρεάζουν τη λειτουργία τους και την επίδρασή τους στη διαμόρφωση του οστίτη ιστού. Για παράδειγμα, οι μηχανικές τάσεις που δέχεται το περίοστεο έχουν ως αποτέλεσμα την εξ αυτού έναρξη της ανακατασκευής του οστίτη ιστού για την αναπροσαρμογή του οστού στις νέες

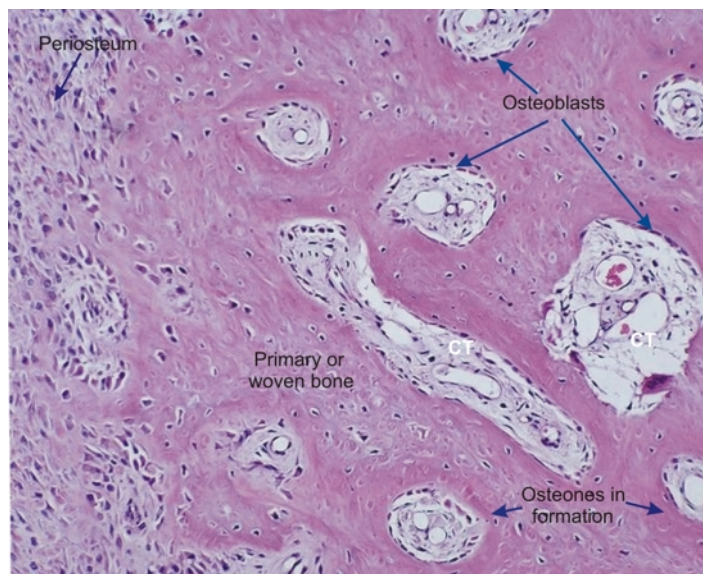
συνθήκες, ενώ φαίνεται πως δεν επηρεάζουν τη λειτουργία του ενδόστεου [4]. Ακόμη, φαίνεται πως οι ορμόνες του φύλου επηρεάζουν με διαφορετικό τρόπο τη λειτουργία των δύο ιστών, με τα ανδρογόνα να επηρεάζουν θετικά εκείνη του περιόστεου και τα οιστρογόνα αρνητικά, ενώ όσον αφορά το ενδόστεο, η λειτουργία του επηρεάζεται θετικά από τα οιστρογόνα στην εφηβεία, ενώ έχει αρνητική ρύθμιση η μείωση των επιπέδων τους στον ορό του αίματος [4].

1.4. Αρχιτεκτονική οργάνωση του οστίτη ιστού

Η αρχιτεκτονική οργάνωση του συμπαγούς οστίτη ιστού εξαρτάται από το είδος του οστού καθώς και από το είδος του θηλαστικού και την ηλικία του [4,24].

Η διάταξη των κολλαγόνων ινών στη μεσοκυττάρια ουσία είναι αυτή που καθορίζει τη μορφή του οστίτη ιστού με τις επικρατούσες μορφές να είναι η δικτυωτή ή ινώδης μορφή και η πεταλιώδης μορφή [18,21,23]. Ακόμη, στους μεγάλωσους σκύλους και στα παραγωγικά ζώα παρατηρείται το ελασματοειδές οστό (laminar bone) που προκύπτει από το περίοστεο [24], καθώς και συνδυασμός δικτυωτού και πεταλιώδους οστού που καλείται ινοπεταλιώδες (fibrolamellar bone) [4,23].

Το δικτυωτό οστό (πρωτογενής οστίτης ιστός) απαντάται κατά τη διάρκεια της διάπλασης των οστών, της πώρωσης των καταγμάτων και σε ορισμένους τύπους καρκίνου [4,18,21]. Σχηματίζεται με γρήγορο ρυθμό και συνήθως αντικαθίσταται από πεταλιώδες οστό έκτος από ορισμένες περιοχές όπου παραμένει, όπως στις ραφές του κρανίου και στα σημεία πρόσφυσης τενόντων [29].



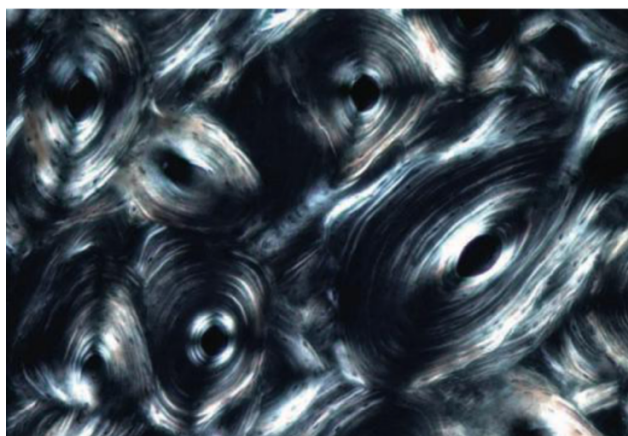
Εικόνα 17. Ιστολογικό παρασκεύασμα δικτυωτού οστίτη ιστού αναπτυσσόμενου σκύλου. Παρατηρείται η τυχαία διάταξη των κολλαγόνων ινών, καθώς και περιοχές νεοσχηματιζόμενων οστεώνων από τους οστεοβλάστες της περιφέρειάς τους. Ακόμη, παρατηρείται μεγάλος αριθμός οστεοκυττάρων στις οστικές τους κοιλότητες, καθώς και το ενεργό περίοστεο στα αριστερά. (X150, H&E). Πηγή: [44]

Σε μικροσκοπικό επίπεδο το δικτυωτό οστό χαρακτηρίζεται από την τυχαία διάταξη των κολλαγόνων ινών που του προσδίδουν τη χαρακτηριστική εικόνα «υφαντού» όταν παρατηρείται σε πολωτικό μικροσκόπιο, καθώς και από το μεγαλύτερο αριθμό οστεοκυττάρων σε σχέση με το πεταλιώδες οστό (Εικόνα 17) [8,29]. Αυτά τα

χαρακτηριστικά σε συνδυασμό με τη χαμηλότερη συγκέντρωση αλάτων στη μεσοκυττάρια ουσία, προσδίδουν στο δικτυωτό οστό τη δυνατότητα ταχύτερης ανάπτυξης, αλλά μικρότερη αντοχή και σκληρότητα σε σύγκριση με το πεταλιώδες οστό [8,29].

Το πεταλιώδες οστό αποτελεί το συχνότερο ιστολογικό τύπο της πλειοψηφίας των οστών των ενήλικων ατόμων, ονομάζεται και δευτερογενής οστίτης ιστός (secondary bone), αντικαθιστά το δικτυωτό οστό και σχηματίζεται με πιο αργό ρυθμό σε σχέση με το δεύτερο [4,29]. Το πεταλιώδες οστό δύναται να διαθέτει πυκνή οργάνωση ή να εμφανίζει μικρό αριθμό διάσπαρτων οστεώνων [45].

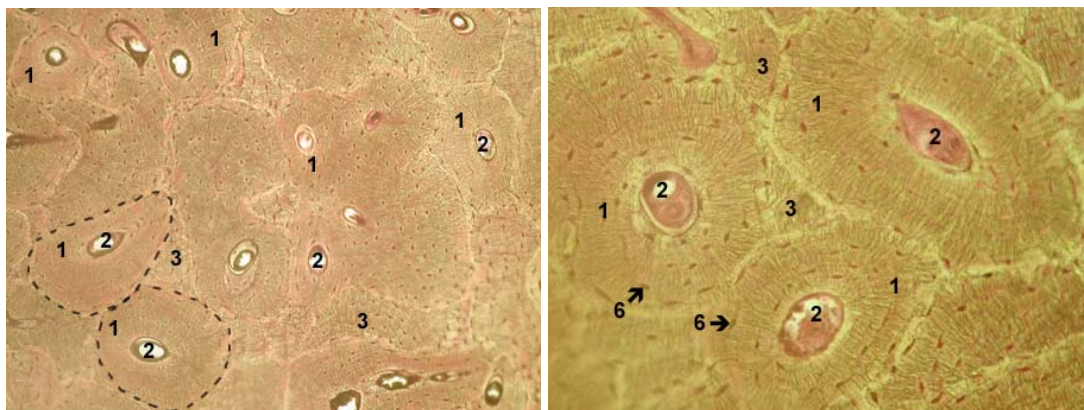
Σε μικροσκοπικό επίπεδο το πεταλιώδες οστό χαρακτηρίζεται από πολλαπλά (5-20 σε αριθμό), ομόκεντρα και παράλληλα διατεταγμένα πετάλια τιτανωμένης ουσίας γύρω από ένα κεντρικό κανάλι, το σωλήνα του Havers ή Αβέρσειο σωλήνα [4,21,29]. Σε κάθε οστέινο πετάλιο οι κολλαγόνες ίνες έχουν παράλληλη διάταξη μεταξύ τους και κάθετη με τις κολλαγόνες ίνες του επόμενου πετάλου [4,8,29]. Αυτή η υψηλή οργάνωση του κολλαγόνου προσδίδει στον οστεώνα τη χαρακτηριστική εικόνα με τις διαδοχικές φωτεινές και σκοτεινές μπάντες στο πολωτικό μικροσκόπιο [8] και την υψηλή αντοχή του δευτερογενούς οστού στις μηχανικές φορτίσεις (Εικόνα 18) [18,29].



Εικόνα 18. Ιστολογικό παρασκεύασμα εφαιλατωμένης, μη κερωσμένης τομής πεταλιώδους οστίτη ιστού παρατηρούμενο σε πολωτικό μικροσκόπιο. (X100) Πηγή: [29]

Η παραπάνω δομική μονάδα του δευτερογενούς οστίτη ιστού μαζί με τα οστεοκύτταρα που βρίσκονται στα οστικά βοθρία, τις κυτταροπλασματικές αποφυάδες τους και τον κεντρικό σωλήνα που περιέχει αιμοφόρα αγγεία, νεύρα και ενδόστριο αποτελεί το δευτερογενή οστεώνα ή σύστημα του Havers (διαμέτρου 100-250 μm) και είναι αποτέλεσμα της ανακατασκευής του οστίτη ιστού (Εικόνα 19) [4,18,29]. Η διάμετρος του αυλού του Αβέρσειου σωλήνα κυμαίνεται από 20-110 μm [18].

Οι οστεώνες έχουν παράλληλη διάταξη με τον επιμήκη άξονα της διάφυσης των μακρών οστών και επικοινωνούν με το περίοστεο και τη μυελική κοιλότητα, αλλά και μεταξύ τους διαμέσου των εγκάρσιων σωλήνων του Volkmann, οι οποίοι στερούνται οστέινα πετάλια [18,29].

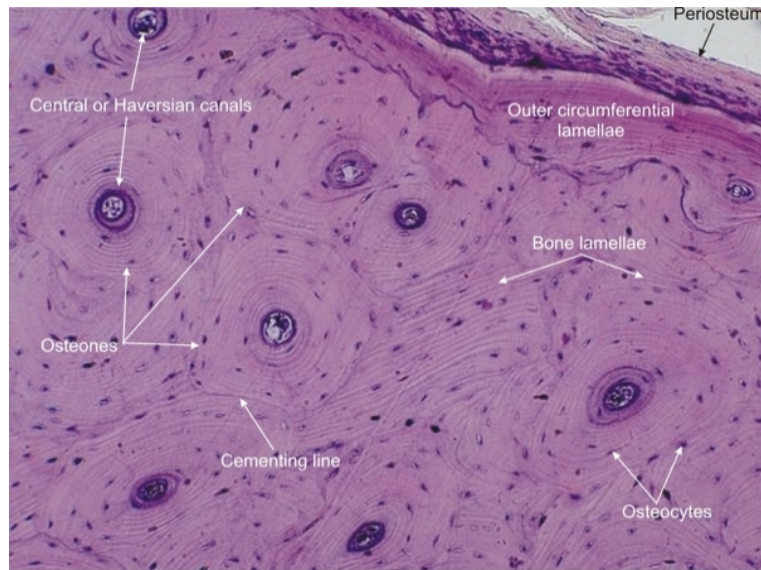


Εικόνα 19. Ιστολογικό παρασκεύασμα αφαλατωμένης τομής δευτερογενούς οστίτη ιστού. Παρατηρούνται 1: οι δευτερογενείς οστεώνες, 2: οι σωλήνες του Havers, 3: τα διάμεσα συστήματα, 6: τα οστεοκύτταρα στα οστικά βοθρία. Χρώση: Schmorl (θειονίνη-πικρικό οξύ). Πηγή: [46]

Κάθε δευτερογενής οστεώνας αφορίζεται περιφερικά από μια λεπτή γραμμή οστεοποίησης (cement line) που αποτελείται από κολλαγόνο, ανόργανη ύλη και πρωτεΐνες της μεσοκυττάριας ουσίας [8,18,29,47]. Η γραμμή αυτή εμφανίζει έντονη φωτοδιαθλαστικότητα στο πολωτικό μικροσκόπιο, σε λεπτές μη αφαλατωμένες τομές των διαφύσεων, ενώ εμφανίζεται βασιφιλή⁶ σε αφαλατωμένες τομές (Εικόνα 20) [18,23,48].

Η στρωματοποίηση του φλοιώδους οστού με τις γραμμές οστεοποίησης είναι αυτή που περιχαρακώνει τα σημεία ανάπτυξης και ανακατασκευής του οστίτη ιστού [23]. Οι γραμμές οστεοποίησης περιλαμβάνουν τις γραμμές μεταστροφής (resorption, reversal, remodeling lines) και τις γραμμές ηρεμίας (resting lines) [23]. Οι πρώτες δημιουργούνται στις περιοχές απορρόφησης και ανακατασκευής του οστίτη ιστού, αφορίζουν τους δευτερογενείς οστεώνες και συνήθως έχουν ακανόνιστη και οδοντωτή εμφάνιση [23]. Οι δεύτερες εντοπίζονται στις περιοχές του οστού όπου προκύπτει επανεκκίνηση της οστεογένεσης έπειτα από προσωρινή παύση της, χωρίς να προηγείται απορρόφηση της οστέινης ουσίας και έχουν ομαλή εμφάνιση (Εικόνα 21) [23].

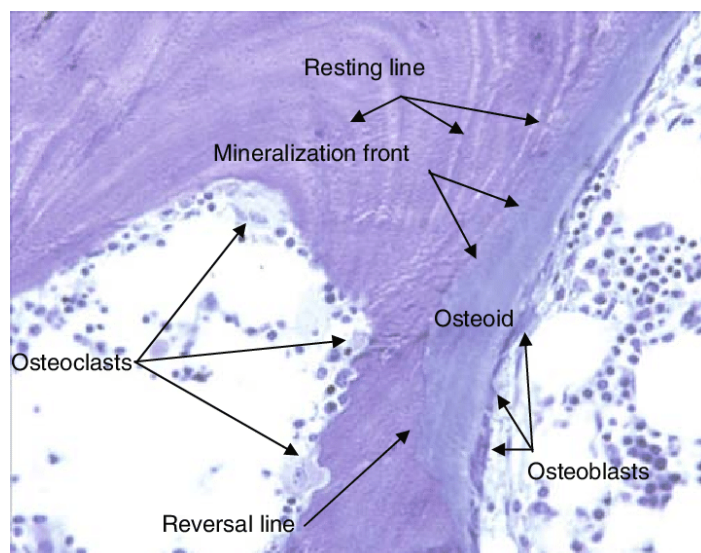
⁶ Χρωματίζεται μωβ, απορροφώντας την αιματοξυλίνη σε ιστολογικές τομές κεχρωσμένες με αιματοξυλίνη-ηωσίνη [23].



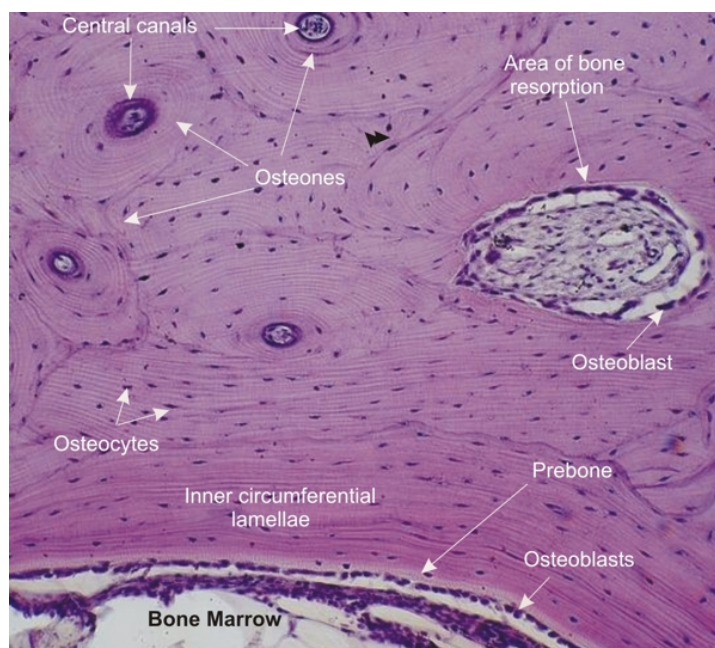
Εικόνα 20. Ιστολογικό παρασκεύασμα αφαλατωμένης τομής πεταλιώδους οστίτη ιστού. Παρατηρείται το δίκτυο οστεώνων με τα ομόκεντρα πέταλα οστέινης ουσίας, οι σωλήνες του Havers, τα οστεοκύτταρα στα οστικά βοθρία, τα διάμεσα συστήματα (bone lamellae), το περιφερικό σύστημα (outer circumferential lamellae) έσω του περιόστεου, και οι βασίφιλες γραμμές οστεοποίησης (cementing line). (H&E, X300) Πηγή: [44]

Ανάμεσα στους οστεώνες του συμπαγούς οστού υπάρχουν ομάδες πεταλίων με ακανόνιστη φορά που συμπληρώνουν τους χώρους της οστέινης ουσίας και δεν σχηματίζουν οστεώνες (διάμεσα συστήματα / interstitial lamellae) [18,20,21,29]. Αυτοί οι σχηματισμοί προκύπτουν από τη μερική καταστροφή των πεταλίων από τις οστεοκλάστες κατά την ανάπτυξη και την ανακατασκευή του οστίτη ιστού [20,29]. Ακόμη, εντοπίζονται ημιτελή ομόκεντρα συστήματα οστέινων πεταλίων έσω του περιόστεου (περιφερικό σύστημα/external circumferential lamellae) και λιγότερα ημιτελή ομόκεντρα οστέινα πετάλια που περιβάλλουν το μυελώδη αυλό (περιμυελικό σύστημα/inner circumferential lamellae) (Εικόνα 22) [18,21,29].

Αυτοί οι σχηματισμοί εναποτίθενται *de novo*, χωρίς να έχει προηγηθεί απορρόφηση και ανακατασκευή του οστίτη ιστού και αποτελούν το πρωτογενές πεταλιώδες οστό (primary lamellar bone) [4].



Εικόνα 21. Ιστολογικό παρασκεύασμα μη αφαλατωμένης τομής οστίτη ιστού. Παρατηρείται η εναπόθεση οστεοειδούς από τους οστεοβλάστες και η γραμμή μεταστροφής (reversal line) στο σημείο εφάλατωσης του οστού. Ακόμη, παρατηρούνται πολλαπλές γραμμές ηρεμίας (resting lines) στο άνω μέρος του ιστού. Τέλος, αριστερά παρατηρούνται οστεοκλάστες που απορροφούν την οστέινη ουσία (toluidine blue stain. X100) Πηγή: [49]



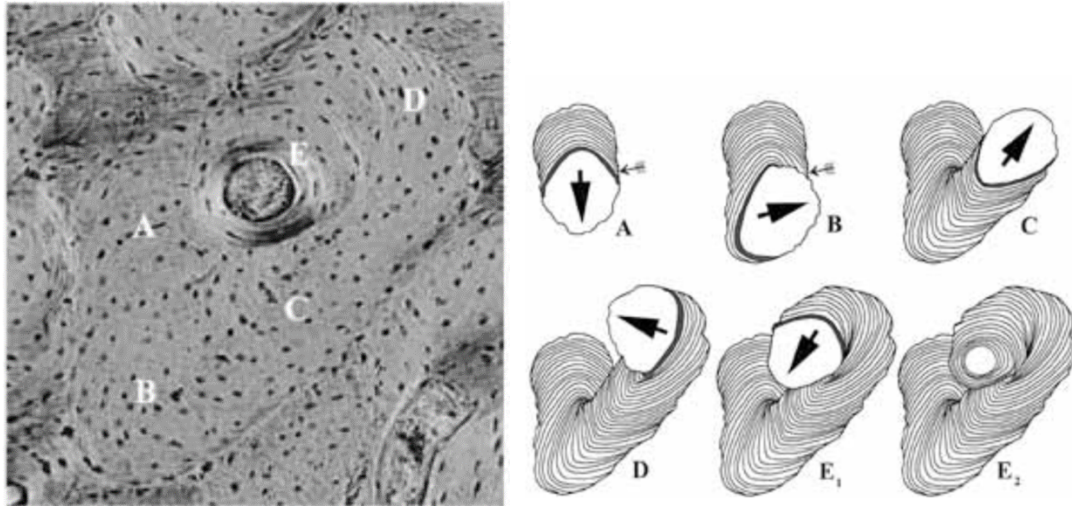
Εικόνα 22. Ιστολογικό παρασκεύασμα αφαλατωμένης τομής οστίτη ιστού. Παρατηρείται το περιμελικό σύστημα πεταλιώδους οστού (inner circumferential lamellae) εξωτερικά της μυελικής κοιλότητας. Ακόμη, παρατηρούνται οι οστεοβλάστες του ενδόστευου που εναποθέτουν οστεοειδές (prebone), οστεώνες με τους Αβέρσειους σωλήνες, οστεοκύτταρα και μια περιοχή οστικής απορρόφησης με τους οστεοβλάστες να εναποθέτουν νέο οστό. (H&E, X300) Πηγή: [44]

Τα οστέινα πετάλια εντοπίζονται και στις οστεοδοκίδες του σπογγώδους οστού [18]. Στην περιοχή αυτή συναντώνται πρωτογενείς οστεώνες, που σχηματίζονται στην επιφάνεια της δευτερογενούς σπογγώδους ουσίας και έχουν ανώμαλο σχήμα, καθώς

και δευτερογενείς οστεώνες οι οποίοι σχηματίζονται έπειτα από την απορρόφηση και ανακατασκευή του οστού και έχουν σχήμα κυκλικό ή ελλειπτικό [24].

Στο φλοιώδες οστό, επιπλέον των δευτερογενών οστεώνων, που δημιουργούνται έπειτα από την ανακατασκευή του οστίτη ιστού, εντοπίζονται πρωτογενείς οστεώνες (primary osteons) που σχηματίζονται χωρίς να έχει προηγηθεί ανακατασκευή του οστού, στερούνται γραμμή οστεοποίησης στην περιφέρειά τους (cement line) και διαθέτουν αγγειακό σωλήνα μικρότερης διαμέτρου σε σχέση με τους πρώτους [4,8,47]. Αυτοί βρίσκονται συνήθως στην παράπλευρη του ενδόστεου περιοχή ή/και δημιουργούνται από τη δράση των οστεοβλαστών στους αγγειακούς σωλήνες του δικτυωτού οστού των ταχέως αναπτυσσόμενων θηλαστικών [4] και δεν περιβάλλονται από οστέινα πετάλια [45].

Ακόμη, εκτός των τυπικών μορφών δευτερογενών οστεώνων (type I osteons), εντοπίζονται σπανιότερα οι ένθετοι οστεώνες (type II, embedded osteons), οι οποίοι εμφανίζονται ως δυο ομόκεντροι οστεώνες διαφορετικού μεγέθους, που διαθέτουν και οι δύο τις γραμμές οστεοποίησής τους, οι οποίες δεν εφάπτονται σε κανένα σημείο [4,47,50]. Οι οστεώνες διπλής ζώνης (type III, double zonal osteons) αποτελούν ακόμη μια μορφή δευτερογενών οστεώνων, διαθέτουν έναν υπερασβεστωμένο δακτύλιο στην περιοχή των ομόκεντρων πεταλίων, που πιθανώς αποτελεί γραμμή παύσης (arrest line) εξαιτίας κωλύματος κατά τη διαδικασία της οστικής ανακατασκευής [4,50]. Τέλος εντοπίζονται, ιδιαίτερα στα παιδιά, οι μετακινούμενοι οστεώνες (drifting/waltzing osteons) [4,50]. Πρόκειται για μια μορφή δευτερογενούς οστεώνα, όπου κατά την δημιουργία του υπήρξε συνεχής οστική απορρόφηση στη μία πλευρά του και συνεχής οστική παραγωγή στην άλλη, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός έκκεντρου Αβέρσειου σωλήνα που περιβάλλεται από ομόκεντρα πετάλια οστέινης ουσίας και ακολουθείται από μια ημικυκλική «ουρά» οστέινων πεταλίων (Εικόνα 23) [4,50]. Συνήθως η μετακίνηση αυτών των οστεώνων έχει κατεύθυνση προς το ενδόστεο [50].

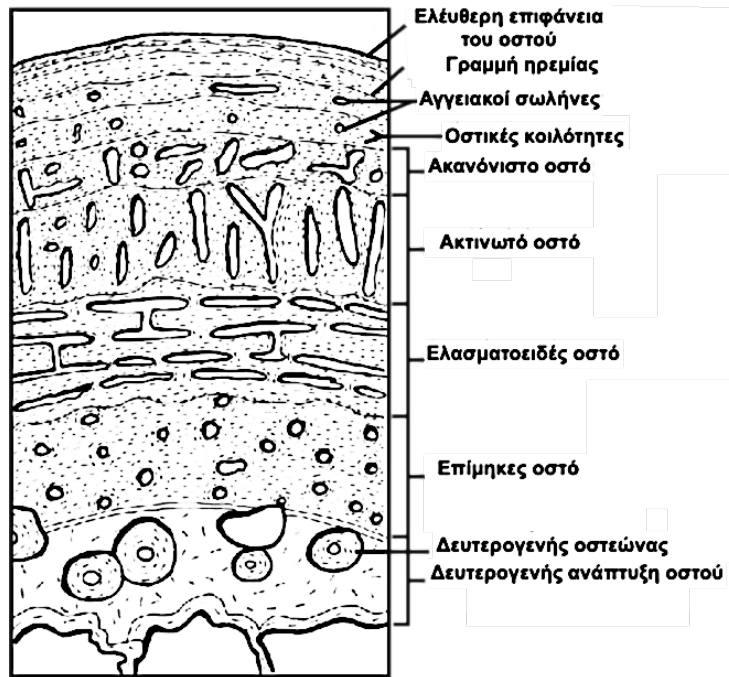


Εικόνα 23. Ιστολογικό παρασκεύασμα μετακινούμενου οστεώνα αριστερά και σχηματική αναπαράσταση της μετακίνησής του στο χρόνο από το A-E (δεξιά), όπου E₂ είναι η τελική εικόνα που εντοπίζεται στον ιστό. (X160)
Πηγή: [50]

Όπως αναφέρθηκε, εκτός των βασικών τύπων του δικτυωτού και πεταλιώδους οστού, εντοπίζεται και το ινοπεταλιώδες οστό, που αποτελεί μορφή πρωτογενούς οστού [4]. Η μικροσκοπική του δομή του δίνει τη δυνατότητα να αναπτύσσεται ταχύτερα σε διάμετρο εκ του περίοστεου σε σχέση με το πεταλιώδες οστό. Για το λόγο αυτό εντοπίζεται κυρίως σε ταχέως αναπτυσσόμενα μη ανθρώπινα θηλαστικά, αλλά και σε ανθρώπινα έμβρυα, νεογνά, νήπια και ταχέως αναπτυσσόμενους εφήβους, ενώ αντικαθίσταται στη συνέχεια από πρωτογενές και δευτερογενές πεταλιώδες οστό (στα ανθρώπινα οστά και σε ορισμένα θηλαστικά) [4].

Μικροσκοπικά το ινοπεταλιώδες οστό χαρακτηρίζεται από εναλλασσόμενες δομές πεταλιώδους και δικτυωτού οστού με χαρακτηριστική στρωματοποίηση που καθορίζεται από τον προσανατολισμό των πρωτογενών αγγειακών σωλήνων (laminarity) (Εικόνα 24) [4].

Το ινοπεταλιώδες οστό χωρίζεται σε υπότυπους, όπως είναι το ελασματοειδές ινοπεταλιώδες (laminar fibrolamellar bone), που χαρακτηρίζεται από περιφερικά στρώματα πεταλιώδους οστού και το πλεγματοειδές (plexiform bone) με τη χαρακτηριστική του δομή που μοιάζει με τείχος από τούβλα και προκύπτει από την περιστοίχιση των αγγειακών πλεγμάτων του πεταλιώδους οστού από ινώδες οστό (Εικόνα 25, 26) [4,45]. Σπανιότερα ανευρίσκονται στα θηλαστικά οι υπότυποι του ακτινωτού οστού (radial bone) και του ακανόνιστου δικτυωτού οστού (reticular bone) (Εικόνα 27, 28) [23,45].



Εικόνα 24. Σχηματική αναπαράσταση ινοπεταλιώδους οστού, όπου απεικονίζονται οι κατευθύνσεις των αγγειακών σωλήνων (ακανόνιστη, ακτινωτή, ελασματοειδής, επιμήκης). Πηγή: [51]



Εικόνα 25. Σχηματική αναπαράσταση ελασματοειδούς ινοπεταλιώδους οστού πρωτογενούς αγγείωσης. Απεικονίζονται οι επιμήκως διατεταγμένοι αγγειακοί σωλήνες (κύκλος) και οι κυκλικά διατεταγμένοι αγγειακοί σωλήνες (βέλη). Πηγή: [23]



Εικόνα 26. Σχηματική αναπαράσταση πλεγματοειδούς οστού πρωτογενούς αγγείωσης. Απεικονίζονται οι επιμήκως διατεταγμένοι αγγειακοί σωλήνες (κύκλος), οι κυκλικά διατεταγμένοι αγγειακοί σωλήνες (κόκκινα βέλη) και οι ακτινωτός διατεταγμένοι αγγειακοί σωλήνες (μπλε βέλη). Πηγή: [23]



Εικόνα 27. Σχηματική αναπαράσταση ακτινωτού οστού πρωτογενούς αγγείωσης. Παρατηρούνται οι ακτινωτός διατεταγμένοι αγγειακοί σωλήνες, ορισμένοι από τους οποίους αναστομώνονται και προκύπτουν είτε από το περιόστεο, είτε από το ενδόστεο. Πηγή: [23]



Εικόνα 28. Σχηματική αναπαράσταση ακανόνιστου δικτυωτού οστού πρωτογενούς αγγείωσης. Οι αγγειακοί σωλήνες διατάσσονται ακανόνιστα προς κάθε κατεύθυνση. Πηγή: [23]

Τέλος, ο οστίτης ιστός είναι δυνατόν να στερείται αγγείωσης (non vascular bone) και να αποτελείται από ομόκεντρα οστέινα πετάλια που περιβάλλουν την κεντρική μυελική κοιλότητα [23,45].

1.5. Οστεογένεση

Η οστεογένεση ή οστέωση (ossification) αποτελεί μια συντηρημένη και προβλέψιμη διαδικασία για όλα θηλαστικά [4], αφορά την ανάπτυξη των οστών και διακρίνεται σε δύο τύπους: την ενδομεμβρανική οστέωση (intramembranous ossification) και την ενδοχόνδριο οστέωση (endochondral ossification) [4,18,21,24,29]. Στα περισσότερα οστά λαμβάνουν χώρα και οι δύο τύποι οστεογένεσης, εκτός από τα πλατέα οστά του κρανίου τα οποία προκύπτουν αποκλειστικά μέσω της ενδομεμβρανικής οστέωσης [24].

Ωστόσο, όλα τα οστά κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους εμφανίζουν δικτυωτό οστίτη ιστό που αντικαθίσταται μερικώς ή καθολικά από πεταλιώδη οστίτη ιστό και έχουν παρόμοια ιστολογική εικόνα ανεξαρτήτως καταβολής [24,29].

1.5.1. Ενδομεμβρανική οστέωση

Η ενδομεμβρανική οστέωση λαμβάνει χώρα στα περισσότερα πλατέα οστά, όπως είναι τα οστά του κρανίου, της γνάθου και η ωμοπλάτη [29]. Επίσης, συμμετέχει στη διαμόρφωση της σπογγώδους ουσίας, καθώς και στην κατά πλάτος αύξηση των επιμήκων οστών [18,20,24].

Στην ενδομεμβρανική οστεογένεση, τα μεσεγχυματικά κύτταρα του εμβρυικού μεσεγγύματος διαφοροποιούνται σε οστεοπρογεννήτορες και έπειτα σε οστεοβλάστες που παράγουν οστεοειδές [20,21,29]. Τα ανατομικά σημεία των πρώτων καταβολών του πρωτογενούς οστού και της παραγωγής οστεοειδούς από τις οστεοβλάστες βρίσκονται γύρω από αναπτυσσόμενα αγγειακά δίκτυα και ονομάζονται κέντρα οστεοποίησης (ossification centers) (Εικόνα 29) [21,29]. Η επερχόμενη τιτάνωση αυτών των περιοχών οδηγεί στη συνένωση των γειτονικών κέντρων οστεοποίησης και οι περιοχές που δεν οστεοποιούνται αποτελούν το περίοστεο και το ενδόστεο του οστού [20,29].



Εικόνα 29. Ιστολογικό παρασκεύασμα νεοσηματιζόμενου πλατέως οστού κρανίου από έμβρυο χοίρου. Παρατηρούνται οι οστεοδοκίδες της πρωτογενούς σπογγώδους ουσίας (trabecules of woven bone) σε έδαφος χαλαρού συνδετικού ιστού. Παρατηρούνται επίσης οστεοκύτταρα στις οστικές τους κοιλότητες, καθώς και οστεοβλάστες γύρω από αγγειακά δίκτυα (περιγεγραμμένες κυκλικές περιοχές) . (H&E X300) Πηγή: [44]

Από τα κέντρα οστεοποίησης ξεκινά ο σχηματισμός των δοκίδων ινώδους μορφής (trabeculae), που αποτελούν την πρωτογενή σπογγώδη ουσία, η οποία οστεοποιείται με την προσθήκη πεταλιώδους οστού σχηματίζοντας τη δευτερογενή σπογγώδη ουσία (secondary spongiosa) [18,21]. Στις περιοχές της πρωτογενούς σπογγώδους ουσίας

όπου η μεσοκυττάρια ουσία αντικαθίσταται από οστέινη ουσία, δημιουργείται συμπαγής οστίτης ιστός, ενώ όπου επικρατεί το σπογγώδες οστό, η μεσοκυττάρια ουσία μετατρέπεται σε μυελό των οστών [4,21].

Στα πλατέα οστά του κρανίου, που σχηματίζονται αποκλειστικά μέσω της ενδομεμβρανικής οστέωσης, στις έσω και έξω επιφάνειες υπερισχύει η ανάπτυξη του πεταλιώδους οστού έναντι της απορρόφησής του και έτσι σχηματίζονται δύο πέταλα συμπαγούς οστού με σπογγώδες κέντρο που ονομάζεται διπλόη [18,29].

Η κατά πλάτος αύξηση της διαμέτρου των επιμήκων οστών ακολουθεί την ενδομεμβρανική οστέωση, που προκύπτει από την εναπόθεση πεταλιώδους οστού στις δοκίδες της πρωτογενούς σπογγώδους ουσίας από τους οστεοβλάστες της οστεογόνου στοιβάδας του περιόστεου της διάφυσης [4,18,21,24]. Παράλληλα, από τις οστεοκλάστες του ενδόστεου πραγματοποιείται η απορρόφηση του πρωτογενούς οστίτη ιστού και διευρύνεται ο μυελώδης αυλός [4,21,24].

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των οστών, οι οστεοβλάστες του περιόστεου συνθέτουν οστέινη ουσία σε ομόκεντρα πετάλια γύρω από τα αγγεία που εισχωρούν στα διαστήματα της δευτερογενούς σπογγώδους ουσίας σχηματίζοντας τους πρωτογενείς οστεώνες (primary osteons) [21,24]. Στη συνέχεια, οι πρωτογενείς οστεώνες του φλοιώδους οστού αντικαθίστανται σταδιακά από δευτερογενείς οστεώνες [21,24]. Η τελείωση των οστών και η ομαλοποίηση της επιφάνειάς τους πραγματοποιείται με την εναπόθεση πεταλιώδους οστού υποπερισστικά και περιμυελικά, που αποτελούν αντίστοιχα το περιφερικό και περιμυελικό σύστημα [21].

1.5.2. Ενδοχόνδρινη οστέωση

Η ενδοχόνδρινη οστέωση μελετάται καλύτερα στα επιμήκη οστά, αλλά λαμβάνει χώρα στα περισσότερα οστά του σκελετού και ξεκινά από προκαθορισμένες θέσεις στα υαλοειδή χόνδρινα προπλάσματα του αναπτυσσόμενου εμβρύου [4,18,20,23,29]. Οι προκαθορισμένες αυτές θέσεις ονομάζονται πρωτογενείς πυρήνες οστέωσης (primary center of ossification) [18,21,23]. Σε αυτά τα σημεία τα χονδρικά κύτταρα ωριμάζουν, γίνονται υπερτροφικά και απελευθερώνουν οστεοκαλσίνη και αλκαλική φωσφατάση [29]. Η μεσοκυττάρια ουσία λεπταίνει και εμποτίζεται με τιτανωμένη ουσία, αποτρέποντας τη διάχυση θρεπτικών συστατικών και οδηγώντας τα χονδροκύτταρα στον κυτταρικό θάνατο [20,21,29].

Παράλληλα, εισδύουν στον χόνδρο αιμοφόρα τριχοειδή προερχόμενα από το περιχόνδριο και τροφοδοτούν τους πυρήνες οστέωσης με χονδροκλάστες που λύουν τα χονδροκύτταρα και διαβρώνουν τη μεσοκυττάρια ουσία [18]. Η δράση των χονδροκλαστών έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία κοιλοτήτων, τους πρωτογενείς μυελοχώρους, που περιέχουν αγγεία και μεσεγχυματικά κύτταρα και οι οποίοι στο σύνολό τους αποτελούν τον πρωτογενή μυελό του οστού [18]. Μέσω των αιμοφόρων τριχοειδών του περιχονδρίου, που πλέον αποτελεί το περίοστεο, εισέρχονται στο νεοσχηματιζόμενο οστό οστεοπρογονικά κύτταρα που διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες, παράγουν οστεοειδές σε δοκίδες και οδηγούν στο σχηματισμό του πρωτογενή οστίτη ιστού [4,18,21,29].

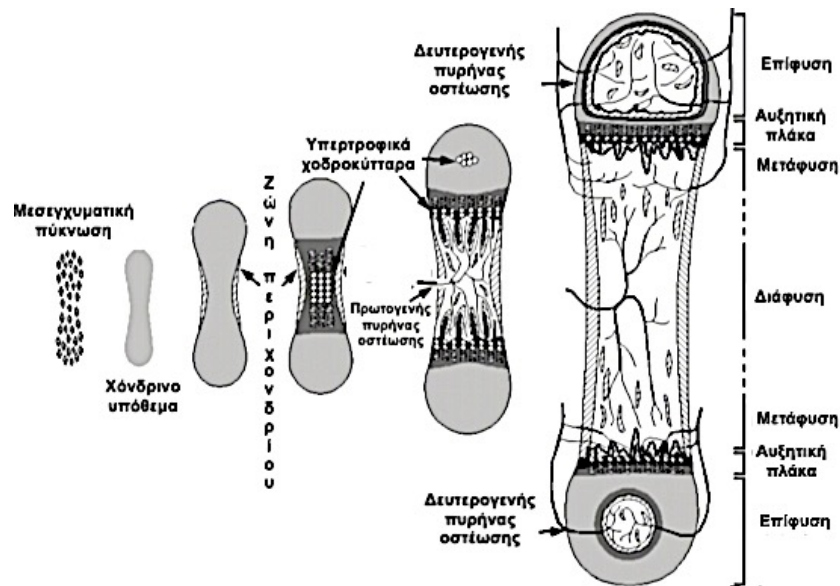
Στα επιμήκη οστά, η αντικατάσταση του χόνδρινου ιστού από οστίτη ιστό πρωτοεμφανίζεται στο κέντρο της διάφυσης του χόνδρινου προπλάσματος. Στο σημείο αυτό μια δακτυλιοειδής ζώνη του περιχόνδριου διαφοροποιείται σε περίοστεο και παράγει οστεοπρογεννήτορες που μεταπίπτουν σε οστεοβλάστες, οι οποίοι προάγουν την παραγωγή του αρχικά σπογγώδους περιόστεου οστίτη ιστού (periosteal collar) [18,21,29]. Η διαδικασία αυτή ακολουθεί την ενδομεμβρανική οστέωση για το λόγο ότι, το νεοσχηματιζόμενο οστό γύρω από την ζώνη οστεοποίησης προκύπτει από τη διαφοροποίηση των κυττάρων του συνδετικού ιστού του περιχονδρίου [18,21].

Παράλληλα, στη μέση της διάφυσης όπου εμφανίζεται ο πρωτογενής πυρήνας οστέωσης, τα χονδροκύτταρα στερούνται οξυγόνο, εμφανίζονται υπερτροφικά και οδηγούνται σε κυτταρικό θάνατο, ενώ διεισδύουν αιμοφόρα τριχοειδή από το περίοστεο που φέρουν κύτταρα του οστίτη ιστού και ακολουθεί η οστεοποίηση του χόνδρου, όπως περιεγράφηκε παραπάνω [18,21,29]. Η διαδικασία της οστεοποίησης των μακρών οστών επεκτείνεται από τους πρωτογενείς πυρήνες οστέωσης της διάφυσης προς κάθε κατεύθυνση και προς τις επιφύσεις του οστού, ενώ επιπλέον η κατά πλάτος αύξηση του οστού προκύπτει από το περίοστεο [18,21].

Αργότερα, κατά την ενδομήτρια ζωή και τη βρεφική ηλικία, εμφανίζονται οι δευτερογενείς πυρήνες οστέωσης στις χόνδρινες επιφύσεις των επιμήκων οστών (Εικόνα 30) [18,23,29]. Το περιχόνδριο των επιφύσεων των νεογνών τροφοδοτεί τη χόνδρινη επίφυση με νευρικές ίνες και τριχοειδή αγγεία, τα οποία καταλήγουν σε αγγειώδη σπειράματα, διαμέσου καναλιών που επαλείφονται με συνδετικό ιστό [21].

Κατά τη διάρκεια της ενδοχόνδρινης οστεοποίησης τα παρακείμενα χονδροκύτταρα του συζευκτικού χόνδρου (στα όρια της επίφυσης με τη μετάφυση) εμφανίζονται

υπερτροφικά και παρατάσσονται σε παράλληλους στοίχους που αποτελούν τις ζώνες της κατά μήκος ανάπτυξης του οστού [18,21].



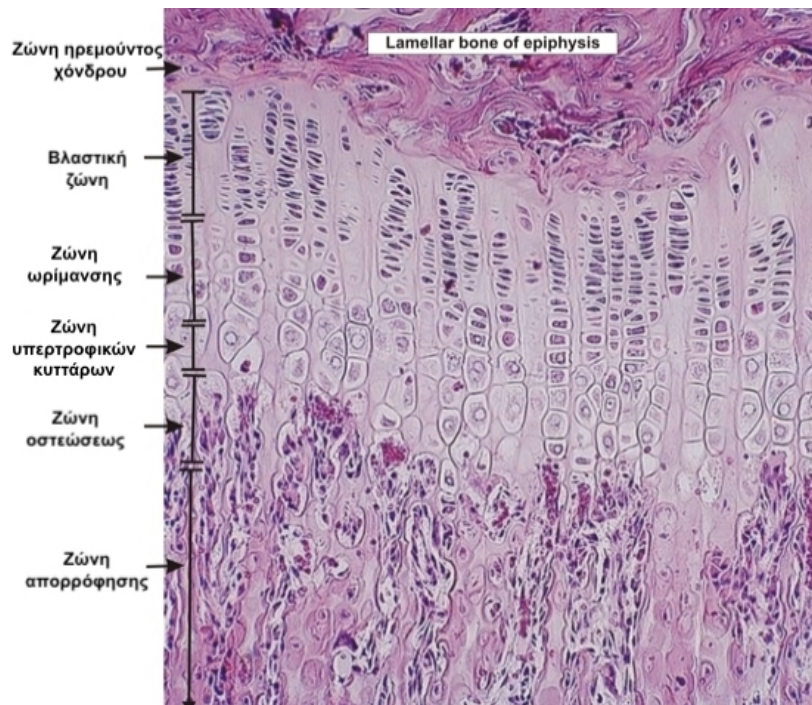
Εικόνα 30. Σχηματική αναπαράσταση ενδοχόνδρινης οστέωσης επιμήκους οστού. Πηγή: [52]

Μετά την εμφάνιση των δευτερογενών πυρήνων οστέωσης η κατά μήκος αύξηση των επιμήκων οστών τελείται μόνο από τα κύτταρα του συζευκτικού χόνδρου [18]. Τα χονδροκύτταρα του συζευκτικού χόνδρου οργανώνονται σε παράλληλες ζώνες, πολλαπλασιάζονται συνεχώς και παράγουν ενδοχόνδριο οστό στο άκρο της διάφυσης (Εικόνα 31) [18,29]. Οι ζώνες αυτές, από την επίφυση προς τη μετάφυση (επιφυσειακή πλάκα) είναι:

- I. Η ζώνη του ηρεμούντος χόνδρου (zone of reserve cartilage) που αποτελείται από τυπικό υαλώδη χόνδρο [29]. Σε αυτό το σημείο τα χονδροκύτταρα έχουν μικρό μέγεθος, κατανέμονται ακανόνιστα, τροφοδοτούνται από τα τριχοειδή αγγεία της επίφυσης και παράγουν κυστίδια που προάγουν την οστεοποίηση της διάμεσης ουσίας, η οποία όμως αποτιτανώνεται στις παρακάτω ζώνες [21].
- II. Η βλαστική ζώνη (proliferative zone), όπου τα χονδροκύτταρα διαιρούνται συνεχώς, παράγουν κολλαγόνο τύπου II και πρωτεογλυκάνες, ενώ οργανώνονται σε στίχους και αποκτούν παράλληλη διάταξη με τον επιμήκη άξονα του οστού [21,29].
- III. Η ζώνη ωρίμανσης (zone of maturation), όπου σταματούν οι διαιρέσεις των χονδροκυττάρων [18].
- IV. Η ζώνη των υπερτροφικών κυττάρων ή ζώνη τιτανώσεως (zone of hypertrophy or zone of calcification), όπου τα υπερτροφικά κύτταρα προάγουν την τιτανώση

της μεσοκυττάριας ουσίας και εμφανίζονται κενотоπιώδη [18]. Σε αυτό το σημείο αρχίζει η εναπόθεση των αλάτων στη μεσοκυττάρια ουσία, καθώς ελευθερώνονται από τα εξωκυτταρικά κυστίδια αλκαλική φωσφατάση και πρωτεάσες που οδηγούν σε τοπική αύξηση της συγκέντρωσης των φωσφορικών ιόντων και του ασβεστίου [21].

- V. Η ζώνη οστεώσεως (ossification zone), όπου τα χονδροκύτταρα αποπίπτουν, εισδύουν τριχοειδή αγγεία και οστεοπρογονικά κύτταρα από το συνδετικό ιστό των μυελωδών κοιλοτήτων της διάφυσης στις χόνδρινες κοιλότητες και οι διαφοροποιημένοι οστεοβλάστες εγκαθίστανται στις τιτανωμένες χόνδρινες δοκίδες. Σε αυτό το σημείο παράγουν οστεοειδές, σχηματίζοντας τελικά τους πρωτογενείς μυελοχώρους που αντικαθίστανται στη συνέχεια μέσω της δράσης των οστεοκλαστών και των οστεοβλαστών από πεταλιώδες οστό [18,21,29].
- VI. Η ζώνη απορρόφησης (zone of resorption): Σε αυτό το σημείο είναι χαρακτηριστικός ο σχηματισμός αγγειακών βρόγχων της μετάφυσης που εισχωρούν στις κοιλότητες των υπερτροφικών κυττάρων [21]. Οι οστεοκλάστες απορροφούν τις παλαιότερες αποτιτανωμένες χόνδρινες δοκίδες κατά τη διάρκεια της κατά μήκος αύξησης του οστού [48].



Εικόνα 31. Ιστολογικό παρασκεύασμα επιφυσιικής πλάκας επιμήκους οστού αναπτυσσόμενου σκύλου. Επάνω, φαίνεται η επίφυση του οστού, παρεμβάλλεται ο συζευκτικός χόνδρος με τις αναγραφόμενες ζώνες και η μετάφυση στο κάτω μέρος της εικόνας. (H&E, X300) Πηγή: [44]

Η κατά μήκος αύξηση των οστών, στον άνθρωπο και στα οικόσιτα ζώα, ολοκληρώνεται στο τέλος της ήβης, με τον τερματισμό του πολλαπλασιασμού των χονδροκυττάρων και τη συνοστέωση της διάφυσης με την επίφυση στην επιφυσιακή γραμμή [18,21,29]. Η τελική μορφή της μετάφυσης και η ενσωμάτωση της στη διάφυση καλείται μεταφυσική μείωση [4,24] και πραγματοποιείται από την απορρόφηση της εξωτερικής της επιφάνειας από τις οστεοκλάστες του περιόστεου και την εναπόθεση οστέινης ουσίας από το ενδόστεο, που προσδίδει ιδιαίτερη σκληρότητα και αντοχή στο φλοιό της [4,21].

Κατά τη διάρκεια της οστεοποίησης στους πρωτογενείς και δευτερογενείς πυρήνες οστέωσης δημιουργούνται κοιλότητες από τη δράση των οστεοκλαστών που επαλείφονται με το αιμοποιητικό όργανο του μυελού των οστών, ενώ περιστοιχίζονται από πεταλιώδες οστό που προκύπτει από τη δραστηριότητα των οστεοβλαστών [21,29]. Το σπογγώδες οστό που προκύπτει απαλλαγμένο από χονδρικό ιστό ονομάζεται δευτερογενές σπογγώδες οστό (secondary spongiosa) [21].

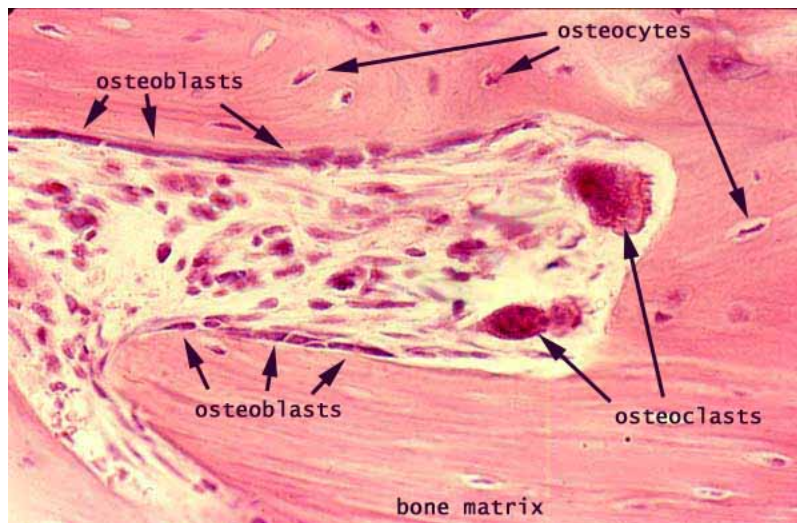
Οι αρθρικές χόνδρινες επιφάνειες των οστών δεν επαλείφονται από περίοστεο και δεν οστεοποιούνται [29].

1.6. Οστική ανακατασκευή

Κατά τη διάρκεια της ζωής των σπονδυλωτών ο οστίτης ιστός αναπλάθεται διαρκώς, προσδίδοντας στο οστό τη δυνατότητα προσαρμογής στις μηχανικές τάσεις που του ασκούνται, διατηρώντας την αντοχή και την ακεραιότητα του σκελετού, επιδιορθώνοντας μικροβλάβες και εξασφαλίζοντας την ομοιοστασία του ασβεστίου στον οργανισμό [4,29,53]. Η διαδικασία που ακολουθείται επονομάζεται οστική ανακατασκευή (bone remodeling) [4,27,54].

Η οστική ανακατασκευή είναι μια κυκλική διαδικασία όπου ο παλαιότερος οστίτης ιστός αντικαθίσταται αργά και σταδιακά από νεοσχηματιζόμενο οστίτη ιστό με τη συνεργασία οστεοκλαστών και οστεοβλαστών, που οργανώνονται στις βασικές πολυκυτταρικές μονάδες (basic multicellular units/BMU) [4,27,54].

Στο φλοιώδες οστό οι BMU εντοπίζονται στις θέσεις απορρόφησης και επανασηματισμού του οστίτη ιστού και σε επιμήκεις ιστολογικές τομές εμφανίζονται ως κωνοειδείς κοιλότητες μήκους περίπου 2,000 μm και πλάτους 150–200 μm [27]. Σύμφωνα με άλλους συγγραφείς το μήκος κυμαίνεται από 300 μm έως 4000 μm και το πλάτος από 150 έως 350 μm [4].

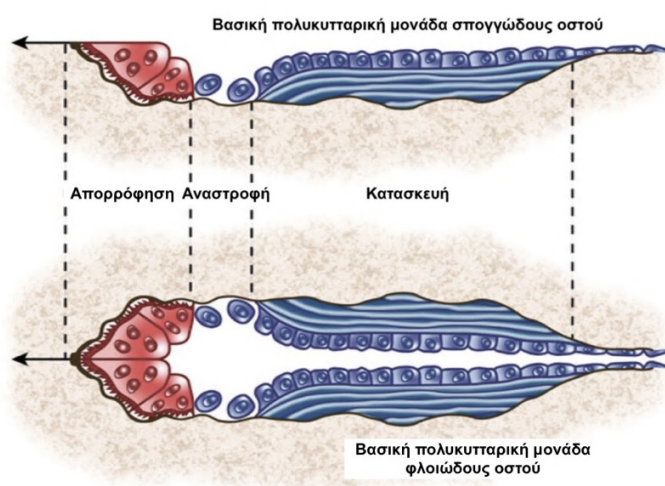


Εικόνα 32. Ιστολογικό παρασκεύασμα φλοιώδους οστίτη ιστού. Απεικονίζεται η βασική πολυκυτταρική μονάδα (BMU), όπου το οστό υπόκειται σε απορρόφηση από τις οστεοκλάστες και εναποτίθεται οστεοειδές από τους οστεοβλάστες στις ελεύθερες επιφάνειες των οστικών κωνοειδών κοιλοτήτων. Παρατηρούνται επίσης, οστεοκύτταρα τα οποία βρίσκονται στις οστικές τους κοιλοότητες. (H&E) Πηγή: [55]

Οι κοιλότητες αυτές σχηματίζονται από τη δράση των οστεοκλαστών του περιόστεου ή/και του ενδόστεου που φτάνουν στο σημείο της απορρόφησης του οστού μέσω τριχοειδών αγγείων. Ακολουθούνται από τις γραμμές μεταστροφής όπου

επικρατεί η εναπόθεση οστεοειδούς από τους οστεοβλάστες και καταλήγουν στο κλείσιμο της κωνοειδούς κοιλότητας, όπου οι οστεοβλάστες εναποθέτουν ομόκεντρα πετάλια πεταλιώδους οστού εσωτερικά των ορίων της γραμμής οστεοποίησης (Εικόνα 32, 33) [21,29]. Οι κωνοειδείς κοιλότητες σχηματίζονται από τη δράση περίπου 10 οστεοκλαστών και οι οστεοβλάστες που συναντώνται στην BMU εμφανίζονται κατά εκατοντάδες [27].

Στο σπογγώδες οστό η οστική ανακατασκευή λαμβάνει χώρα στην ενδοστική επιφάνεια των οστεοδοκίδων, όπου οι οστεοκλάστες απορροφούν το παλαιό οστό και οι οστεοβλάστες εναποθέτουν εκ νέου οστέινη ουσία, είτε στην ίδια περιοχή είτε στην αντίθετη θέση της δοκίδας, αλλάζοντας στη δεύτερη περίπτωση την κατεύθυνση της οστικής κατασκευής, η οποία ακολουθεί τις δυνάμεις έκτασης [21,56]. Η βασική πολυκυτταρική μονάδα του σπογγώδους οστού έχει τη μορφή μισού κώνου (hemicone) και η δομική μονάδα που προκύπτει από τον ανασχηματισμό του σπογγώδους οστού έχει τη μορφή ημιοστεώνα (hemi-osteon) πλάτους 60μm (Εικόνα 33) [4,56].



Εικόνα 33. Σχηματική αναπαράσταση μονάδων οστικής ανακατασκευής σπογγώδους και φλοιώδους οστίτη ιστού. Στα αριστερά απεικονίζονται κόκκινοι οι πολυπύρρηνοι οστεοκλάστες στα σημεία απορρόφησης του οστού. Το βέλος προσδιορίζει την κατεύθυνση της οστικής απορρόφησης. Στις ζώνες αναστροφής και οστικής παραγωγής απεικονίζονται μπλε οι οστεοβλάστες που εναποθέτουν οστεοειδές (απεικονίζεται κυματοειδές) έσω της γραμμής μεταστροφής. Είναι εμφανές ότι η μονάδα οστικής ανακατασκευής του φλοιώδους οστού που έχει σχήμα κωνοειδές, ενώ του σπογγώδους οστού έχει σχήμα μισού κώνου. Πηγή: [57]

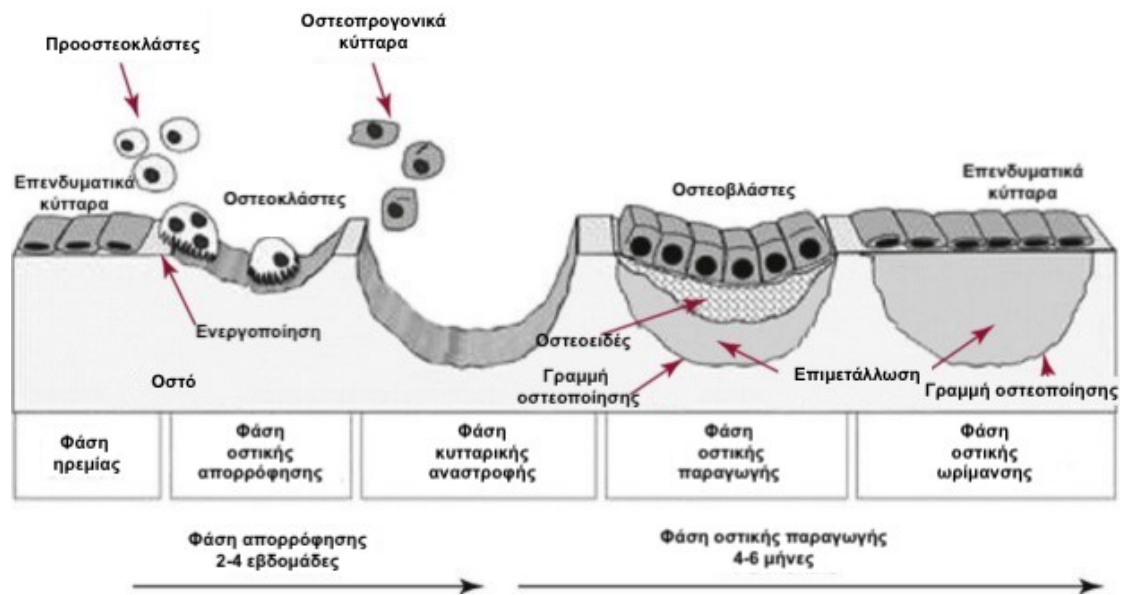
Έχει παρατηρηθεί ότι οι κοιλότητες απορρόφησης των BMU ακολουθούν την κατεύθυνση των δυνάμεων έκτασης, ενώ σε περίπτωση ακινησίας επηρεάζονται τόσο τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά, όσο και ο ρυθμός της οστικής ανακατασκευής [4,54,56]. Στο σπογγώδες οστό σε περίπτωση ακινησίας απορροφώνται οστεοδοκίδες από τις οστεοκλάστες αλλάζοντας το σχήμα του οστού [4,54,56].

Η ανακατασκευή του οστίτη ιστού που λαμβάνει χώρα στο σπογγώδες οστό είναι ταχύτερη σε σχέση με εκείνη του φλοιώδους οστού, λόγω της μεγαλύτερης αναλογίας της επιφάνειας προς τον όγκο του [27]. Ακόμη, στους ενήλικες ο οστίτης ιστός ανασχηματίζεται σε ποσοστό 5-10% ανά έτος, ενώ στα άνηθα άτομα η οστική ανακατασκευή είναι έως και 200 φορές ταχύτερη [29].

Στο σημείο αυτό είναι σκόπιμο να αποσαφηνιστούν οι διαφορές ανάμεσα στην οστική κατασκευή (bone modeling) και στην οστική ανακατασκευή (bone remodeling). Με την οστική κατασκευή, που εξαρτάται από την λειτουργία του ενδόστευου και του περιόστευου και προκύπτει ανεξάρτητα από την προηγούμενη απορρόφηση του οστού, επιτυγχάνεται η αύξηση της διαμέτρου της διάφυσης των μακρών οστών, η δημιουργία των μυελωχώρων, η μεταφυσική μείωση, η εναπόθεση του πεταλιώδους οστίτη ιστού και η μηχανική προσαρμογή του οστού [4]. Αντιθέτως, η ανακατασκευή του οστού, προκύπτει έπειτα από την απορρόφηση του στις περιοχές των πολυκυτταρικών μονάδων και εξασφαλίζει την αντοχή και την αναπροσαρμογή του οστίτη ιστού στις μηχανικές τάσεις που ασκούνται στον ώριμο σκελετό [4].

1.6.1. Φάσεις οστικής ανακατασκευής

Η οστική ανακατασκευή χαρακτηρίζεται από πέντε φάσεις, όπου συμμετέχουν οι εξής ορμονικοί και κυτταρικοί μηχανισμοί (Εικόνα 34):



Εικόνα 34. Σχηματική απεικόνιση των φάσεων ανακατασκευής του οστού. Πηγή: [48]

1. Φάση ενεργοποίησης (activation phase)

Κατά την φάση της ενεργοποίησης, μικροσκοπικές ρωγμές στο Αβέρσειο σύστημα, μηχανικές φορτίσεις ή/και ορμονικά σήματα προκαλούν την απόπτωση των οστεοκυττάρων στο σημείο της επικείμενης απορρόφησης του οστού [4,53,56,57]. Η απόπτωση των οστεοκυττάρων έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της συγκέντρωσης του μεταμορφωτικού αυξητικού παράγοντα-β (TGF-β)⁷ στο μικροπεριβάλλον του ιστού [53,58], επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την έναρξη της διαφοροποίησης των οστεοκλαστών από τους προοστεοκλάστες (οστεοκλαστογένεση) [53]. Ακόμη, σε αυτή τη φάση συμμετέχουν τα επενδυματικά κύτταρα καθώς και οι πρόδρομες μορφές των οστεοβλαστών που προέρχονται από το μυελό [27].

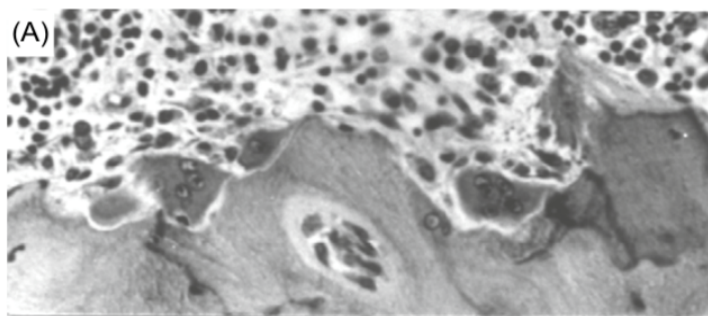
Έπειτα από την προσέλκυση, μέσω της δράσης χημειοτακτικών παραγόντων, των προοστεοκλαστών στο σημείο απορρόφησης του οστού, οι οστεοβλάστες εκφράζουν κυτοκίνες οστεοκλαστογένεσης, τις CFS-1 και RANKL [53,57] και υποεκφράζουν την οστεοπροτεγερίνη (OPG) υπό την επίδραση της παραθορμόνης (PTH) [53]. Ο προσδέτης RANKL των οστεοβλαστών ελευθερώνεται από τον προσδέτη του (OPG), προσδέεται στον υποδοχέα RANK των προοστεοκλαστών και προάγει τη διαφοροποίησή τους σε πολυπύρηνες οστεοκλάστες, τον πολλαπλασιασμό τους και την

⁷ Ο παράγοντας TGF-β είναι μια πολυλειτουργική κυτοκίνη που εκφράζεται στους ιστούς. Στον οστίτη ιστό εμποδίζει την οστεοκλαστογένεση και την οστική απορρόφηση, ενώ προάγει την οστεοβλαστογένεση και την οστική παραγωγή [58].

οστεοκλαστική τους δραστηριότητα [4,27,59]. Ο παράγοντας αύξησης των αποικιών των μακροφάγων (CFS-1) είναι επίσης απαραίτητος για την οστεοκλαστογένεση [4,27,53,57].

II. Φάση οστικής απορρόφησης (*resorption phase*) (Εικόνα 35)

Κατά τη φάση της οστικής απορρόφησης οι οστεοβλάστες απελευθερώνουν στη διάμεση ουσία μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs), οι οποίες διασπών το μη επιμεταλλωμένο οστεοειδές και αποκαλύπτουν τις θέσεις πρόσδεσης των οστεοκλαστών στην επιφάνεια της επιμεταλλωμένης οστέινης ουσίας [53]. Στις θέσεις αυτές οι οστεοκλάστες προσδένονται στενά στην οστέινη ουσία δημιουργώντας τη “σφραγισμένη ζώνη” (*sealed zone*) και ελευθερώνουν ιόντα υδρογόνου που διασπών τα ανόργανα άλατά της, σχηματίζοντας μια κοιλότητα με ιδιαίτερα όξινο περιβάλλον, το βοθρίο του Howship [53,57]. Στη συνέχεια εκκρίνουν πρωτεολυτικά ένζυμα που διασπών την εναπομένουσα οργανική θεμέλια ουσία [53,57].



Εικόνα 35. Ιστολογικό παρασκεύασμα οστίτη ιστού κατά τη φάση της οστικής απορρόφησης. Παρατηρούνται οι οστεοκλάστες που απορροφούν την οστέινη ουσία στα βοθρία του Howship του οστού. Πηγή [57]

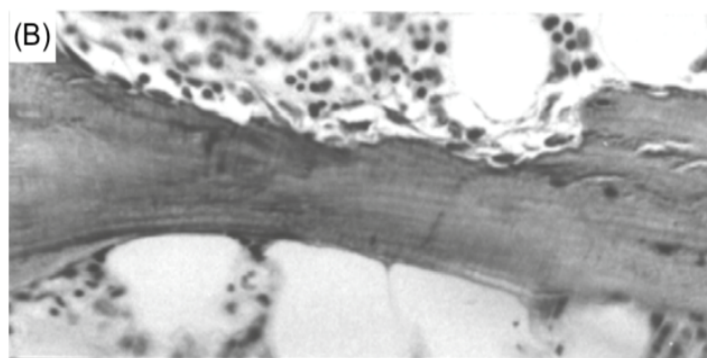
III. Φάση κυτταρικής αναστροφής (*reversal phase*) (Εικόνα 36)

Έπειτα από τη φάση της απορρόφησης της οστέινης ουσίας από τις οστεοκλάστες, επιστρατεύονται στο βοθρίο του Howship μονοκύτταρα μακροφάγα και επενδυματικά κύτταρα του οστού που απορροφούν το εναπομένον κολλαγόνο και προετοιμάζουν την επιφάνεια του οστού για την οστική παραγωγή από τους οστεοβλάστες [27,53,57]. Τα παραπάνω κύτταρα έχουν την ικανότητα να παράγουν μεταλλοπρωτεάσες και οστεοποντίνη που διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην οστική απορρόφηση από τις οστεοκλάστες [53].

Ακόμη, οι οστεοκλάστες φαίνεται πως εμπλέκονται έμμεσα στη στρατολόγηση των πρόδρομων μορφών των οστεοβλαστών στο σημείο της οστικής ανακατασκευής. Κατά

τη φάση της απορρόφησης εκλύονται βιοδραστικοί παράγοντες, όπως ο TGF- β 1 και οι ινσουλινόμορφοι αυξητικοί παράγοντες (IGF-I και IGF-II) [53,57]. Αυτοί οι παράγοντες προσελκύουν τις πρόδρομες μορφές των οστεοβλαστών, προάγουν τη διαφοροποίησή τους σε οστεοβλάστες και σηματοδοτούν την έναρξη της οστικής παραγωγής [4,27,53,57,58].

Τέλος, οι οστεοκλάστες εκφράζουν παράγοντες σύζευξης (coupling factors), όπως η 1-φωσφορική σφιγγοσίνη (S1P), που προσελκύει τις πρόδρομες μορφές των οστεοβλαστών και προάγει την επιβίωση των ώριμων μορφών τους, καθώς και το μόριο πρόσδεσης ephrin-B2 των οστεοκλαστών που συνδέεται με τον υποδοχέα EphB4 των οστεοβλαστών, ρυθμίζοντας αμφίδρομα την παύση της οστεοκλαστικής και την έναρξη της οστεοβλαστικής δραστηριότητας [53].

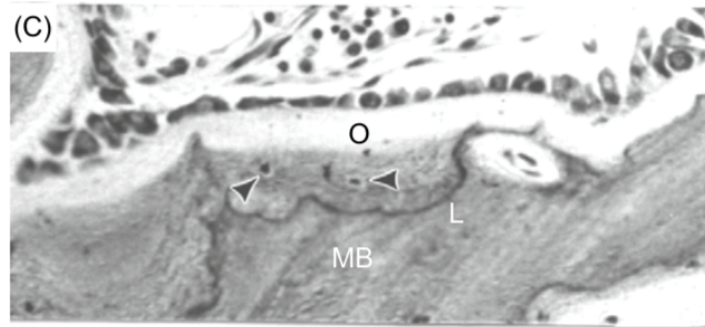


Εικόνα 36. Ιστολογικό παρασκεύασμα οστίτη ιστού στη φάση της κυτταρικής αναστροφής. Παρατηρούνται μονοκύτταρα μακροφάγα στις θέσεις οστικής απορρόφησης. Πηγή: [57]

IV. Φάση οστικής παραγωγής (*formation phase*) (Εικόνα 37)

Όταν επέλθει ο κυτταρικός θάνατος των οστεοκλαστών, οι οστεοβλάστες συνεχίζουν να στρατολογούνται και να παράγουν οστεοειδές στα σημεία της οστικής παραγωγής [27]. Σε αυτή τη φάση κύριοι ρυθμιστές φαίνεται να είναι τα οστεοκύτταρα που, υπό την επίδραση της PTH, σταματούν να εκφράζουν σκληροστίνη και επιτρέπουν την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Wnt των οστεοβλαστών που επάγει την οστική παραγωγή [53].

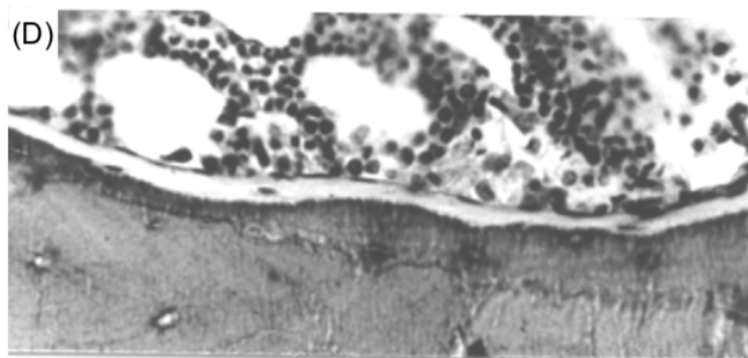
Οι οστεοβλάστες στη θέση οστικής παραγωγής παράγουν οστεοειδές (κολλαγόνο τύπου I, πρωτεΐνες της θεμέλιας ουσίας, πρωτεογλυκάνες και νερό) [4] το οποίο επιμεταλλώνεται στη συνέχεια με τη βοήθεια της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP), της νουκλεοτιδικής πυροφωσφατάσης φωσφοδιεστεράσης (NPP) και της πρωτεΐνης ANK (progressive ankylosis), που αυξάνουν την εξωκυττάρια συγκέντρωση των ανόργανων αλάτων [53].



Εικόνα 37. Ιστολογικό παρασκεύασμα οστίτη ιστού στη φάση οστικής παραγωγής. Παρατηρείται η εναπόθεση οστεοειδούς (O) από τους οστεοβλάστες που παρατάσσονται σε μονόστοιβο επιθήλιο στην ελεύθερη επιφάνεια του οστού. Ακόμη, είναι εμφανής η γραμμή μεταστροφής (L), το επιμεταλλωμένο οστό (MB) και τα οστεοκύτταρα στις οστικές κοιλότητες (βέλη). Πηγή: [57]

V. Φάση οστικής ωρίμανσης / τελείωσης (*termination phase*) (Εικόνα 38)

Έπειτα από την επιτυχή οστική ανακατασκευή με την τελική εφραλάτωση του νεοσύστατου οστίτη ιστού κάποιοι οστεοβλάστες αποπίπτουν, άλλοι παγιδεύονται στην τιτανωμένη οστέινη ουσία και μεταπίπτουν σε οστεοκύτταρα και άλλοι μετατρέπονται σε επενδυματικά κύτταρα [4,53,57]. Η σηματοδότηση της λήξης της οστικής παραγωγής φαίνεται πως προέρχεται από τα οστεοκύτταρα [4,53].



Εικόνα 38. Ιστολογικό παρασκεύασμα οστίτη ιστού στη φάση οστικής ωρίμανσης. Παρατηρούνται επενδυματικά κύτταρα στην ελεύθερη επιφάνεια του οστού. Πηγή: [57]

Οι χρόνοι πλήρωσης των φάσεων οστικής ανακατασκευής διαφέρουν, με τη φάση απορρόφησης να διαρκεί περίπου 2 εβδομάδες, τη φάση αναστροφής περί τις 4 με 5 εβδομάδες και τη φάση οστικής παραγωγής έως και 4 μήνες μέχρι την τελείωση του νέου οστεώνα [27].

Τα παραπάνω αφορούν τον οστίτη ιστό του ανθρώπου και η εφαρμογή τους σε άλλα είδη ζώων μπορεί να είναι προβληματική εξαιτίας των διαφορών τους στη φυσιολογία και στη εμβιομηχανική της κινησιολογίας τους [60].

1.6.2. Ορμονική ρύθμιση οστικής ανακατασκευής

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα οστά αποτελούν «δεξαμενή» του ασβεστίου για τον οργανισμό καθώς διαθέτουν το 99% του συνολικού ασβεστίου σε μορφή υδροξυαπατίτη. Έτσι, μέσω της συνεχούς οστικής ανακατασκευής διασφαλίζεται η ομοιοστασία του ασβεστίου στην κυκλοφορία [17,29].

Ο βασικός ορμονικός ρυθμιστής της οστικής απορρόφησης και της ομοιοστασίας του ασβεστίου στο αίμα είναι η παραθορμόνη, που εκκρίνεται από τους παραθυρεοειδείς αδένες σε συνθήκες μειωμένης συγκέντρωσης του ασβεστίου στη συστηματική κυκλοφορία [17,53,29]. Η παραθορμόνη αυξάνει τη συγκέντρωση του ασβεστίου στο αίμα αυξάνοντας την επαναρρόφησή του από τους νεφρούς και ρυθμίζοντας την παραγωγή της 1,25 διυδροξυχολοκαλσιφερόλης ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), η οποία αυξάνει με τη σειρά της την απορρόφησή του ασβεστίου από το επιθήλιο του εντέρου [17,27].

Στα οστά η παραθορμόνη προάγει την κινητοποίηση του ασβεστίου της θεμέλιας ουσίας ενεργοποιώντας τον οστικό ανασχηματισμό μέσω της οστεοκλαστογένεσης [27]. Συγκεκριμένα, προσδένεται στον υποδοχέα της στην επιφάνεια των οστεοβλαστών ενεργοποιώντας σηματοδοτικά μονοπάτια του κυττάρου που έχουν ως αποτέλεσμα την έκφραση και έκκριση παραγόντων (όπως ο RANKL), υπεύθυνων για την στρατολόγηση των προοστεοκλαστών στο σημείο, τη διαφοροποίησή τους σε οστεοκλάστες και την έναρξη της απορρόφησης του οστού [29,53].

Ο ρόλος της καλσιτριόλης ($1,25$ διυδροξυχολοκαλσιφερόλης/βιτ. D_3) στην οστική ανακατασκευή είναι αναβολικός (προάγει την οστεοσύνθεση) και η παρουσία της είναι απαραίτητη για την εντερική απορρόφηση του ασβεστίου και του φωσφόρου, που αποτελούν τα βασικότερα ανόργανα στοιχεία για την επιμετάλλωση της οστέινης ουσίας [27].

Η καλσιτονίνη (CT), που παράγεται στο θυρεοειδή αδέν, έχει μικρή επίδραση στην οστική ανακατασκευή των ενηλίκων [27]. Ωστόσο, σε περιπτώσεις αυξημένης συγκέντρωσης ασβεστίου στη συστηματική κυκλοφορία, ο φυσιολογικός της ρόλος είναι η αρνητική ρύθμιση της οστεοκλαστικής δραστηριότητας μέσω του υποδοχέα της στην επιφάνεια των οστεοκλαστών [17,27,29].

Σημαντικές είναι επίσης οι επιδράσεις της αυξητικής ορμόνης (GH) και της σωματομεδίνης (IGF-1) στην ανάπτυξη του σκελετού και στη ρύθμιση του οστικού ανασχηματισμού, των γλυκοκορτικοειδών με την αρνητική ρύθμιση της οστεοβλαστικής

δραστηριότητας και την επικουρική δράση τους στην οστική απορρόφηση, των οιστρογόνων με την αρνητική ρύθμιση της οστεοκλαστογένεσης και τη θετική επίδραση στην επιβίωση των οστεοβλαστών, των ανδρογόνων στην ανάπτυξη των οστών και των ορμονών του θυροειδούς που έχουν ρυθμιστική δράση στην οστική απορρόφηση και παραγωγή [17,27].

2. ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΟΣΤΙΚΩΝ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ

Οι δικαστικοί ανθρωπολόγοι καλούνται συχνά να ταυτοποιήσουν ένα ή περισσότερα οστά ή/και οστικά μικροτεμάχια έτσι ώστε να αποφανθούν εάν εμφανίζουν δικαστικό ενδιαφέρον [1,11,13]. Η πρωταρχική προσέγγιση αφορά τη μακροσκοπική διερεύνηση του υλικού έτσι ώστε να αποφανθούν αν πρόκειται πράγματι για οστέινο μικροτεμάχιο ή αν αφορά υλικό το οποίο ομοιάζει με οστίτη ιστό [1,2,11,61]. Αν πρόκειται για οστέινο υλικό, τότε γίνεται προσπάθεια αναγνώρισης του είδους βάσει των μακροσκοπικών χαρακτηριστικών, με ιδιαίτερη έμφαση στην επιβεβαίωση ή τον αποκλεισμό της ανθρώπινης προέλευσής του [2,4,9,11,13].

Τα ανθρώπινα οστά παρουσιάζουν σημαντικές μορφολογικές διαφορές από τα ζωικά οστά που συνήθως ανευρίσκονται [9,11,62,63] και η διαφοροποίησή τους είναι αρκετά εύκολη για έναν δικαστικό ανθρωπολόγο [2].

Στις περιπτώσεις όμως όπου τα διασωθέντα οστικά υπολείμματα ανευρίσκονται αποδομημένα, η μακροσκοπική αναγνώριση των μορφολογικών τους χαρακτηριστικών καθίσταται δυσχερής. Κατ' επέκταση, γίνεται προβληματική η επιβεβαίωση ή ο αποκλεισμός της ανθρώπινης προέλευσής τους και ο χαρακτηρισμός τους ως οστέινα υπολείμματα δικαστικού ενδιαφέροντος [2,3,61,64,65].

Ιδιαίτερα όσον αφορά την ανεύρεση οστών μεγέθους συμβατού με τα οστά ανθρώπου μικρής ηλικίας, η σύγκλιση των επιφύσεων, αν διασώζονται, μαρτυρά τη ζωική προέλευση του οστού [2]. Σε αντίθετη περίπτωση, όπου ανευρίσκονται οστικά θραύσματα χωρίς εμφανείς επιφύσεις, είναι πιθανό να προκύψει διαγνωστική σύγχυση εξαιτίας της ομοιότητας της μικροαρχιτεκτονικής των οστών ενήλικων θηλαστικών με εκείνη των οστών ανήλικων ανθρώπων [8]. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η ταυτοποίηση του είδους των ιστοτεμαχίων επιχειρείται με τις μεθόδους που αναλύονται παρακάτω.

2.1. Μέθοδοι που εφαρμόζονται

Στις περιπτώσεις όπου ανευρίσκονται μικροτεμάχια οστών για τα οποία δεν είναι εφικτή η μακροσκοπική αναγνώριση, επιστρατεύονται βιομοριακές και ιστολογικές μέθοδοι ανάλυσης για την ταυτοποίηση της ανθρώπινης ή της ζωικής προέλευσής τους [2,3,13,14,61,65-68].

Η ανάλυση του DNA καθώς και η ανάλυση των πρωτεϊνών αποτελούν τις συχνότερα χρησιμοποιούμενες βιομοριακές μεθόδους για την ταυτοποίηση της ανθρώπινης προέλευσης των οστικών υπολειμμάτων, με την ραδιοανοσολογική μέθοδο ανάλυσης πρωτεϊνών (protein radioimmunoassay-pRIA) να κερδίζει έδαφος στο πεδίο της δικαστικής ανθρωπολογίας [2,3]. Ακόμη, η τεχνική της μικροσκοπίας Raman είναι μια συνδυαστική τεχνική μικροσκοπίας και φασματοσκοπίας που επιτρέπει την ανάλυση των δομικών υλικών του εξεταζόμενου δείγματος και μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία ακόμα και σε πολύ μικρά ιστοτεμάχια [69,70].

Η ανάλυση των πρωτεϊνών με τη χρήση αέριου χρωματογράφου και φασματογράφου μάζας αποτελούν ακόμη δύο τεχνικές για τον προσδιορισμό της ταυτότητας των οστικών υπολειμμάτων. Οι τεχνικές αυτές καθίστανται ιδιαίτερα χρήσιμες όταν δεν είναι δυνατή η απομόνωση του DNA, όπου συνυπάρχει επιμόλυνση ή/και κατακερματισμός του, εξαιτίας της αποδόμησης των οστών οφειλόμενη στους φυσικοχημικούς και βιολογικούς παράγοντες του ταφικού περιβάλλοντος [71].

Ωστόσο, η ανάλυση των πρωτεϊνών και η απομόνωση καθαρού γενετικού υλικού από τα οστικά υπολείμματα δεν είναι πάντοτε εφικτή, όπως σε περιπτώσεις προχωρημένης αποσύνθεσής εξαιτίας της δράσης των μικροοργανισμών του εδάφους [71], σε περιπτώσεις έκθεσής τους σε υψηλές θερμοκρασίες [68] και εν γένει σε οστικά μικροτεμάχια που εμφανίζουν εκτεταμένη αποδόμηση [13,14,66-68]. Ιδιαίτερα όσον αφορά τα αποτεφρωμένα οστά, η μικροσκοπική παρατήρηση αποτελεί τη μέθοδο εκλογής, καθώς φαίνεται πως διατηρείται η μικροσκοπική τους δομή [68], αν και άλλοι ερευνητές παρατήρησαν συρρίκνωση των ιστολογικών χαρακτηριστικών σε αποτεφρωμένα ανθρώπινα μηριαία οστά [4].

Οι παραπάνω λόγοι, καθώς και ο χρόνος και το υψηλό κόστος που απαιτείται για τις ανωτέρω τεχνικές, καθιστούν την ιστολογική διερεύνηση των οστικών μικροτεμαχίων τη συχνότερη μέθοδο επιλογής [3,4,13-15,61].

Έχουν προηγηθεί αρκετές συγκριτικές ιστολογικές μελέτες, οι οποίες παρουσιάζονται στα επόμενα κεφάλαια, που αφορούν στην ταυτοποίηση του είδους εκ

του οποίου προέρχεται το εξεταζόμενο οστό. Σε περιπτώσεις όπου ανευρίσκονται οστέινα μικροτεμάχια η συνεκτίμηση της ποιοτικής και της ποσοτικής μικροσκοπικής εικόνας, δηλαδή της ιδιαίτερης μικροαρχιτεκτονικής του ιστού και των ιστομορφομετρικών⁸ του χαρακτηριστικών, είναι η ασφαλέστερη ιστολογική μέθοδος διερεύνησης για την, κατά το δυνατόν, ταυτοποίηση του είδους από το οποίο προέρχονται [4,5,14,61,66].

Η μέθοδος παρατήρησης των ιστολογικών παρασκευασμάτων με οπτικό μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου είναι μια εύχρηστη, οικονομική και ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος που παρέχει αξιόπιστα αποτελέσματα [4]. Η μέθοδος παρατήρησης με τη χρήση πολωτικού μικροσκοπίου (γραμμικού ή κυκλικού πολωτή) είναι ακόμη μια δημοφιλής μέθοδος μελέτης ιστολογικών οστικών τομών δικαστικού ενδιαφέροντος [4,64], που επιτρέπει την παρατήρηση της κατεύθυνσης των κολλαγόνων ινών της οργανικής ουσίας του οστού και συνεπώς της ιδιαίτερης μικροαρχιτεκτονικής του [4]. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ιδιότητα της διπλοθλαστικότητας (birefringence) του οστίτη ιστού καθώς αποτελεί, κατά κύριο λόγο, ένα ανισότροπο υλικό με αποτέλεσμα την εμφάνιση σκοτεινών και φωτεινών σημείων που σχετίζονται με την κατεύθυνση των κολλαγόνων ινών του φλοιώδους οστού [4,12,26,64,72,73]. Κατ' αυτόν τον τρόπο σε μια εγκάρσια τομή πεταλιώδους οστίτη ιστού, οι επιμήκεις ίνες κολλαγόνου εμφανίζονται σκοτεινές και οι εγκάρσιες φωτεινές [26], ενώ αν συνυπάρχει δικτυωτός οστίτης ιστός αυτός εμφανίζεται σκοτεινός, καθώς δεν παρουσιάζει διπλοθλαστικότητα [12,72].

Άλλες τεχνικές οπτικής μικροσκοπίας που εφαρμόζονται στο πεδίο της δικαστικής ανθρωπολογίας με σκοπό τη διερεύνηση του είδους προέλευσης του οστικού μικροτεμαχίου είναι η μικροσκοπία σκοτεινού πεδίου, η μικροσκοπία φθορισμού, η μικροσκοπία αντίθεσης διαφορικής συμβολής-Nomarski [64], η συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με ακτίνες Laser (confocal laser scanning microscopy), η οπτική μικροσκοπία σάρωσης κοντινού πεδίου (Scanning Near Field Optical Microscopy, SNOM) [4] και άλλες [74].

Ακόμη, βρίσκουν εφαρμογή τεχνικές ηλεκτρονικής μικροσκοπίας όπως η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης και διέλευσης (SEM-TEM) [75]. Επιπλέον, η μικροσκοπία σάρωσης οπισθοσκεδαζόμενων ηλεκτρονίων (BSE-TEM) είναι μια

⁸ Ιστομορφομετρία είναι ο υπολογισμός των μετρήσιμων χαρακτηριστικών της μικροδομής του ιστού με τη χρήση υπολογιστικών προγραμμάτων ανάλυσης εικόνας [4,85].

απεικονιστική τεχνική που επιτρέπει τη λεπτομερή παρατήρηση της μικροαρχιτεκτονικής δομής του οστέινου ιστοτεμαχίου καθώς και τις ταφονομικές αλλοιώσεις τις μικροδομής του [64,76]. Ωστόσο, δεν επιτρέπει τη διάκριση της κατεύθυνσης των κολλαγόνων ινών, η οποία είναι εφικτή μόνο με τη χρήση πολωτικής μικροσκοπίας [4,77].

Άλλες απεικονιστικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται στο πεδίο, είναι η μικροϋπολογιστική τομογραφία (micro-CT) [4,5] και ειδικότερα η μικροϋπολογιστική τομογραφία βασισμένη σε ακτινοβολία σύγχροτρον (SR micro-CT), που έχει χρησιμοποιηθεί για την ιστομορφομετρική ανάλυση μικροδομών του οστίτη ιστού, όπως είναι τα οστικά βοθρία [5,61]. Ακόμη, έχει χρησιμοποιηθεί ως βοηθητικό εργαλείο για την επιλογή του κατάλληλου σημείου λήψης του οστικού δείγματος, βάση κυτταροβρίθειας, για την απομόνωση πυρηνικού DNA [61]. Η αξονική τομογραφία (CT) έχει χρησιμοποιηθεί σε μια συγκριτική μελέτη των μετρήσιμων χαρακτηριστικών του πόρου της τροφοφόρου αρτηρίας μηριαίων και βραχιονίων οστών ανθρώπων, χοίρων και προβάτων, όπου παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές συγκριτικά με το είδος του οστού και το είδος στο οποίο ανήκει [67].

Η μέθοδος της ιστομορφομετρίας εφαρμόζεται συνήθως σε εφαιλατωμένες ιστολογικές τομές οστών χρωματισμένες με ειδικές χρώσεις ή μη χρωματισμένες, αναλόγως των χαρακτηριστικών της μικροδομής του ιστού που θέτονται υπό αξιολόγηση [4].

Έχουν περιγραφεί διάφορες μέθοδοι παρασκευής εφαιλατωμένων ιστολογικών τομών οστίτη ιστού [78-82]. Επίσης περιγράφονται τεχνικές χρώσεων αυτών των παρασκευασμάτων με αιματοξυλίνη-ηωσίνη [83], χρώσεις αργύρου, ενώσεων του οσμίου, εμπότιση του ιστολογικού παρασκευάσματος με μεταλλικά άλατα [84], τρίχρωμη χρώση Masson, χρώση Mallory-Azan [48], χρώση Von Kossa/Van Gieson, χρώση Movat Pentachrome [85], χρώση Schmorl's [86], οι οποίες χρησιμοποιούνται και σε εφαιλατωμένες τομές οστών [82].

Αξίζει να αναφερθεί ότι η παρατήρηση της μικροαρχιτεκτονικής δομής του ιστού είναι δυνατή σε ιστολογικές τομές εφαιλατωμένων ξηρών οστών, ενώ στα ιστολογικά παρασκευάσματα εφαιλατωμένων οστών είναι δυνατή η παρατήρηση των κυττάρων και της οργανικής ουσίας του ιστού [48].

Οι μετρήσεις που προκύπτουν κατά την ιστομορφομετρική ανάλυση ενός στατιστικά σημαντικού δείγματος μπορούν να αναλυθούν περαιτέρω με στατιστικές μεθόδους διακριτικής ανάλυσης (discriminant function analysis) για την αναγωγή τους στον

πληθυσμό και τη στατιστικά σημαντική διάκριση του είδους στο οποίο ανήκουν τα ανευρεθέντα οστικά υπολείμματα [4].

Ένα υπολογιστικό σύστημα που συνδυάζει την επεξεργασία και την ανάλυση εικόνας με στατιστικά συμπεράσματα χαρτογραφώντας τα εξεταζόμενα χαρακτηριστικά του ιστού είναι το Σύστημα Γεωγραφικών Πληροφοριών (GIS-Geographic Information System), το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο στις ιστολογικές μελέτες οστών από οποιοδήποτε είδος και αν προέρχονται [87].

Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί ότι δεν είναι πάντα εφικτή η ταυτοποίηση του είδους μέσω της μικροσκοπικής διερεύνησης των οστικών υπολειμμάτων [67]. Συνήθως όμως, είναι εφικτός ο αποκλεισμός της πιθανότητας να αποτελούν υπολείμματα ανθρώπινης προέλευσης και συνεπώς να μπορούν να χαρακτηριστούν ως οστικά μικροτεμάχια μη δικαστικού ενδιαφέροντος [2,4].

Ακόμη δυσκολότερη είναι η διαφοροποίηση των ζωικών οστικών μικροτεμαχίων από εκείνα τα οποία ανήκουν σε ανήλικους ανθρώπους, καθώς παρουσιάζουν ομοιότητες στην μικροαρχιτεκτονική τους δομή [13]. Επιπλέον, οι ταφονομικές αλλοιώσεις που ενδέχεται να προκαλέσουν απόσπαση των επιφανειακών στρωμάτων του φλοιώδους οστού [71,76] και ιδιαίτερα η δράση των εδαφικών μικροοργανισμών που προκαλούν αλλοιώσεις στη μικροδομή των οστών, αποτελούν ακόμη έναν περιοριστικό παράγοντα [71] για την ταυτοποίηση του είδους [68].

2.2. Ποιοτική μικροσκοπική διαφοροποίηση

Ο φλοιός των οστών ακόμη και του ίδιου ατόμου εμφανίζει διαφορές στη μικροσκοπική του κατασκευή [4,12] εξαιτίας των διαφορετικών τρόπων ανάπτυξης και ανακατασκευής του [4]. Διαφοροποιήσεις στη μικροαρχιτεκτονική δομή του φλοιού των οστών, δηλαδή στα ποιοτικά ιστολογικά χαρακτηριστικά του ιστού, παρατηρούνται και μεταξύ των διαφορετικών ειδών θηλαστικών, παρόλο που διαθέτουν τα ίδια δομικά στοιχεία (Πίνακας 1) [4,66].

Έχουν προηγηθεί αρκετές ιστολογικές μελέτες που στόχο είχαν την παρατήρηση και καταγραφή των ιδιομορφιών της μικροαρχιτεκτονικής του οστίτη ιστού διαφόρων ειδών ζώων καθώς και του ανθρώπου, με τις πρωιμότερες αυτών να είναι του Foote [88], των Enlow και Brown [45] και των Francillon-Vieillot et al. [23].

Οι διαφοροποιήσεις που παρατηρούνται στη μικροαρχιτεκτονική του οστίτη ιστού βάσει του ποσοστού εναπόθεσης διαφορετικών ιστολογικών τύπων, όπως είναι ο πεταλιώδης, ο ελασματοειδής (κατά τον Foote) και ο δευτερογενείς με Αβέρσεια συστήματα οστίτη ιστός, είναι ιδιαίτερα σημαντικές για τη διερεύνηση της ανθρώπινης ή της ζωικής προέλευσης των οστέινων τεμαχίων και την, κατά το δυνατόν, ταυτοποίηση του ζωικού είδους στο οποίο ανήκουν [4,13,14,66,88].

Σε γενικές γραμμές, ο ιστολογικός τύπος που απαντάται στο φλοιώδη οστίτη ιστό κατά τα πρώτα στάδια της ζωής των θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου, είναι ο ινώδης (δικτυωτός) οστίτη ιστός [4,13,72]. Στη συνέχεια, κατά κανόνα αντικαθίσταται από υπότυπους του ινοπεταλιώδους οστίτη ιστού, όπως είναι ο πλεγματοειδής, ο ακτινωτός και ο ακανόνιστος δικτυωτός στα θηλαστικά που αφορούν τη συγκεκριμένη μελέτη και από πεταλιώδη οστίτη ιστό με Αβέρσεια συστήματα στους ανθρώπους [4,64,66,72,84]. Ωστόσο, υπότυποι ινοπεταλιώδους οστίτη ιστού παρατηρούνται και στα οστά ανήλικων ανθρώπων που βρίσκονται σε ταχεία σκελετική ανάπτυξη και δεν θα πρέπει να θεωρούνται αποκλειστικό χαρακτηριστικό των ζωικών οστών [4,12-14,72].

Ακόμη, καθώς η ανακατασκευή του οστίτη ιστού λαμβάνει χώρα σε όλα τα μεγάλα θηλαστικά, όπως τα αρτιοδάκτυλα και τα σαρκοφάγα που εξετάζουμε, παρατηρείται δευτερογενείς οστίτη ιστός με Αβέρσεια συστήματα σε διαφορετική συχνότητα και πυκνότητα στα οστά των παραπάνω ειδών και δεν θα πρέπει να θεωρείται αποκλειστικό χαρακτηριστικό των ανθρώπινων οστών [4,12,64,65,72,89]. Τέλος, η ύπαρξη

συστάδων οστεώνων, χαρακτηριστικό που θεωρείτο αποκλειστικά ζωικό, έχει παρατηρηθεί σε αρκετές ιστολογικές μελέτες ανθρώπινων οστών [4,90].

Πίνακας 1. Οι κυριότεροι ιστολογικοί τύποι που συναντώνται στα οστά των θηλαστικών. Συναντώνται επίσης και συνδυασμοί αυτών. Πηγές: [23,68]

Τύποι πρωτογενούς πεταλιώδους οστίτη ιστού	Τύποι πρωτογενούς δικτυωτού οστού	Τύποι δευτερογενούς οστού
1. Πεταλιώδης-στερούμενος αγγείωσης (<i>lamellar non-vascular</i>)	I. Δικτυωτός-στερούμενος αγγείωσης (<i>fibrous non-vascular bone</i>)	A. Δευτερογενής με διάσπαρτους οστεώνες (<i>scattered osteons</i>)
2. Πεταλιώδης-πρωτογενούς αγγείωσης (<i>lamellar-primary vascular canals</i>)	II. Δικτυωτός-πρωτογενούς αγγείωσης (<i>fibrous bone-primary vascular canals</i>)	A.1. Δευτερογενής με ακανόνιστους διάσπαρτους οστεώνες (<i>scattered osteons with no organisation/irregular</i>)
2.1. Επιμήκους αγγείωσης (<i>longitudinal</i>)	II.α. Επιμήκους αγγείωσης (<i>longitudinal</i>)	A.2. Δευτερογενείς με διάσπαρτους οστεώνες σε συστάδες (<i>scattered osteon banding</i>)
2.2. Κυκλικής αγγείωσης (<i>circular</i>)	II.β. Κυκλικής αγγείωσης (<i>circular</i>)	B. Πυκνός δευτερογενής (<i>dense osteons</i>)
2.3. Ακανόνιστης δικτυωτής αγγείωσης (<i>reticular</i>)	II.γ. Ακανόνιστης δικτυωτής αγγείωσης (<i>reticular</i>)	B.1. Πυκνός δευτερογενής με ακανόνιστους οστεώνες (<i>dense osteons with no organisation/irregular</i>)
2.4. Ακτινωτής αγγείωσης (<i>radial</i>)	II.δ. Ακτινωτής αγγείωσης (<i>radial</i>)	B.2. Πυκνός δευτερογενής με συστάδες οστεώνων (<i>circular rows of dense osteons</i>)
3. Πεταλιώδης με πρωτογενείς οστεώνες (<i>lamellar with primary osteons</i>)	III. Δικτυωτός με πρωτογενείς οστεώνες -Ινοπεταλιώδης (<i>fibro-lamellar complex</i>)	
3.1. Επιμήκεις πρωτογενείς οστεώνες (<i>longitudinal primary osteons</i>)	III.α. Ινοπεταλιώδης ελασματοειδής/ ψευδοελασματοειδής (<i>laminar/ pseudo-laminar</i>)	
3.2. Επιμήκεις πρωτογενείς οστεώνες με ακτινωτούς αγγειακούς σωλήνες (<i>longitudinal primary osteons with radial canals</i>)	III.β. Ινοπεταλιώδης πλεγματοειδής (<i>plexiform</i>)	
3.3. Επιμήκεις πρωτογενείς οστεώνες με ακανόνιστους δικτυωτούς αγγειακούς σωλήνες (<i>longitudinal primary osteons with reticular canals</i>)	III.γ. Ινοπεταλιώδης ακανόνιστος δικτυωτός (<i>reticular</i>)	
3.4. Επιμήκεις πρωτογενείς οστεώνες σε κυκλική στοίχιση (<i>longitudinal primary osteons in circular rows</i>)	III.δ. Ινοπεταλιώδης ακτινωτός (<i>radial</i>)	

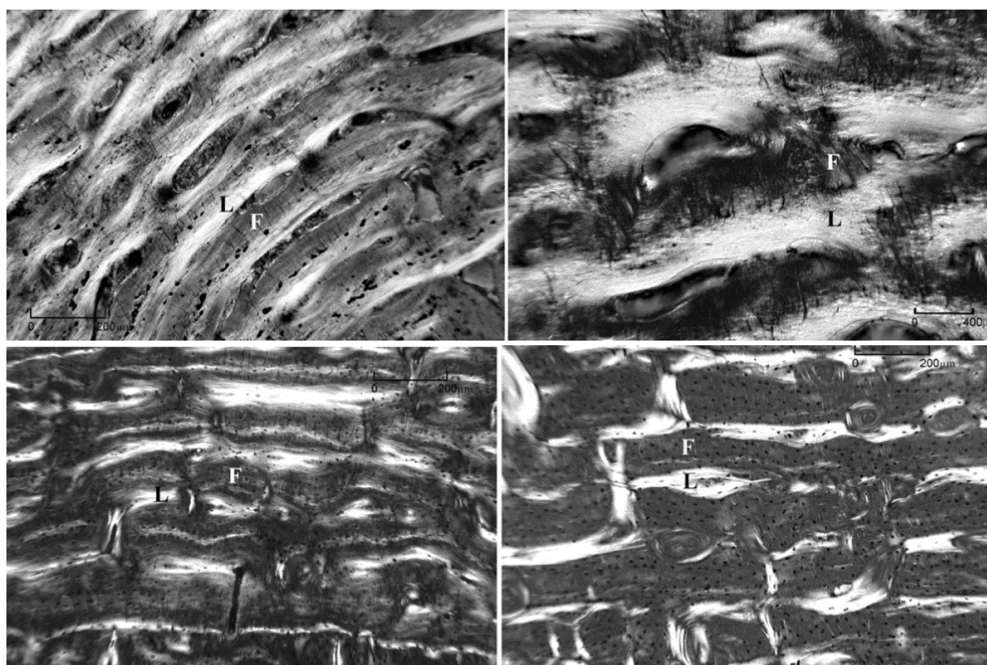
Στα παρακάτω υποκεφάλαια περιγράφονται λεπτομερώς τα ποιοτικά μικροσκοπικά χαρακτηριστικά που έχουν παρατηρηθεί στον ιστό των μακρών οστών και των

πλευρών του ανθρώπου, των βοοειδών, των αιγοπροβάτων, του χοίρου, του σκύλου και της γάτας.

2.2.1. Άνθρωπος

Η πρώτη μορφή φλοιώδους οστίτη ιστού που συναντάται στα νεογνά είναι αυτή του ινοπεταλιώδους, ο οποίος αντικαθίσταται κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας από πρωτογενές και δευτερογενές πεταλιώδες οστό [4,8,64,89,91].

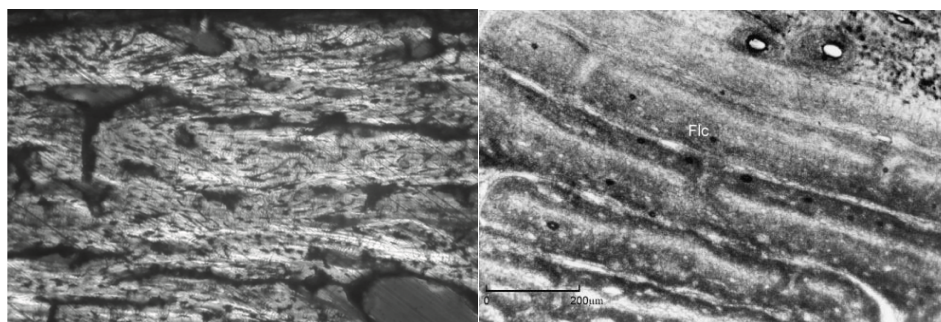
Η παρουσία ινοπεταλιώδους οστού στον άνθρωπο παρατηρείται επίσης σε περιόδους ταχείας ανάπτυξης του σκελετού, όπως κατά τη βρεφική, τη νηπιακή ηλικία και την εφηβεία [8,13,66,68,92], κατά την διαδικασία της πάρωσης καταγμάτων [68], καθώς και σε φλεγμονώδεις εξεργασίες [64], αλλά διαθέτει διαφορετική δομική συμμετρία σε σχέση με τον πλεγματοειδή ινοπεταλιώδη οστίτη οστό των λοιπών θηλαστικών (Εικόνα 39) [8,68]. Αυτό συμβαίνει στον άνθρωπο διότι ο πεταλιώδης οστίτης ιστός, που δημιουργείται κατά την οστεογένεση από το περίοστεο, ενσωματώνει ελάχιστα επιμήκη αγγεία [93] με αποτέλεσμα την εμφάνιση ενός ή δύο στρωμάτων ελασματοειδούς τύπου οστίτη ιστού που περιορίζεται στο περιφερικό φλοιώδες οστό, έσω του περίοστεου [4].



Εικόνα 39. Ιστολογικά παρασκευάσματα εφαιλωμένων τομών μακρών οστών παρατηρούμενα με τη μέθοδο της μικροσκοπίας αντίθεσης διαφορικής συμβολής (DIC-Nomarski). Επάνω αριστερά: ινοπεταλιώδης ελασματοειδής οστίτης ιστός μηριαίου οστού νεογνού (άνθρωπος). Επάνω δεξιά: η ίδια ιστολογική τομή σε μεγέθυνση. Κάτω αριστερά: ινοπεταλιώδης πλεγματοειδής οστίτης ιστός οστού κερκίδας προβάτου. Κάτω δεξιά: ινοπεταλιώδης

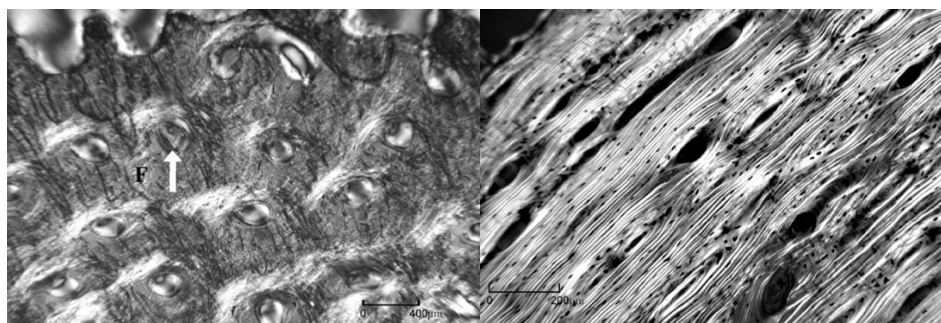
πλεγματοειδής οστίτης ιστός οστού κερκίδας χοίρου. F: ινώδης L: πεταλιώδης οστίτης ιστός. Είναι εμφανής η υπεροχή του ινώδους έναντι του πεταλιώδους οστίτη ιστού στις ιστολογικές τομές των ζωικών οστών σε αντίθεση με τα ανθρώπινα οστά όπου υπερτερεί ο πεταλιώδης έναντι του ινώδους οστίτη ιστού. Πηγή: [92]

Ωστόσο, η ταυτοποίηση οστέινων μικροτεμαχίων που επιδεικνύουν αποκλειστικά πλεγματοειδή οστίτη ιστό παραμένει προβληματική (Εικόνα 40) [8]. Σε περιπτώσεις όπου τα οστέινα τεμάχια επιδεικνύουν επιπροσθέτως πεταλιώδη οστίτη ιστό και μορφολογικά στοιχεία δευτερογενούς οστού, τότε η ταυτοποίηση προσανατολίζεται προς την ανθρώπινη προέλευση ανήλικου ατόμου [8].



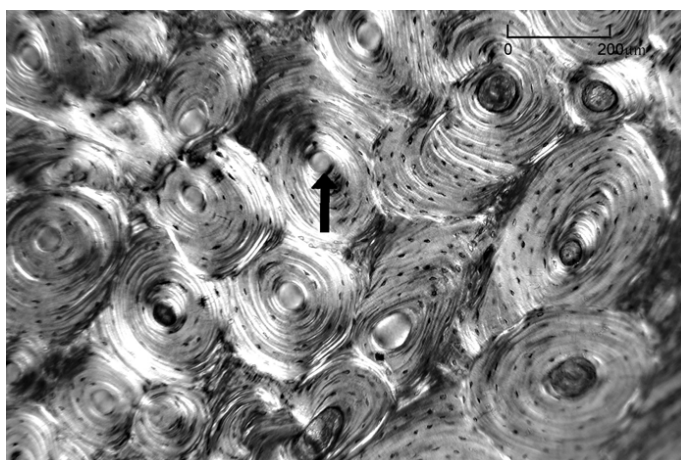
Εικόνα 40. Ιστολογικά παρασκευάσματα οστίτη ιστού πλευράς παιδιού 2 ετών που έχει υποστεί αλλοιώσεις διαγένεσης (αριστερά) και απανθρακωμένου οστού ζωικής προέλευσης (δεξιά). Το ανθρώπινο οστό σε μια τέτοια περίπτωση δεν παρουσιάζει σαφή εικόνα της μικροαρχιτεκτονικής του δομής και είναι πιθανή η λανθασμένη ταυτοποίησή του ως ζωικού εξαιτίας της ομοιότητάς τους. Πηγή: [8] (αριστερά). Πηγή: [68] (δεξιά)

Στην παιδική ηλικία παρατηρείται υψηλό ποσοστό εναπόθεσης περιμυελικού και περιφερικού πρωτογενούς πεταλιώδους οστού, καθώς και πρωτογενών οστεώνων, ενώ η παρουσία δευτερογενών οστεώνων, που είναι αποτέλεσμα ανακατασκευής του οστίτη ιστού, πληθαίνει με την πάροδο του χρόνου (Εικόνα 41) [8,89,92,94]. Ωστόσο, περιοχές οστικής ανακατασκευής έχουν βρεθεί στα μακρά οστά και στις πλευρές ακόμη και από την εμβρυική και νεογνική ηλικία [8,95], γεγονός που σχετίζεται με τις ενδομήτριες εμβρυικές κινήσεις, με μεταβολικούς παράγοντες καθώς και με τις αναπνευστικές κινήσεις του εμβρύου που ξεκινούν από την 10^η εβδομάδα της κύησης [95].

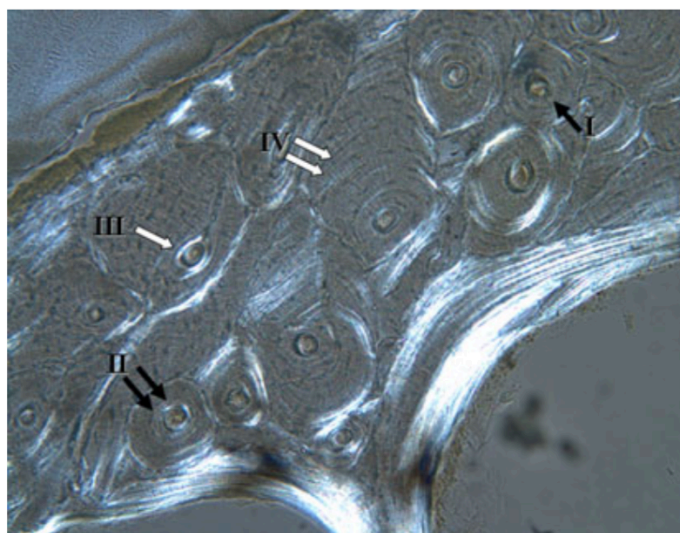


Εικόνα 41. Ιστολογικά παρασκευάσματα εφαιλατωμένων τομών μακρών οστών παρατηρούμενα με τη μέθοδο της μικροσκοπίας αντίθεσης διαφορικής συμβολής (DIC-Nomarski). Αριστερά: οστίτης ιστός κνήμης νεογνού 4 ημερών. Παρατηρούνται πρωτογενείς οστεάνες (βέλος) σε έδαφος δικτυωτού οστίτη ιστού (F). Δεξιά: πρωτογενής πεταλιώδης οστίτης ιστός μηριαίου οστού παιδιού 4,5 ετών. Πηγή: [92]

Η συχνότερη μορφή δευτερογενών οστεώνων που απαντάται στα οστά των ανήλικων ατόμων είναι οι μετακινούμενοι οστεάνες (Εικόνα 42) [12,15,50], ενώ ο συμπαγής οστίτης ιστός των ενηλίκων απαρτίζεται σχεδόν εξολοκλήρου από ανέπαφους, τύπου I, II και III δευτερογενείς οστεάνες, καθώς και θραύσματα αυτών, τα οποία προκύπτουν συνεπεία της απορρόφησης του οστού κατά την οστική ανακατασκευή (Εικόνα 43) [4,15,50,64].

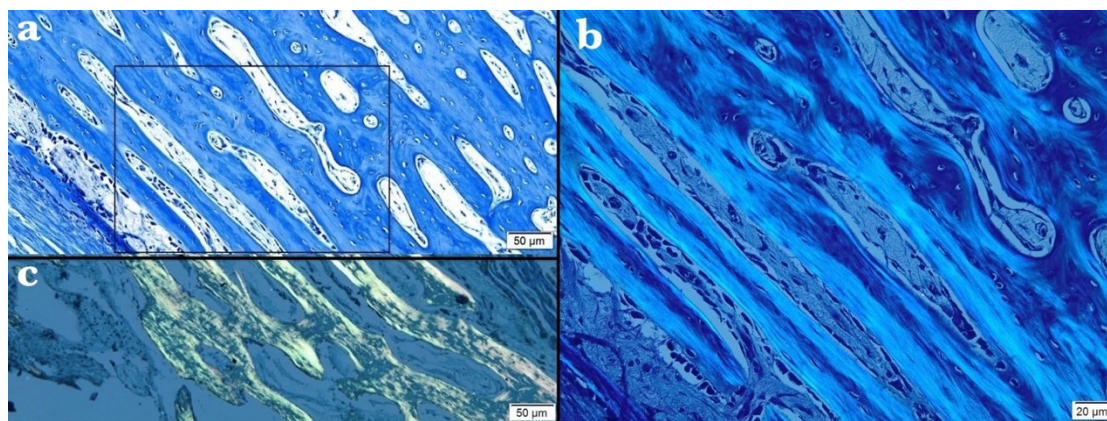


Εικόνα 42. Ιστολογικό παρασκεύασμα εφαιλατωμένης τομής μακρού οστού παιδιού 9,5 ετών παρατηρούμενη με τη μέθοδο της μικροσκοπίας αντίθεσης διαφορικής συμβολής (DIC-Nomarski). Παρατηρείται ο πυκνός δευτερογενής οστίτης ιστός με οστεάνες τύπου I και μετακινούμενους οστεάνες. Το βέλος απεικονίζει τον Αβέρσειο σωλήνα. Δεν παρατηρούνται σωλήνες του Volkmann. Πηγή: [92]



Εικόνα 43. Ιστολογικό παρασκεύασμα ανθρώπινης πλευράς. Απεικονίζονται οι τέσσερις τύποι οστεώνων: τύπου I οστεώνας, τύπου II-ένθετος οστεώνας, τύπου III-οστεώνας διπλής ζώνης και τύπου IV-μετακινούμενος οστεώνας. Πηγή: [15]

Αναφορικά με τα εμβρυικά οστά δύναται να εμφανίζουν χόνδρινο ιστό, δικτυωτό οστίτη ιστό και δευτερογενή οστίτη ιστό, ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο στο οποίο βρίσκεται το έμβρυο. Χρειάζεται προσοχή κατά την ταυτοποίησή τους, ιδιαίτερα αν αφορούν μικροτεμάχια, καθώς παρουσιάζουν ομοιότητες μεγέθους και σχήματος με οστά προερχόμενα από ζώα [64].



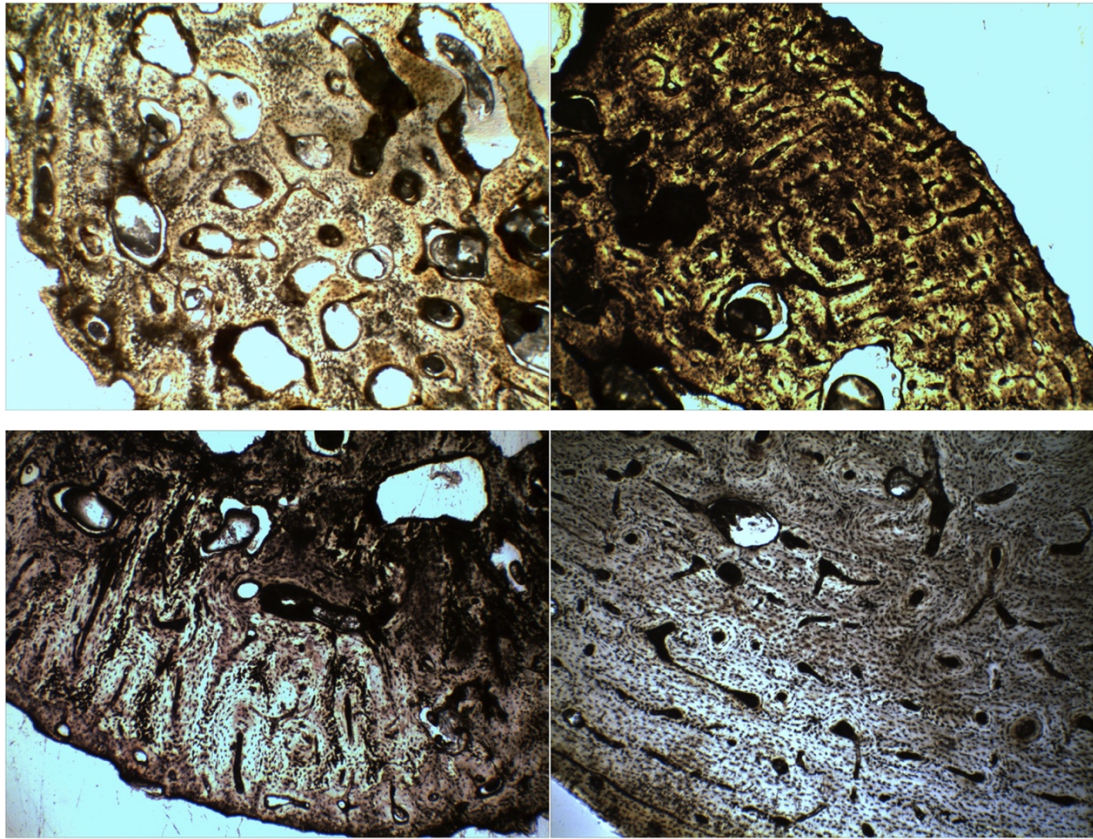
Εικόνα 44. Ιστολογικά παρασκευάσματα διαμήκους τομής εμβρυικών μακρών οστών. a: Μηριαίο οστό εμβρύου χοίρου. Παρατηρείται η ύπαρξη ινοπεταλιώδους οστού σε οπτικό μικροσκόπιο. b: Απεικονίζεται η επιλεγμένη περιοχή της πρώτης εικόνας σε μεγέθυνση σε πολωτικό μικροσκόπιο. Ο δικτυωτός οστίτης ιστός απεικονίζεται σκούρος μπλε ενώ ο πεταλιώδης οστίτης ιστός γαλάζιος με χρώση τουλοϊδίνης 1% c: Σε αντιπαραβολή απεικονίζεται οστό κνήμης ανθρώπινου εμβρύου 4-4,5 μηνών. Απεικονίζεται ο δικτυωτός οστίτης ιστός με σκούρο πράσινο, ενώ ο πεταλιώδης οστίτης ιστός με ανοιχτό κίτρινο χρώμα με χρώση safranin O/fast green σε πολωτικό μικροσκόπιο. Πηγή: [72]

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μιας ερευνητικής μελέτης σε ιστολογικές τομές φλοιώδους οστίτη ιστού μακρών οστών νεογνών βρέθηκε ότι, ο πεταλιώδης οστίτης

ιστός κυριαρχεί επί του δικτυωτού (Εικόνα 44), ενώ κατά την παιδική ηλικία ο οστίτης ιστός εμφανίζει αποκλειστικά πεταλιώδη όψη και περιλαμβάνει πυκνά Αβέρσεια συστήματα και διάμεσα συστήματα πεταλιώδους οστίτη ιστού [72].

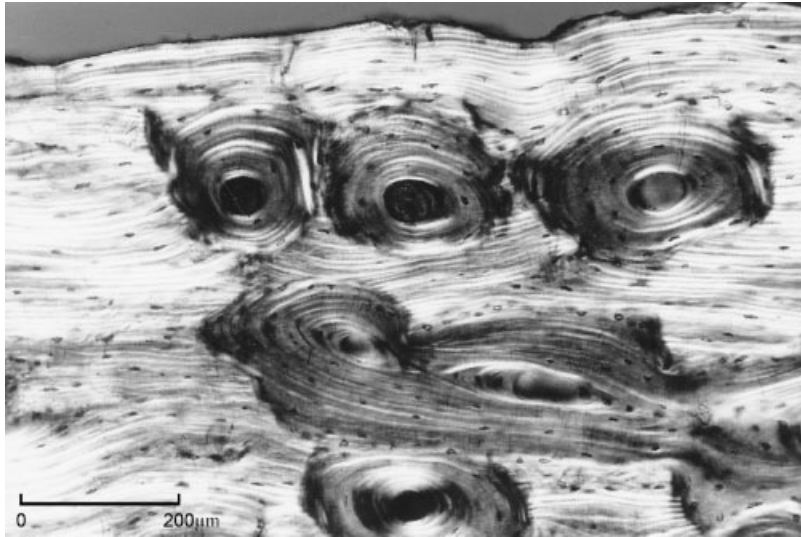
Άλλοι ερευνητές εξέτασαν ιστολογικές τομές μηριαίων οστών ανήλικων ατόμων από διαφορετικές ηλικιακές ομάδες και παρατήρησαν στα βρέφη, που ήταν νεότερα του ενός έτους, με φθίνουσα συχνότητα: δικτυωτό οστίτη ιστό, πλεγματοειδή οστίτη ιστό, ακανόνιστο οστίτη ιστό και πεταλιώδη οστίτη ιστό με ακτινωτή εμφάνιση [13]. Στα νήπια ηλικίας 1-5 ετών παρατηρήθηκαν: δικτυωτός οστίτης ιστός, συστάδες οστεώνων (osteon banding) και ακανόνιστο δικτυωτό οστό (reticular bone), ενώ στις μεγαλύτερες ηλικίες και έως 20 ετών, ο πεταλιώδης οστίτης ιστός με πρωτογενείς και δευτερογενείς οστεώνες ήταν ο κυρίαρχος ιστολογικός τύπος (Εικόνα 45) [13]. Ωστόσο, παρατηρήθηκε δευτερογενής ακανόνιστος δικτυωτός οστίτης ιστός⁹ σε μια περίπτωση, όπου θα μπορούσε να ταυτοποιηθεί λανθασμένα ως ζωικό οστικό τεμάχιο, αφού αυτός ο τύπος είχε παρατηρηθεί μόνο σε ζωικά οστά [13].

⁹ Δευτερογενής οστίτης ιστός με ακανόνιστη μικροαρχιτεκτονική εικόνα η οποία οφείλεται στους πολυπληθείς σωλήνες του Volkmann που διασταυρώνονται με τους σωλήνες του Havers [13].



Εικόνα 45. Ιστολογικά παρασκευάσματα μη αφαλατωμένων μηριαίων οστών. Επάνω αριστερά: Δικτυωτός οστίτης ιστός βρέφους νεότερο του έτους. Επάνω δεξιά: Ινοπεταλιώδης πλεγματοειδής οστίτης ιστός βρέφους νεότερο του έτους. Κάτω αριστερά: Πεταλιώδης οστίτης ιστός με ακτινωτή εμφάνιση σε βρέφος νεότερο του έτους. Κάτω δεξιά: Ακανόνιστος δικτυωτός οστίτης ιστός που παρουσιάζει επί προσθέτως συστάδες πρωτογενών οστεώνων, νηπίου 1-5 ετών. X40 Πηγή: [13]

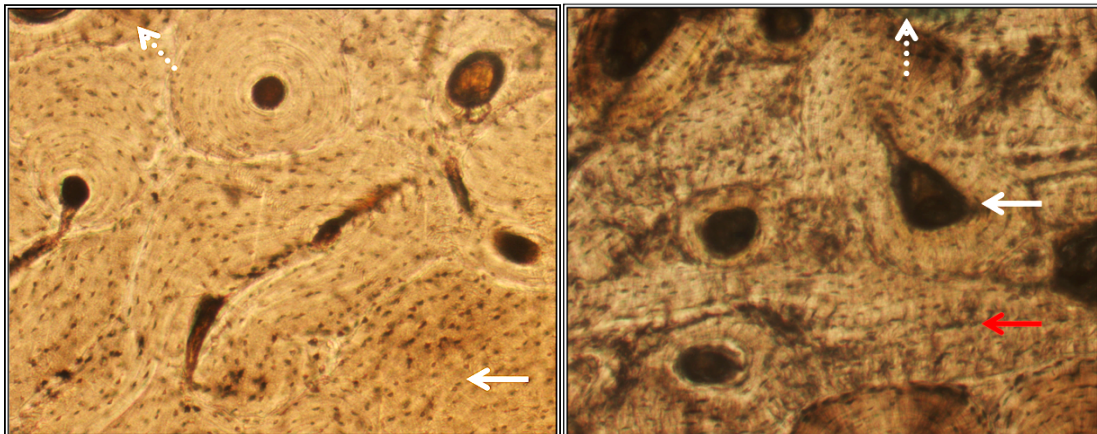
Όσον αφορά στον αριθμό των πρωτογενών οστεώνων που παρατηρήθηκαν σε μεμονωμένες συστάδες στα οστά ανήλικων ατόμων, ήταν λιγότεροι από πέντε στη σειρά [13], εύρημα που επιτρέπει τη διαφοροποίηση από τα ζωικά οστά, καθώς συνήθως τα δεύτερα παρουσιάζουν εκτεταμένες σειρές συστάδων οστεώνων, που αποτελούν διαγνωστικό κριτήριο για την ταυτοποίηση της ζωικής προέλευσής τους [13,96]. Ωστόσο, έχουν παρατηρηθεί περιοχές στο φλοιό ανθρώπινων οστών που παρουσιάζουν οστεώνες παρατεταγμένους σε σειρά και για το λόγο αυτό θα πρέπει να εξετάζονται με ιδιαίτερη προσοχή, ώστε να μην συγχέονται με τις συστάδες οστεώνων που παρατηρούνται σε οστά μη ανθρώπινης προέλευσης (Εικόνα 46) [61].



Εικόνα 46. Ιστολογικό παρασκεύασμα μηριαίου οστού ανθρώπου. Παρατηρείται μια μπάντα τριών δευτερογενών οστεώνων έσω του περιόστεου. Πηγή: [68]

Αξίζει να αναφερθεί ότι στην παραπάνω μελέτη παρατηρήθηκε πλεγματοειδής οστίτης ιστός μόνο σε οστά βρεφών μικρότερα του έτους, επομένως, σύμφωνα με τους ερευνητές, αν το οστικό τεμάχιο ανήκει σε άνθρωπο μεγαλύτερο του έτους δεν προκαλείται σύγχυση κατά την ταξινόμηση ως ανθρώπινο ή ζωικό εξαιτίας του συγκεκριμένου ιστολογικού τύπου [13].

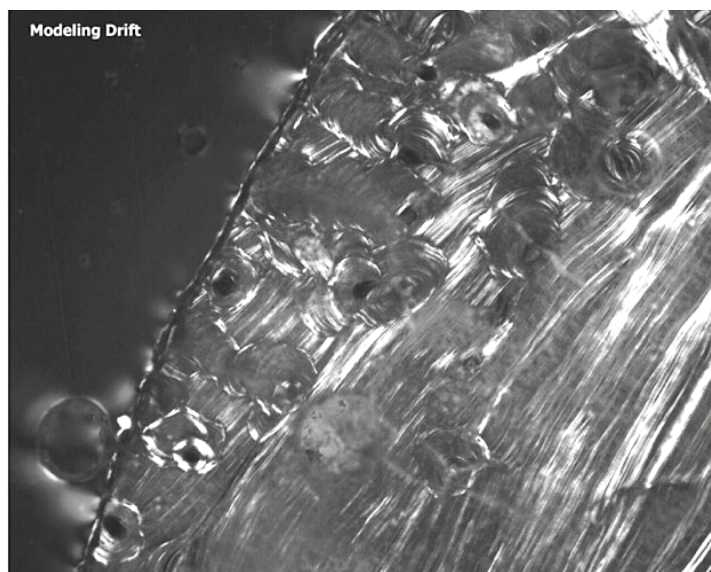
Σε διαφορετικές ιστολογικές μελέτες που αφορούσαν μακρά οστά ανήλικων ατόμων βρέθηκε ότι ο ακανόνιστος δευτερογενής οστίτης ιστός με διάσπαρτους οστεώνες είναι ο ιστολογικός τύπος που απαντάται συχνά [66,97,98]. Συχνή είναι επίσης η εντόπιση σωλήνων του Volkmann και επιμήκως διατεταγμένων πρωτογενών οστεώνων σε περιόδους έντονης σκελετικής ανάπτυξης καθώς και οι εκτεταμένοι μεγέθους και ακανόνιστου σχήματος περιοχές οστικής απορρόφησης (Εικόνα 47) [98].



Εικόνα 47. Ιστολογικά παρασκευάσματα εφαιλωμένων, μη κερωσμένων τομών οστίτη ιστού κνήμης (αριστερά) και μηριαίου οστού (δεξιά) ανήλικων ανθρώπων. Αριστερά: Παρατηρείται ακανόνιστος δευτερογενής οστίτης ιστός

με διάσπαρτους οστεώνες, σωλήνες του Volkmann και μη ανακατασκευασμένα διάμεσα συστήματα (βέλος). Δεξιά: Παρατηρείται ακανόνιστος δευτερογενής οστίτης ιστός, μη ανακατασκευασμένα διάμεσα συστήματα (κόκκινο βέλος) και περιοχές οστικής απορρόφησης (λευκό βέλος). Διακεκομμένο βέλος: κατεύθυνση του περιόστεου. X100
Πηγή: [97]

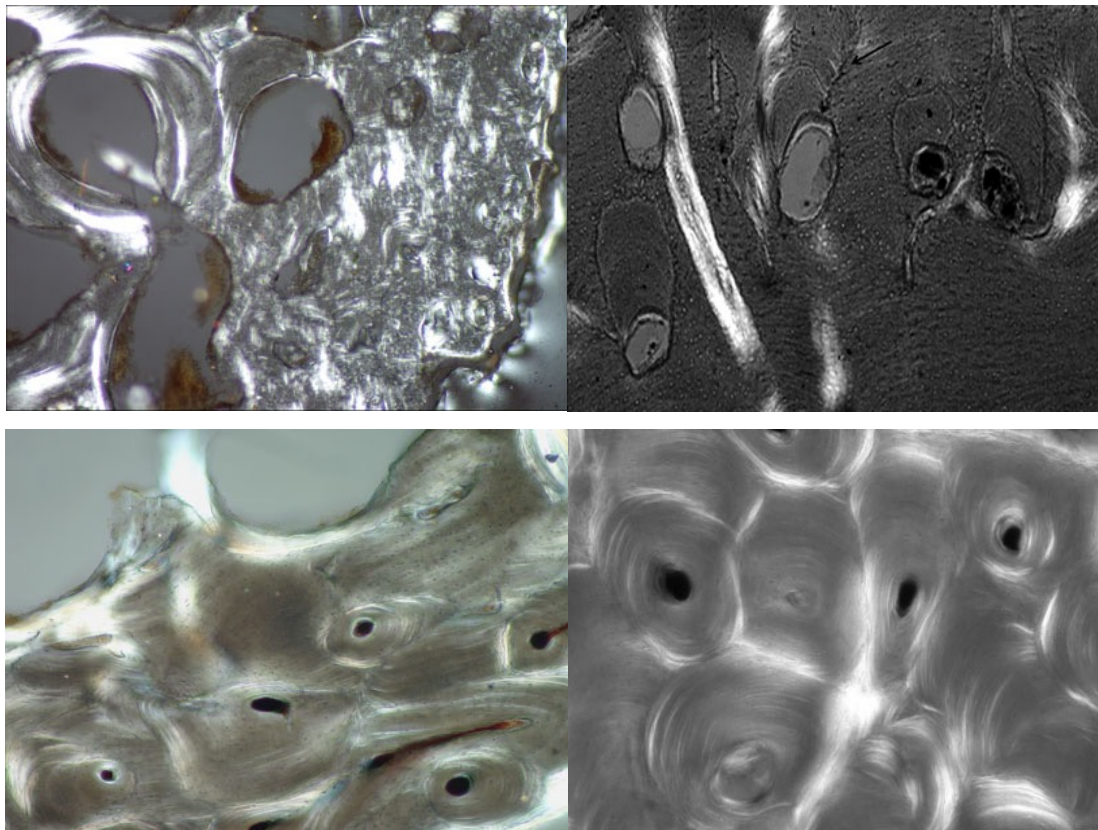
Σε ιστολογικές μελέτες που αφορούσαν πλευρές ανήλικων ατόμων παρατηρήθηκαν εκτεταμένες περιοχές πρωτογενούς πεταλιώδους οστίτη ιστού καθώς και μετακινούμενοι οστεώνες κυρίως στην υπεζωκοτική μοίρα του φλοιώδους οστού (pleural cortex) [99]. Σύμφωνα με άλλους ερευνητές, οι μετακινούμενοι οστεώνες καταλαμβάνουν το 53% των περιοχών οστικής απορρόφησης του φλοιώδους οστού των πλευρών ανήλικων ατόμων [15]. Ακόμη, σε ιστολογικές τομές πλευρών βρέθηκαν δευτερογενείς οστεώνες από την ηλικία του ενός έτους, ο αριθμός των οποίων αυξανόταν με την ηλικία, ενώ από την ηλικία των δύο ετών εμφάνιζαν λοξή κατεύθυνση και στροβιλώδη μορφή ακολουθούμενοι την φλοιϊκή μετατόπιση (Εικόνα 48) [8].



Εικόνα 48. Ιστολογικό παρασκεύασμα πλευράς ανθρώπου 16 ετών. Παρατηρούνται οι λοξοί μετακινούμενοι οστεώνες έσω του περιόστεου που ακολουθούν τη φλοιϊκή μετατόπιση. Πηγή: [8]

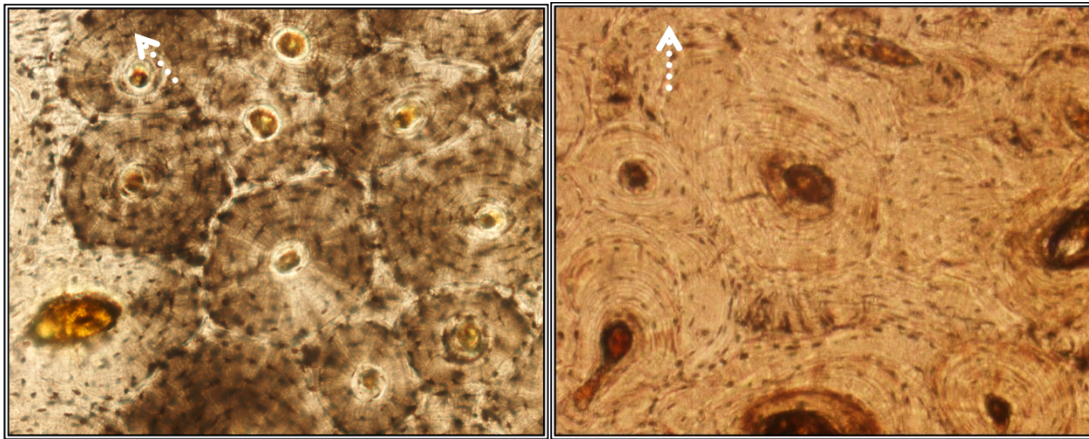
Σε ακόμη μια ιστολογική μελέτη που αφορούσε πλευρές ανήλικων ατόμων έως 5 ετών παρατηρήθηκε δικτυωτός οστίτης ιστός και πρωτογενείς αγγειακοί σωλήνες στον έξω φλοιό και δικτυωτός οστίτης ιστός και πρωτογενής πεταλιώδης οστίτης ιστός στον έσω φλοιό [100]. Στον οστίτη ιστό πλευρών ατόμων ηλικίας 5 ως 9 ετών παρατηρήθηκαν μετακινούμενοι οστεώνες, σωλήνες του Volkmann και εκτεταμένη εναπόθεση πρωτογενούς πεταλιώδους οστίτη ιστού, κυρίως στον έσω φλοιό [100]. Στις ηλικίες 10 έως 17 ετών παρατηρήθηκε η παρουσία μετακινούμενων οστεώνων και στον

έξω φλοιού, καθώς και κοιλοτήτων οστικής απορρόφησης. Στον οστίτη ιστό πλευρών ατόμων 18 έως 21 ετών παρατηρήθηκε η αντικατάσταση των μετακινούμενων οστεώνων από τύπου I δευτερογενείς οστεώνες, μικρότερη έκταση πρωτογενούς πεταλιώδους οστίτη ιστού και απουσία δικτυωτού οστού (Εικόνα 49) [100].



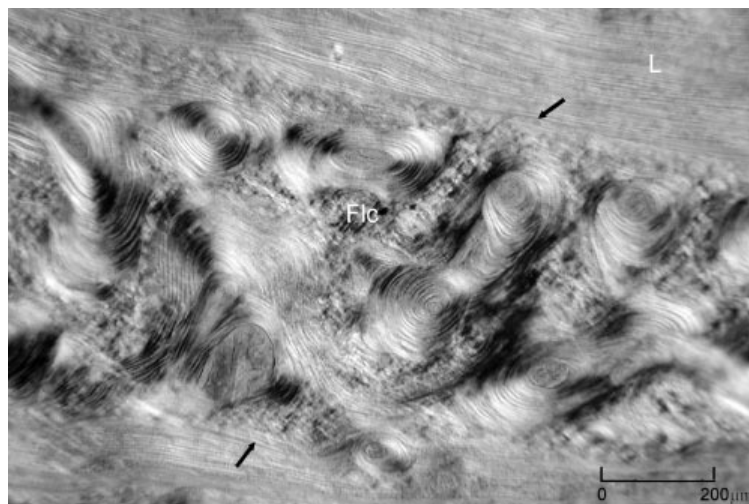
Εικόνα 49. Ιστολογικά παρασκευάσματα οστίτη ιστού πλευρών, παρατηρούμενα με πολωτικό μικροσκόπιο. Πάνω αριστερά: Παρατηρούνται ο δικτυωτός οστίτης ιστός και οι πρωτογενείς αγγειακοί σωλήνες στον έξω φλοιό πλευράς ατόμου 2 ετών. Πάνω δεξιά: Παρατηρούνται οι μετακινούμενοι οστεώνες, έσω του περιόστεου, στον έσω φλοιό πλευράς ατόμου 6 ετών. Κάτω αριστερά: Παρατηρείται έντονη ανακατασκευή του οστίτη ιστού με μετακινούμενους οστεώνες και νεοσχηματιζόμενο οστίτη ιστό, έξω του ενδόστεου στο έσω φλοιό της πλευράς ατόμου 17 ετών. Κάτω δεξιά: Παρατηρείται πυκνός δευτερογενής οστίτης ιστός με δευτερογενείς οστεώνες τύπου I στον έξω φλοιό της πλευράς ατόμου 19 ετών. X200 Πηγή: [100]

Αναφορικά με ιστολογικές μελέτες που αφορούσαν οστά μηριαίου και κνήμης ενήλικων ατόμων βρέθηκε κυρίως ακανόνιστος και πυκνός δευτερογενής οστίτης ιστός καθώς και περιοχές οστίτη ιστού πρωτογενούς επιμήκους αγγείωσης και μη αγγειώδους οστίτη ιστού [97,98]. Ακόμη, παρατηρήθηκαν σωλήνες του Volkmann καθώς και περιοχές οστικής απορρόφησης, ενώ παρουσίαζαν λεπτές περιοχές περιφερικού πεταλιώδους ιστού, έσω του περιόστεου που διακόπτονταν από διάσπαρτους οστεώνες [97,98]. Οι οστεώνες που παρατηρήθηκαν ήταν μεσαίου έως μεγάλου μεγέθους και στρογγυλού σχήματος (Εικόνα 50) [97,98].



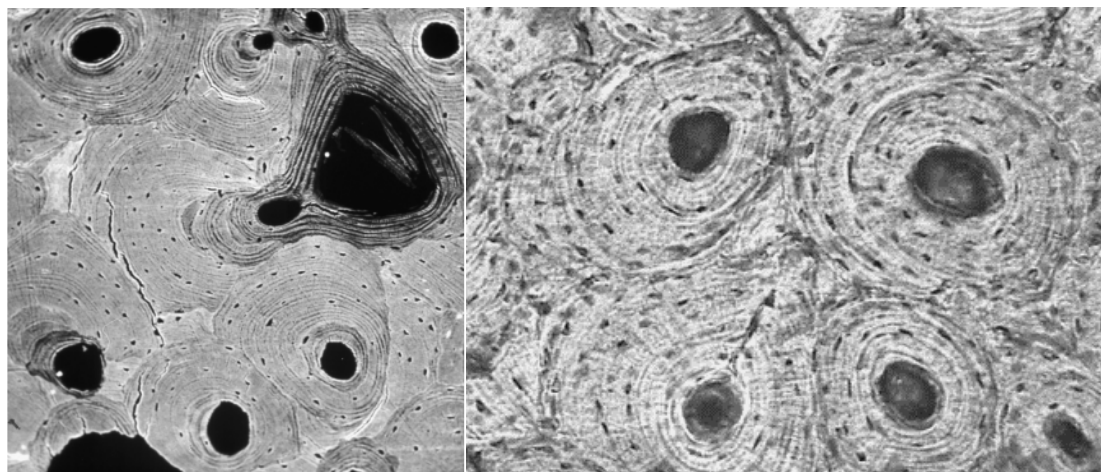
Εικόνα 50. Ιστολογικά παρασκευάσματα εφαιλωμένων, μη κεχρωσμένων τομών οστίτη ιστού κνήμης (αριστερά) και μηριαίου οστού (δεξιά) ενήλικων ανθρώπων. Αριστερά: Παρατηρείται πυκνός δευτερογενής οστίτης ιστός, σχεδόν ελλείπει διάμεσων συστημάτων. Δεξιά: Παρατηρείται πυκνός δευτερογενής οστίτης ιστός με ελάχιστα διάμεσα συστήματα. Διακεκομμένο βέλος: Κατεύθυνση του περιόστεου. Πηγή: [97]

Σε ακόμη μία ιστολογική μελέτη μακρών ανθρώπινων οστών βρέθηκαν περιοχές πρωτογενούς πεταλιώδους οστίτη ιστού που στερείται αγγείωσης, περιοχές πεταλιώδους οστίτη ιστού με πρωτογενείς οστεώνες, περιοχές απορρόφησης και ανακατασκευής του πρωτογενούς οστίτη ιστού με την εμφάνιση δευτερογενούς οστίτη ιστού, ενώ σπανιότερα παρατηρήθηκαν σωλήνες του Volkmann, συστάδες οστεώνων (σε ένα άτομο, που αριθμούσαν σε τρεις σε σειρά στο περιόστεο) και δικτυωτό οστό σε μια περιοχή οστικής ανάπτυξης (Εικόνα 51) [68].



Εικόνα 51. Ιστολογικό παρασκεύασμα εφαιλωμένης εγκάρσιας τομής μηριαίου οστού ανθρώπου 28 ετών παρατηρούμενη με τη μέθοδο της μικροσκοπίας αντίθεσης διαφορικής συμβολής (DIC-Nomarski). Παρατηρείται δικτυωτός οστίτης ιστός σε μια περιοχή οστικής ανάπτυξης (αφορίζεται από τα βέλη), όπου βρίσκονται πρωτογενείς οστεώνες επιμήκους κατεύθυνσης (Flc – fibrolamellar complex) . L: πεταλιώδης οστίτης ιστός. Πηγή: [68]

Άλλοι ερευνητές παρατήρησαν πυκνό δευτερογενή οστίτη ιστό σε ιστολογικές τομές μακρών οστών ανθρώπου [66], περιφερικά, περιμυελικά και διάμεσα συστήματα πεταλιώδους οστού με διάσπαρτους δευτερογενείς οστεώνες στη μεγαλύτερη περιοχή του φλοιού [15,64], δευτερογενείς και πρωτογενείς οστεώνες, καθώς και περιοχές οστικής απορρόφησης [64,89], δευτερογενή οστίτη ιστό με δευτερογενείς οστεώνες και διάμεσα συστήματα [12,64] και έλλειψη παρουσίας δικτυωτού οστού (Εικόνα 52) [12].

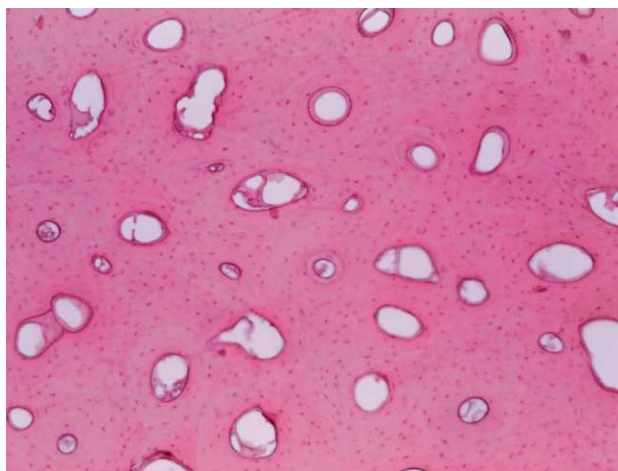


Εικόνα 52. Αριστερά: Ιστολογική τομή εφαιλατωμένου οστού κνήμης ενήλικου ανθρώπου εξεταζόμενη με ανιχνευτή οπισθοσκεδαζόμενων ηλεκτρονίων σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (BSE-SEM). Παρατηρούνται δευτερογενείς οστεώνες και περιοχές οστικής απορρόφησης και ανακατασκευής. Πηγή: [64] Δεξιά: Ιστολογικό παρασκεύασμα μη εφαιλατωμένου μηριαίου οστού ενήλικου ανθρώπου εξεταζόμενο με οπτικό μικροσκόπιο. Παρατηρείται ο πυκνός δευτερογενής οστίτης ιστός. X200 Πηγή: [66]

Αναφορικά με τη μικροαρχιτεκτονική δομή του δευτερογενούς οστίτη ιστού που απαντάται στα ανθρώπινα οστά φαίνεται πως οι δευτερογενείς οστεώνες στα νεαρά άτομα εμφανίζουν πιο οργανωμένη διάταξη και λιγότερο εκτεταμένα διάμεσα συστήματα από τους δευτερογενείς οστεώνες των ενηλίκων που εμφανίζονται σε άτακτη διάταξη, με υψηλό ποσοστό κατακερματισμένων οστεώνων και εκτεταμένα διάμεσα συστήματα [64].

Η διαφοροποίηση του ανθρώπινου δευτερογενή οστίτη ιστού από εκείνον που εμφανίζεται στα οστά ορισμένων θηλαστικών μπορεί να στηριχθεί στο γεγονός ότι οι άνθρωποι δευτερογενείς οστεώνες εμφανίζονται πιο στρογγυλοί στο σχήμα τους και συχνά αλληλεπικαλύπτονται με τυχαία διάταξη [66]. Σε αντιπαραβολή, οι δευτερογενείς οστεώνες των λοιπών θηλαστικών εμφανίζουν συχνά και ανάλογα με το είδος λιγότερο στρογγυλό σχήμα, μικρότερο μέγεθος και πιο οργανωμένη διάταξη [8]. Ακόμη, στα

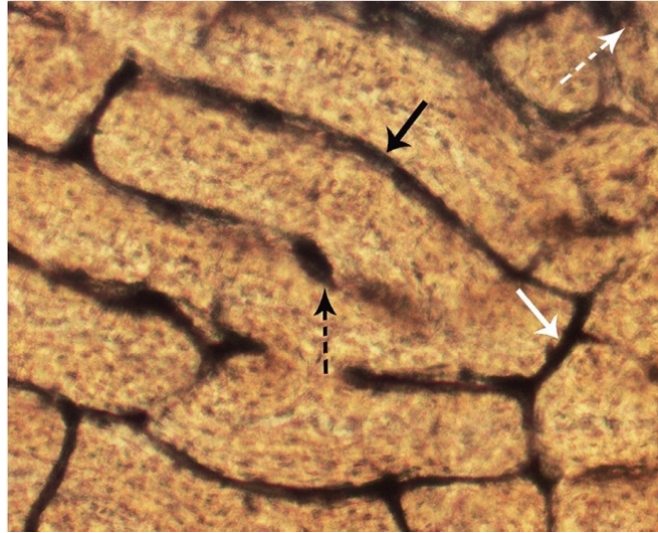
ανθρώπινα οστά οι σωλήνες του Havers εμφανίζονται παράλληλοι με τον επιμήκη άξονα των οστών (Εικόνα 53), ενώ εκείνοι των ζώων εμφανίζουν, συχνά, λοξή πορεία [3].



Εικόνα 53. Ιστολογικό παρασκεύασμα αφαιρωμένης, εγκάρσιας τομής οστού κνήμης ανθρώπου. Παρατηρείται ο πυκνός δευτερογενής οστίτης ιστός με τους επιμήκεις σωλήνες του Havers. (H&E, X40) Πηγή: [3]

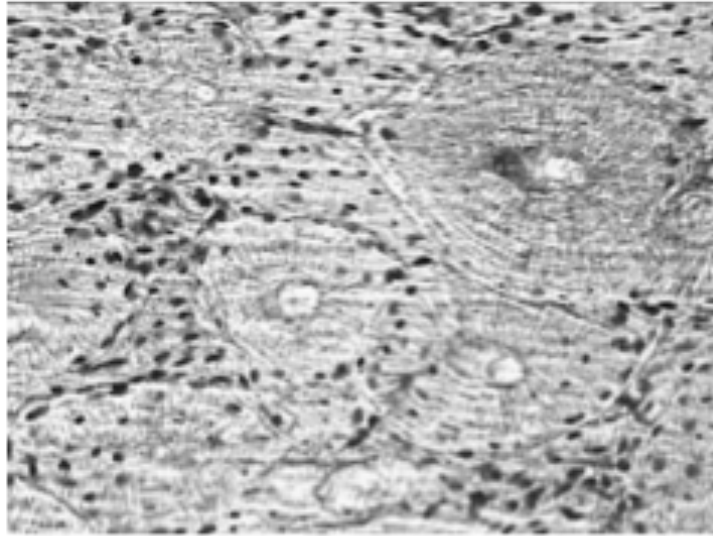
2.2.2. Βοοειδή

Η τυπική ιστολογική εικόνα της μικροαρχιτεκτονικής του οστίτη ιστού των βοοειδών (*Bos taurus*) είναι αυτή του πλεγματοειδούς οστού πρωτογενούς αγγείωσης (primary vascular plexiform bone), που αποτελεί υπότυπο του ινοπεταλιώδους οστίτη ιστού [4,45,64,68,97,98,101,102]. Η χαρακτηριστική στρωματοποίηση του συγκεκριμένου ιστολογικού τύπου προκύπτει από τη σύνδεση των γειτονικών επιμήκως και κυκλικώς διατεταγμένων αγγειακών σωλήνων με τους, μικρού μήκους, ακτινωτώς διατεταγμένους αγγειακούς σωλήνες και η εικόνα αυτή είναι όμοια τόσο σε επιμήκεις, όσο και σε εγκάρσιες ιστολογικές τομές (Εικόνα 54) [45]. Η παρουσία του πλεγματοειδούς τύπου οστού στα οστά των βοοειδών οφείλεται στην ταχεία ανάπτυξή τους, που ολοκληρώνεται στα τρία με τέσσερα έτη της ζωής τους και επιτρέπει τη διαφοροποίησή τους από τον οστίτη ιστό του ανθρώπου [68].



Εικόνα 54. Ιστολογικό παρασκεύασμα μηριαίου οστού βοοειδούς. Παρατηρείται η χαρακτηριστική διαστρωμάτωση του πλεγματοειδούς οστίτη ιστού με τους κυκλικά διατεταγμένους αγγειακούς σωλήνες (μαύρο βέλος), τους επιμήκεις αγγειακούς σωλήνες (διακεκομμένο μαύρο βέλος) και τους ακτινωτούς αγγειακούς σωλήνες (λευκό βέλος). Το λευκό διακεκομμένο βέλος υποδεικνύει τη θέση του περιόστεου. Εφαλατωμένη τομή. x100. Πηγή: [98]

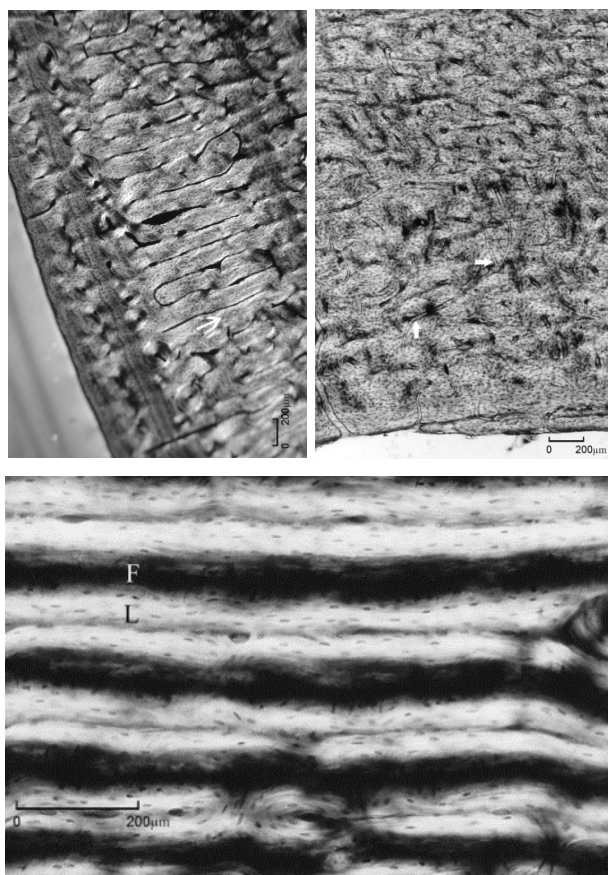
Σε σχετικές ιστολογικές μελέτες οστίτη ιστού μακρών οστών που αφορούσαν βοοειδή (συγκεκριμένα το είδος *Bos taurus*), βρέθηκε ότι ο πλεγματοειδής οστίτης ιστός εντοπίζεται κυρίως στα περιφερικά συστήματα του συμπαγούς οστού, έσω του περιόστεου, ενώ στα διάμεσα και στα περιμυελικά συστήματα, έξω του ενδόστεου, εντοπίζεται πυκνός δευτερογενής οστίτης ιστός (Εικόνα 55) [4,45,66,102]. Ακόμη, παρατηρήθηκε δευτερογενείς οστίτης ιστός με οστεώνες στις περιοχές μυϊκών ενθέσεων [93]. Ωστόσο, σε οστίτη ιστό κνήμης από νεογέννητα βοοειδή εντοπίστηκε αποκλειστικά πλεγματοειδές οστό, ενώ σε νεαρά βοοειδή ηλικίας έως ενός έτους παρατηρήθηκε η ύπαρξη πλεγματοειδούς οστίτη ιστού, σε συνδυασμό με διάσπαρτους δευτερογενείς οστεώνες [4].



Εικόνα 55. Ιστολογικό παρασκεύασμα εφαιλατωμένου μηριαίου οστού βοοειδούς. Παρατηρείται η παρουσία πυκνού δευτερογενούς οστίτη ιστού. x200. Πηγή: [102]

Επιπλέον, ορισμένοι ερευνητές παρατήρησαν την παρουσία οστίτη ιστού που στερείται αγγείωσης [66,68,98,102]. Συγκεκριμένα, στο μηριαίο οστό αγελάδας παρατηρήθηκε μια μικρή περιοχή μη αγγειώδους οστίτη ιστού [98]. Ακόμη, παρατηρήθηκε ότι η περιμυελική περιοχή του μηριαίου οστού αγελάδας αποτελούταν από μια ζώνη μη αγγειώδους οστού που χαρακτηριζόταν από ομόκεντρα πετάλια οστίτη ιστού με οστεοκύτταρα και στερούταν πρωτογενείς και δευτερογενείς αγγειακούς σωλήνες [102]. Μη αγγειώδες οστό βρέθηκε επίσης σε περιοχές του μηριαίου οστού στα όρια με το περίοστεο [66,102]. Τέλος, μη αγγειώδης οστίτης ιστός εντοπίστηκε στα σημεία ανάπτυξης (growth layers) που παρεμβαλλόταν από περιοχές πλεγματοειδούς οστού [68,101]. Σύμφωνα με τους ερευνητές η παρουσία μη αγγειώδους οστίτη ιστού υποδεικνύει ότι το οστό ανήκει σε βοοειδές [66,102].

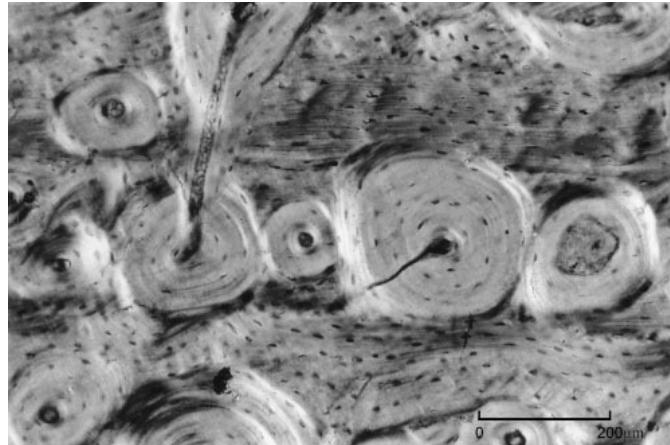
Εκτός των ανωτέρω τυπικών ιστολογικών τύπων που συναντώνται στον οστίτη ιστό βοοειδών, ερευνητές εντόπισαν περιοχές με υπότυπους ινοπεταλιώδους οστού, όπως ελασματοειδές, ακανόνιστο δικτυωτό και ακτινωτό οστίτη ιστό, πάντα σε συνδυασμό με πλεγματοειδές οστό (Εικόνα 56) [68,97,101].



Εικόνα 56. Ιστολογικά παρασκευάσματα εφαιλατωμένων τομών μακρών οστών βοοειδών παρατηρούμενες με τη μέθοδο της μικροσκοπίας αντίθεσης διαφορικής συμβολής (DIC-Nomarski). Αριστερά: Ινοπεταλιώδης ακτινωτός οστίτης ιστός. Δεξιά: Ινοπεταλιώδης ακανόνιστος δικτυωτός οστίτης ιστός. Τα βέλη απεικονίζουν τη χαρακτηριστική μορφολογία του κάθε ιστολογικού τύπου. Πηγή: [68] Κάτω: Ινοπεταλιώδης ελασματοειδής οστίτης ιστός. F: ινώδης, L: πεταλιώδης. Πηγή: [101]

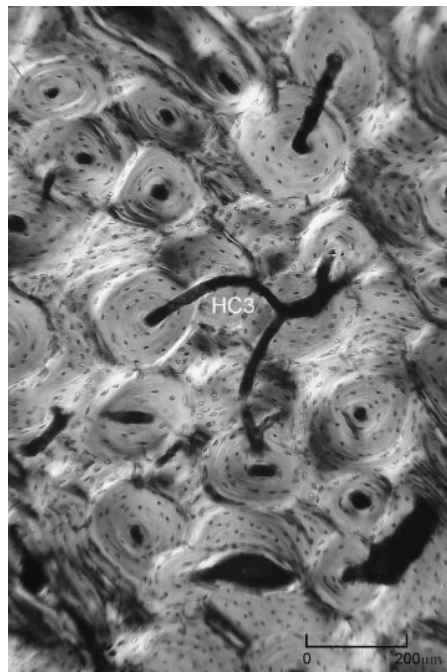
Ο δευτερογενής οστίτης ιστός των μακρών οστών των βοοειδών που μελετήθηκαν, παρουσίασε σημαντικές ομοιότητες με το δευτερογενή οστίτη ιστό του ανθρώπου, όπως η εκτεταμένη ή/και αποκλειστική παρουσία του σε ορισμένες ιστολογικές τομές, η ακανόνιστη οργάνωση των πυκνών Αβέρσειων συστημάτων και η ύπαρξη επιμήκων Αβέρσειων σωλήνων [68].

Μια διαφορά του δευτερογενούς οστίτη ιστού ανάμεσα στα δύο είδη είναι η παρουσία συστάδων δευτερογενών οστεώνων στα οστά των βοοειδών στις περιοχές των διάσπαρτων δευτερογενών οστεώνων (Εικόνα 57) [68]. Ωστόσο, αυτό το φαινόμενο δεν παρατηρείται, συνήθως, στον πυκνό δευτερογενή οστίτη ιστό των βοοειδών [68], ενώ έχει παρατηρηθεί σε μικρότερη έκταση και συχνότητα σε ιστολογικές τομές ανθρώπινων μηριαίων οστών [96].

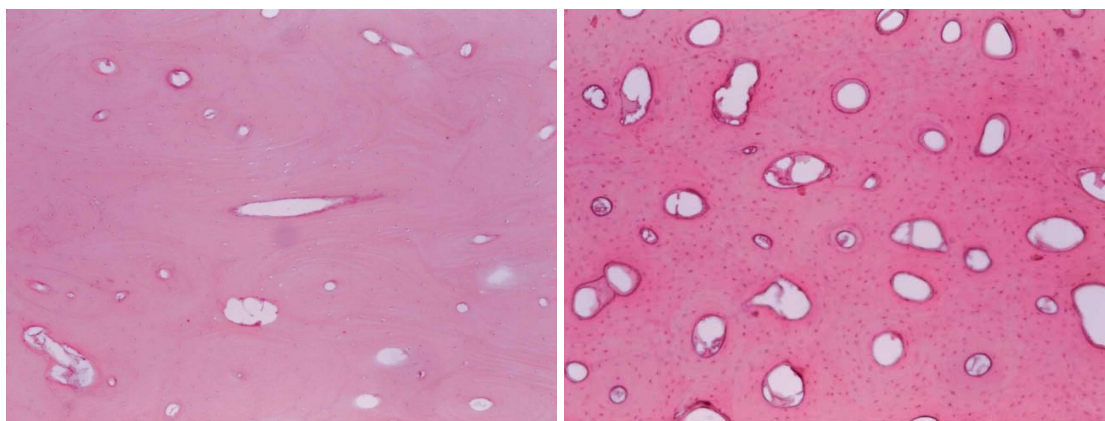


Εικόνα 57. Ιστολογικό παρασκεύασμα εφαιλατωμένης τομής μακρού οστού βοοειδούς παρατηρούμενο με τη μέθοδο της μικροσκοπίας αντίθεσης διαφορικής συμβολής (DIC-Nomarski). Παρατηρείται η παρουσία συστάδων δευτερογενών οστεώνων στην περιοχή των διάσπαρτων οστεώνων. Πηγή: [68]

Ακόμη ένα χαρακτηριστικό που διαφοροποιεί τον δευτερογενή οστίτη ιστό των βοοειδών είναι η συχνά ακανόνιστη δικτυωτή (reticular) όψη του, που οφείλεται στην παρουσία πολυάριθμων διακλαδιζόμενων σωλήνων του Volkmann, χαρακτηριστικό που δεν παρατηρείται στον οστίτη ιστό του ανθρώπου (Εικόνα 58) [68]. Τέλος, παρατηρείται ότι οι οστεόνες των βοοειδών έχουν πιο ελλειπτικό σχήμα και μη καλά καθορισμένα όρια σε σχέση με τους ανθρώπινους οστεόνες (Εικόνα 59) [3].



Εικόνα 58. Ιστολογικό παρασκεύασμα εφαιλατωμένης τομής μακρού οστού βοοειδούς παρατηρούμενο με τη μέθοδο της μικροσκοπίας αντίθεσης διαφορικής συμβολής (DIC-Nomarski). Παρατηρείται η παρουσία πυκνού δευτερογενούς οστίτη ιστού με ακανόνιστη δικτυωτή όψη, καθώς και η παρουσία σωλήνων του Volkmann. Πηγή: [68]



Εικόνα 59. Ιστολογικά παρασκευάσματα αφαλατωμένων τομών κνήμης. Αριστερά: βοοειδούς, δεξιά: ανθρώπου. Παρατηρείται η διαφοροποίηση στο σχήμα και την οριοθέτηση των Αβέρσειων συστημάτων, με εκείνα των βοοειδών να φαίνονται συγκριτικά περισσότερο αποπλατυσμένα και με λιγότερο εμφανή τη γραμμή οστεοποίησης. (H&E, x40). Πηγή: [3]

Αναφορικά με μια μελέτη που αφορούσε ιστολογικές τομές πλευρών νεαρών βοοειδών, παρατηρήθηκε η ύπαρξη πλεγματοειδούς οστού στα περιφερικά συστήματα έσω του περιόστεου, δευτερογενής οστίτης ιστός στα περιμυελικά συστήματα στα όρια με το ενδόστεο και συστάδες οστεώνων στα διάμεσα συστήματα [64]. Ωστόσο, ο Enlow αναφέρει την ύπαρξη αποκλειστικά πυκνού Αβέρσειου οστίτη ιστού στις ιστολογικές τομές πλευρών βοοειδών [45]. Ενδεχομένως να αναφέρεται σε τομές ενήλικου βοοειδούς, καθώς είναι πολύ πιθανό να αντικαθίσταται ο πλεγματοειδής οστίτης ιστός από δευτερογενή οστίτη ιστό στα οστά των πλευρών εξαιτίας του γεγονότος ότι δεν δέχονται ισχυρές δυνάμεις φόρτισης [103]. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι πρώτοι ερευνητές δεν εξέτασαν οστίτη ιστό ενήλικων βοοειδών, λόγω των κοινών πρακτικών σφαγής.¹⁰

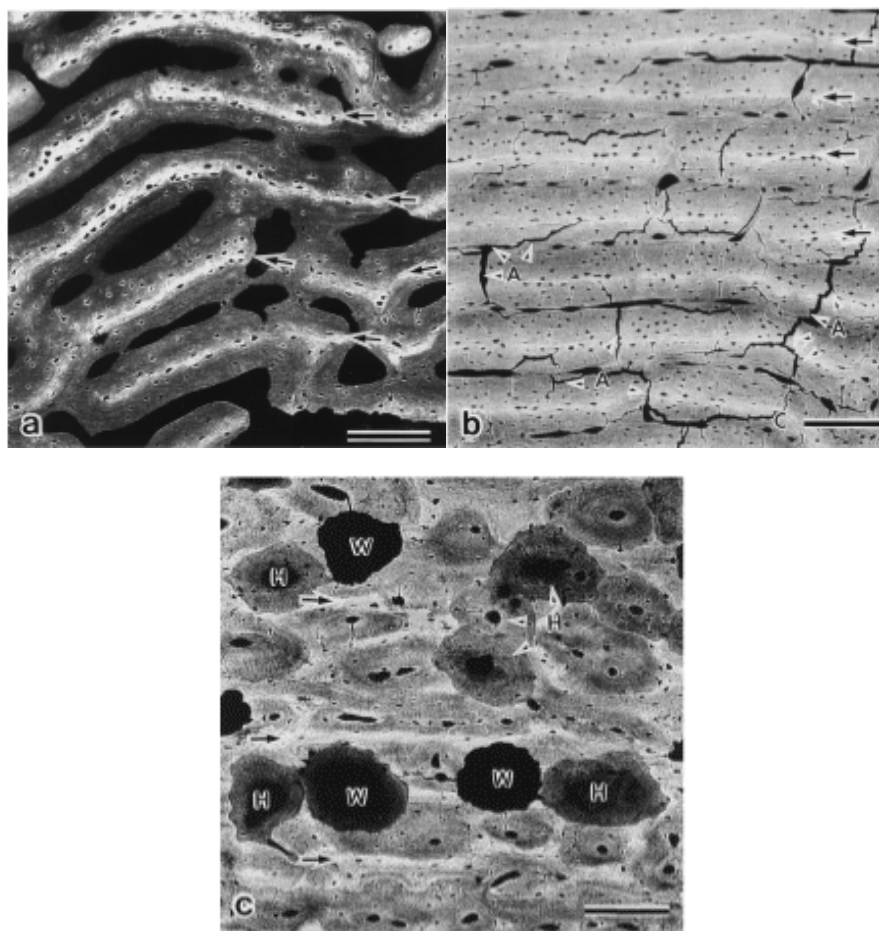
2.2.3. Αιγοπρόβατα

Σε ιστολογικές μελέτες που αφορούν οστά προβάτων (*Ovis aries*) βρέθηκε ότι ο ιστολογικός τύπος που κυριαρχεί είναι αυτός του πλεγματοειδούς οστίτη ιστού πρωτογενούς αγγείωσης, όπως συμβαίνει και στα οστά των βοοειδών, καθώς και η ύπαρξη δευτερογενούς οστίτη ιστού [4,45,64,66,92,97,104].

Συγκεκριμένα, σε ιστολογικές τομές μακρών οστών νεαρών προβάτων παρατηρήθηκε η ύπαρξη πλεγματοειδούς οστού με ένα από αυτά να επιδεικνύει

¹⁰ Τα κρεοπαραγωγά βοοειδή, συνήθως σφαγιάζονται πριν την ενηλικίωσή τους, στην ηλικία των 13-24 μηνών [64].

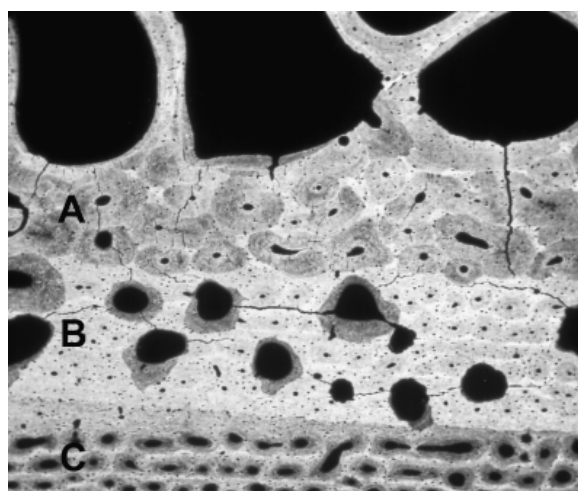
συστάδες πρωτογενών οστεώνων στα περιμυελικά συστήματα [96]. Άλλοι ερευνητές εντόπισαν διάσπαρτους δευτερογενείς οστεώνες στον πλεγματοειδή οστίτη ιστό μηριαίου οστού νεαρού προβάτου [64]. Επιπροσθέτως, σε μία ιστολογική μελέτη που αφορούσε οστά κνήμης προβάτων έως έξι μηνών, δεν εντοπίστηκε δευτερογενής οστίτης ιστός σε αντίθεση με ιστολογικές τομές κνήμης προβάτου ενός έτους όπου παρατηρήθηκαν δευτερογενείς οστεώνες στα μεσαία στρώματα του φλοιώδους οστού (Εικόνα 60) [104].



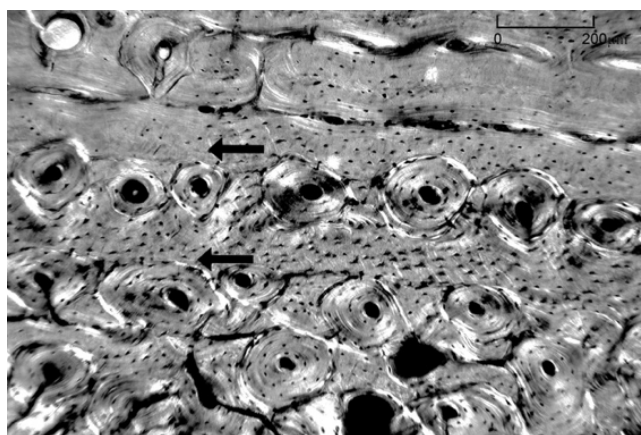
Εικόνα 60. Ιστολογικές τομές κνήμης προβάτων εξεταζόμενες με ανιχνευτή οπισθοσκεδαζόμενων ηλεκτρονίων σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (BSE-SEM). a: Νεογνό, b: 6 μηνών, c: Ενός έτους. Βέλος: ζώνες επιμετάλλωσης, H: σωλήνας του Havers, W: περιοχές απορρόφησης σωλήνων του Havers, A: ρωγμές ιστού ως αποτέλεσμα τεχνικού σφάλματος (artifact). Bars=0.2 mm. Πηγή: [104]

Στον ιστό μακρών οστών ενήλικων προβάτων παρατηρήθηκε η συνύπαρξη πλεγματοειδούς οστίτη ιστού με περιοχές διάσπαρτων δευτερογενών οστεώνων στα περιφερικά και διάμεσα συστήματα και ακανόνιστος δευτερογενής οστίτης ιστός στα περιμυελικά συστήματα, έξω του ενδόστεου (Εικόνα 61) [64]. Σε ιστολογικές τομές οστών κνήμης προβάτου βρέθηκε πλεγματοειδής οστίτης ιστός σε συνδυασμό με

ακανόνιστο δευτερογενή οστίτη ιστό, καθώς και ελάχιστες κοιλότητες οστικής απορρόφησης [97,104]. Άλλοι ερευνητές παρατήρησαν ακανόνιστο δευτερογενή οστίτη ιστό με διάσπαρτους οστεώνες στα όρια του περιόστεου και του ενδόστεου σε ιστολογικές τομές μηριαίων οστών και αξιολόγησαν το εύρημα αυτό ως μοναδικό χαρακτηριστικό των οστών προβάτων [66]. Ακόμη παρατηρήθηκαν συστάδες δευτερογενών οστεώνων (Εικόνα 62) [92,105].



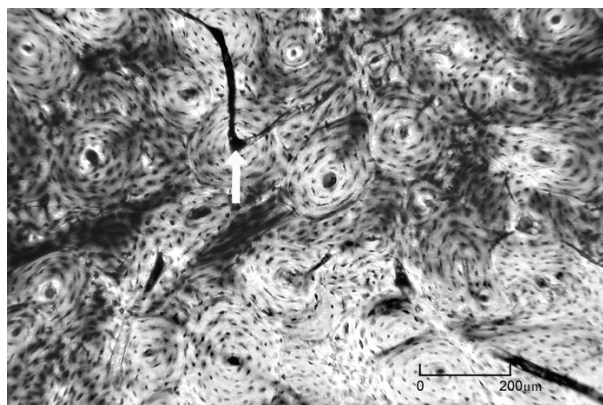
Εικόνα 61. Ιστολογική τομή φλοιώδους οστού προβάτου εξεταζόμενη με ανιχνευτή οπισθοσκεδαζόμενων ηλεκτρονίων σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (BSE-SEM). A: Ακανόνιστος δευτερογενής οστίτης ιστός στα περιμελικά συστήματα. B: Διάσπαρτοι οστεώνες και περιοχές οστικής απορρόφησης στα διάμεσα συστήματα. C: Πλεγματοειδής οστίτης ιστός στα περιφερικά συστήματα. Πλάτος πεδίου: 2.5 mm. Πηγή: [64]



Εικόνα 62. Ιστολογικό παρασκεύασμα εφαιλατωμένης τομής κερκίδας προβάτου ή αίγας παρατηρούμενη με τη μέθοδο της μικροσκοπίας αντίθεσης διαφορικής συμβολής (DIC-Nomarski). Βέλη: Συστάδες δευτερογενών οστεώνων. Πηγή: [92]

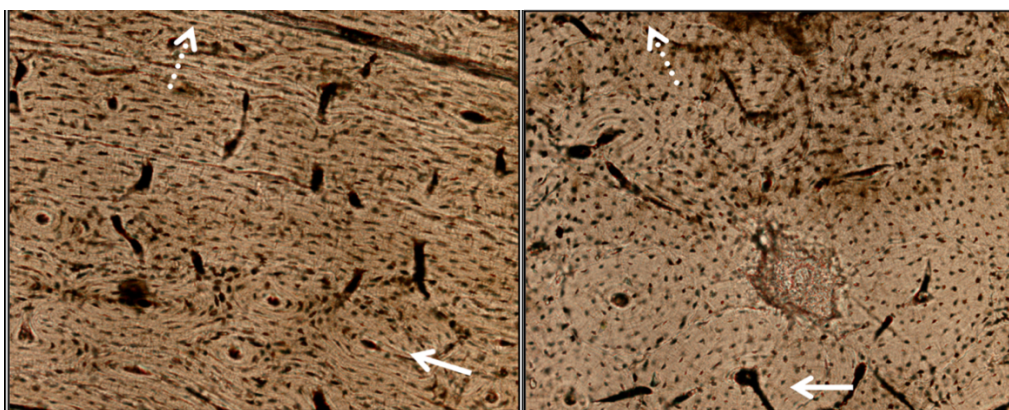
Ο ακανόνιστος δευτερογενής οστίτης ιστός που παρατηρήθηκε αποτελούταν από διάσπαρτους, μεσαίου μεγέθους οστεώνες και πολυάριθμους σωλήνες του Volkmann που διακλαδίζονταν με τους Αβέρσειους σωλήνες (Εικόνα 63) [92,97]. Οι οστεώνες

εμφανίζονταν στρογγυλοί, ελλειπτικοί και ακανόνιστοι [4,97] και οι Αβέρσειοι σωλήνες μεγάλοι σε μέγεθος και με ελλειπτικό σχήμα [97].



Εικόνα 63. Ιστολογικό παρασκεύασμα εφαιλωμένης τομής κερκίδας αίγας 7 ετών εξεταζόμενη με τη μέθοδο της μικροσκοπίας αντίθεσης διαφορικής συμβολής (DIC-Nomarski). Παρατηρείται ο ακανόνιστος δευτερογενής οστίτης ιστός. Βέλος: Κανάλια του Volkmann. Πηγή: [92]

Σε ιστολογικές μελέτες που αφορούσαν τομές μηριαίου οστού προβάτων διαπιστώθηκε η ύπαρξη πρωτογενούς οστίτη ιστού επιμήκους αγγείωσης [97,98,105]. Παρατηρήθηκαν, σύμφωνα με τον ιστολογικό τύπο, επιμήκως διατεταγμένοι πρωτογενείς οστεώνες, τοποθετημένοι κυκλικά γύρω από τη μυελική κοιλότητα [97,98]. Ακόμη, εντοπίστηκε πεταλιώδης οστίτης ιστός που διέθετε μεγάλο αριθμό ακανόνιστων δικτυωτών αγγειακών σωλήνων (Εικόνα 64) [97,98,105].



Εικόνα 64. Ιστολογικά παρασκευάσματα εφαιλωμένου μηριαίου (αριστερά) και κνήμης (δεξιά) προβάτου παρατηρούμενα σε οπτικό μικροσκόπιο. Αριστερά: Πρωτογενής οστίτης ιστός επιμήκους αγγείωσης. Βέλος: πρωτογενής οστεόνας. Διακεκομμένο βέλος: κατεύθυνση περιόστεου. Δεξιά: Ακανόνιστος δικτυωτός δευτερογενής οστίτης ιστός. Βέλος: Κανάλι του Volkmann. Διακεκομμένο βέλος: Κατεύθυνση του περιόστεου. (x 100) Πηγή: [97]

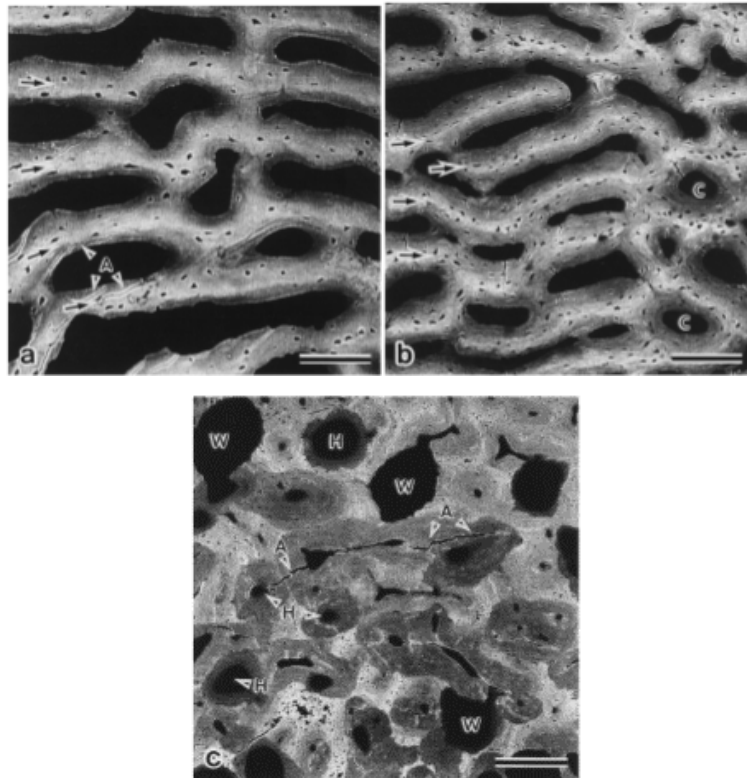
Οι ιστολογικές μελέτες που αφορούσαν οστίτη ιστό πλευρών προβάτων έδειξαν ότι ο κύριος ιστολογικός τύπος είναι ο πλεγματοειδής, ο οποίος σε σημεία αντικαθίσταται από δευτερογενή οστίτη ιστό [45,64], με τους Αβέρσειους σωλήνες να διαθέτουν ακανόνιστο σχήμα και μεσαίο μέγεθος [64].

Όσον αφορά τον οστίτη ιστό των αιγών (*Capra aegagrus hircus*), μοιράζονται κοινά χαρακτηριστικά με αυτόν των προβάτων [4,64,92,105]. Ωστόσο, ο Enlow παρατήρησε ότι τα οστά των πλευρών της αίγας χαρακτηρίζονται από πυκνό δευτερογενή οστίτη ιστό [4,45].

2.2.4. Χοίρος

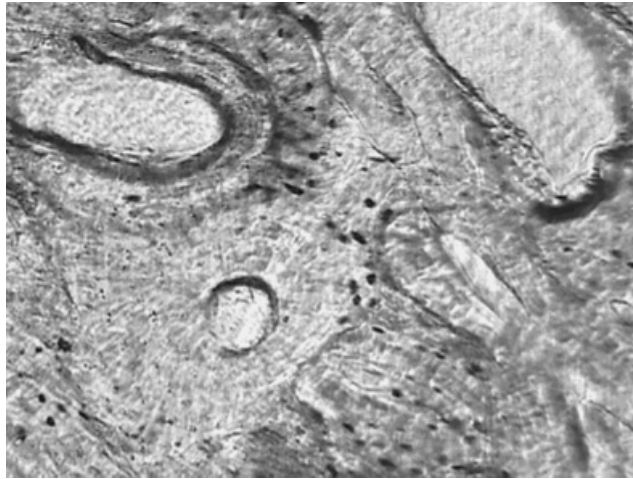
Η τυπική ιστολογική εικόνα του οστίτη ιστού που προέρχεται από χοίρους (*Sus Scrofa domestica*) βρέθηκε ότι αποτελείται από πλεγματοειδή οστίτη ιστό πρωτογενούς αγγείωσης σε συνδυασμό με δευτερογενή οστίτη ιστό [4,5,15,45,64,66,96,97,102,106].

Σε ιστολογικές μελέτες που αφορούσαν μακρά οστά χοιριδίων νεαρής ηλικίας βρέθηκε ότι επικρατούσε ο πλεγματοειδής οστίτης ιστός στη μεγαλύτερη επιφάνεια του φλοιώδους οστού [15,64]. Ακόμη, παρατηρήθηκε η ύπαρξη στρωμάτων πεταλιώδους οστίτη οστού κατά μήκος του οποίου σχηματίζονταν, στα όρια του ενδόστεου, δύο ως τρεις συστάδες πρωτογενών οστεώνων (από πέντε έως είκοσι στη σειρά) [15,64]. Την ύπαρξη συστάδων πρωτογενών οστεώνων στα όρια του ενδόστεου επιβεβαίωσε άλλη μια ερευνητική ομάδα, η οποία παρατήρησε ακόμη την ύπαρξη σημείων οστικής απορρόφησης και σχηματισμού δευτερογενών οστεώνων στην παραπάνω περιοχή [96]. Άλλοι ερευνητές παρατήρησαν μεγάλο αριθμό δευτερογενών οστεώνων σε μακρό οστό χοιριδίου έξι μηνών με το μικρότερο αριθμό αυτών να εντοπίζεται στα περιφερικά συστήματα (Εικόνα 65) [104].



Εικόνα 65. Ιστολογικές τομές κνήμης χοιριδίων εξεταζόμενες με ανιχνευτή οπισθοσκεδαζόμενων ηλεκτρονίων σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (BSE-SEM). a: Νεογνό, b: Ενός μηνός, c: 6 μηνών. Βέλος: Ζώνες επιμετάλλωσης στις οστεοδοκίδες (laminar bone units), C: Σωλήνας πρωτογενούς οστεώνα. Η: Σωλήνες του Havers, W: Περιοχές απορρόφησης σωλήνων του Havers, A: Ρωγμές του ιστού ως αποτέλεσμα τεχνικού σφάλματος. Bars=0.2 mm. Πηγή: [104]

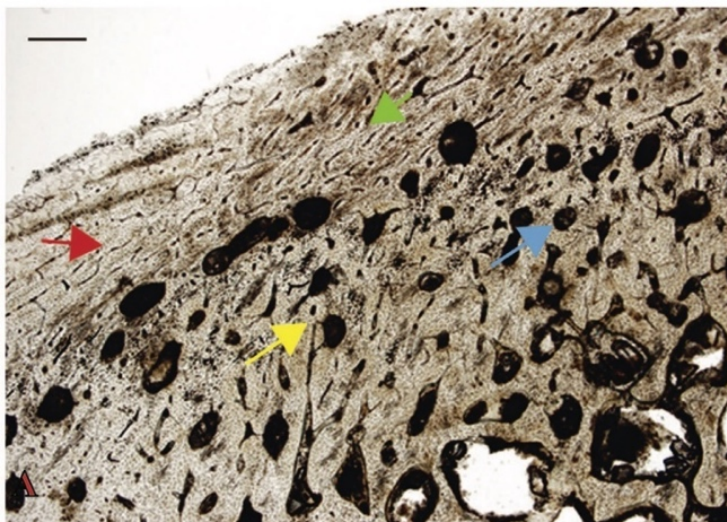
Στον ιστό μακρών οστών που αφορά ενήλικους χοίρους, παρατηρήθηκε η ύπαρξη κυρίως πλεγματοειδούς οστίτη ιστού σε συνδυασμό με πρωτογενείς οστεώνες και διάσπαρτους δευτερογενείς οστεώνες στα περιμυελικά συστήματα. Στα διάμεσα και στα περιφερικά συστήματα βρέθηκε πυκνός δευτερογενής οστίτης ιστός [102]. Οι ίδιοι ερευνητές παρατήρησαν την ύπαρξη πολλών κοιλοτήτων οστικής απορρόφησης ανάμεσα στους δευτερογενείς οστεώνες και υποστηρίζουν ότι το συγκεκριμένο εύρημα επιβεβαιώνει τη χοίρεια προέλευση του οστού (Εικόνα 66) [66,102].



Εικόνα 66. Ιστολογικό παρασκεύασμα εφαλατωμένης τομής μακρού οστού χοίρου. Παρατηρείται η ύπαρξη μιας κοιλότητας οστικής απορρόφησης και ο παρακείμενος δευτερογενής οστεώνας. (x200) Πηγή: [66]

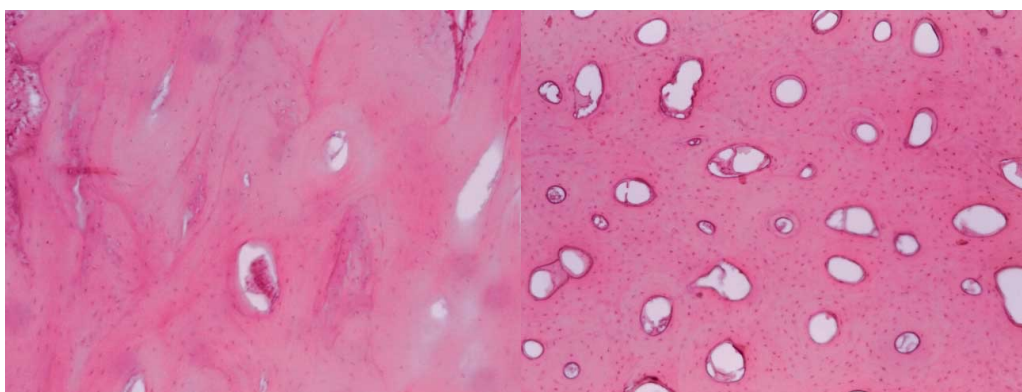
Άλλοι ερευνητές τοποθετούν τον πλεγματοειδή οστίτη ιστό στα περιφερικά συστήματα και το δευτερογενή οστίτη ιστό στα διάμεσα και περιμυελικά συστήματα, εφιστώντας την προσοχή των ερευνητών στην πιθανή σύγχυση των χοιρινών με τα ανθρώπινα οστά σε περίπτωση απόσπασης του περιφερικού πλεγματοειδούς οστίτη ιστού του φλοιού, εξαιτίας πιθανών ταφονομικών αλλοιώσεων [5]. Τη συνύπαρξη του πλεγματοειδούς ιστολογικού τύπου και του δευτερογενούς οστίτη ιστού στα μακρά οστά ενήλικων χοίρων επιβεβαιώνουν και άλλοι ερευνητές (Εικόνα 67) [5,15,64,106,107].

Ωστόσο, έχουν μελετηθεί ιστολογικές τομές μακρών οστών χοιριδίων [64] και χοίρων [97] όπου δεν επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη δευτερογενούς οστίτη ιστού και παρατηρήθηκε κυρίως πλεγματοειδής οστίτης ιστός, χωρίς οστεώνες και κοιλότητες οστικής απορρόφησης [64,97].



Εικόνα 67. Ιστολογικό παρασκεύασμα εφραλατωμένης κερκίδας χοίρου. Παρατηρείται η ύπαρξη πλεγματοειδούς οστίτη ιστού στα περιφερικά συστήματα, έσω του περίοστεου με κυκλικώς διατεταγμένους αγγειακούς σωλήνες (κόκκινο βέλος), ακανόνιστα διατεταγμένους αγγειακούς σωλήνες (πράσινο βέλος), καθώς και η ύπαρξη δευτερογενούς οστίτη ιστού στα διάμεσα και περιμυελικά συστήματα, με επιμήκως διατεταγμένους δευτερογενείς οστεώνες (κίτρινα βέλη) και αγγειακούς σωλήνες (μπλε βέλος). Εμφανής είναι και μια περιοχή σπογγώδους οστού κάτω δεξιά. Πηγή: [106]

Όσον αφορά στη μορφολογία των δευτερογενών οστεώνων, χαρακτηρίστηκαν από ερευνητές, ως ακανόνιστου σχήματος, με δυσδιάκριτα όρια (Εικόνα 68) [3] και με μεσαίο ή ελαφρώς μεγαλύτερο μέγεθος, που πάντως κυμαίνεται μέσα στα όρια των διαστάσεων των ανθρώπινων δευτερογενών οστεώνων [3,5,64]. Ακόμη, παρατηρήθηκαν λιγότεροι οστεώνες/mm² σε σχέση με τον ανθρώπινο οστίτη ιστό [3].



Εικόνα 68. Ιστολογικό παρασκεύασμα κνήμης χοίρου (αριστερά). Παρατηρούνται τα δυσδιάκριτα όρια, το ακανόνιστο σχήμα και η μικρότερη πυκνότητα των οστεώνων στον ιστό σε σχέση με τους οστεώνες του ιστολογικού παρασκευάσματος ανθρώπινου οστού κνήμης (δεξιά) (H&E, x40). Πηγή: [3]

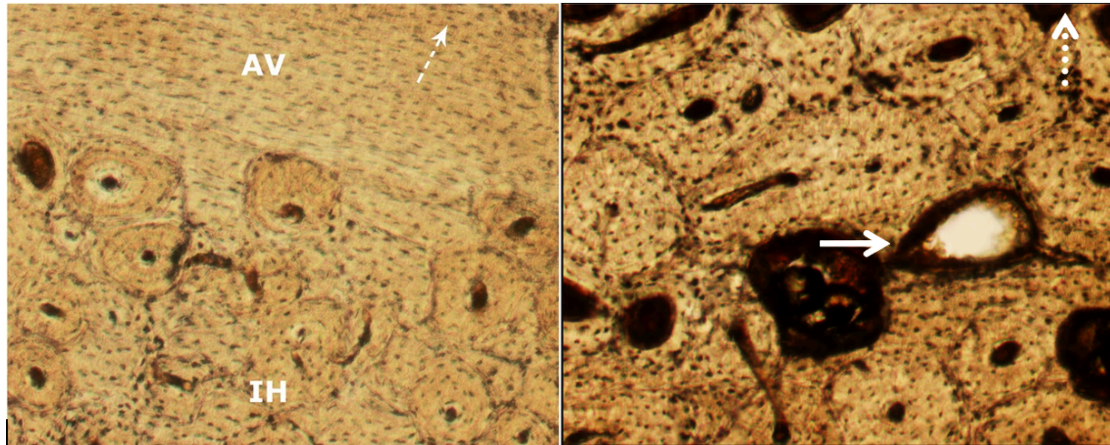
Σε ιστολογική μελέτη που αφορούσε οστίτη ιστό πλευράς χοίρου βρέθηκε πλεγματοειδής οστίτης ιστός [45], ενώ αυτός ο ιστολογικός τύπος δεν παρατηρήθηκε στις πλευρές χοίρων σε άλλη ιστολογική μελέτη, σε αντίθεση με τον δευτερογενή οστίτη ιστό που βρέθηκε να κυριαρχεί [107].

2.2.5. Σκύλος

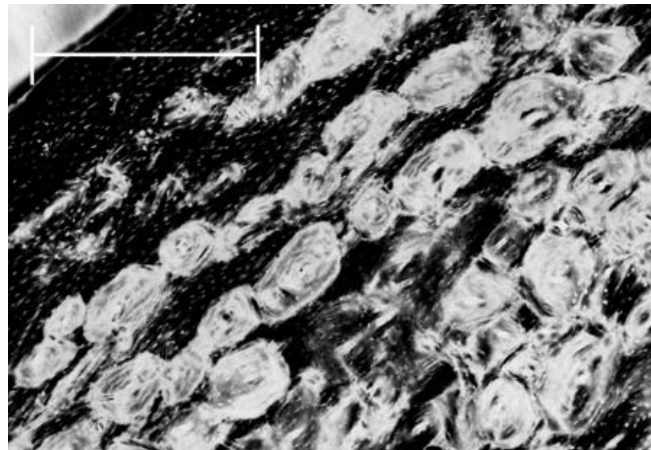
Η ιστολογική εικόνα των οστών του σκύλου (*Canis familiaris*) χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη δευτερογενούς, καθώς και πρωτογενούς οστίτη ιστού που δύναται να έχει τη μορφή πλεγματοειδούς ή πρωτογενούς οστίτη ιστού επιμήκους αγγείωσης [4,15,45,64,97,98,103,108].

Σε μία ιστολογική μελέτη μηριαίων οστών νεαρών σκύλων παρατηρήθηκε η ύπαρξη επιμήκων αγγειακών σωλήνων στο φλοιό, που βρίσκονταν σε παράλληλη διάταξη με τα περιφερικά συστήματα, ενώ παρουσίαζαν αυξημένη πυκνότητα στα περιμυελικά συστήματα [108].

Σε ιστολογικές τομές μακρών οστών ενήλικων σκύλων παρατηρήθηκαν πλεγματοειδής οστίτης ιστός στα περιφερικά συστήματα, παρουσία διάσπαρτων οστεώνων στα διάμεσα συστήματα και αντικατάσταση του πρωτογενούς οστού από δευτερογενή οστίτη ιστό στα περιμυελικά συστήματα [4,45]. Σε μια ακόμη ιστολογική μελέτη οστίτη ιστού από μηριαίο οστό σκύλου εντοπίστηκε πρωτογενής ιστός επιμήκους αγγείωσης σε συνδυασμό με κυκλικώς, περιμυελικά διατεταγμένους αγγειακούς σωλήνες καθώς και ακανόνιστους αγγειακούς σωλήνες [97,98]. Ακόμη παρατηρήθηκε πλεγματοειδής και μη αγγειώδης οστίτης ιστός έσω του περιόστεου και δευτερογενής οστίτης ιστός στη μεσαία ζώνη του φλοιού [97,98]. Σε ιστολογικές τομές κνήμης βρέθηκε πυκνός δευτερογενής οστίτης ιστός καθώς και κοιλότητες οστικής απορρόφησης ακανόνιστης μορφής (Εικόνα 69) [97]. Ο δευτερογενής οστίτης ιστός παρουσίαζε πυκνά Αβέρσεια συστήματα, διάσπαρτους οστεώνες και συστάδες οστεώνων (Εικόνα 70) [4,97].

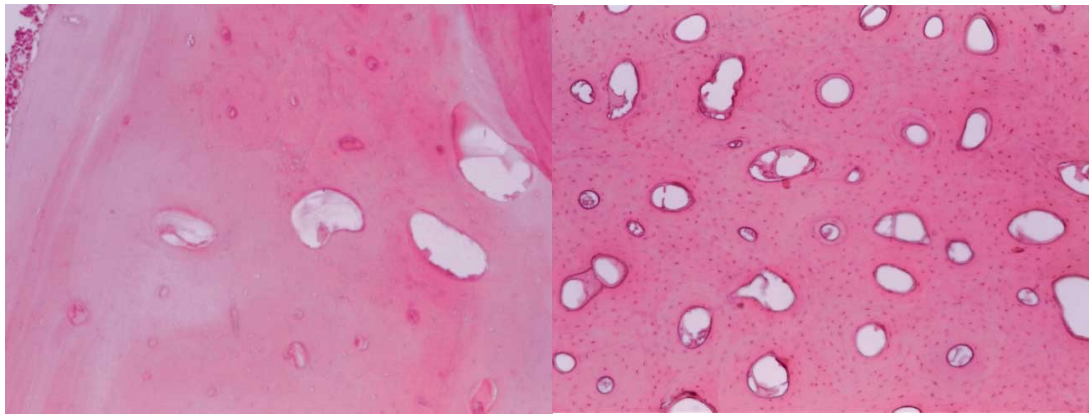


Εικόνα 69. Ιστολογικά παρασκευάσματα εφαλατωμένων τομών μηριαίου οστού (αριστερά) και κνήμης (δεξιά) σκύλου. Παρατηρείται η ύπαρξη ακανόνιστου δευτερογενούς οστίτη ιστού (IH), μη αγγειώδους οστίτη ιστού (AV), πυκνού δευτερογενούς οστίτη ιστού (δεξιά) και μιας κοιλότητας οστικής απορρόφησης (βέλος). Διακεκομμένο βέλος: κατεύθυνση του περιόστεου. (x100) Πηγή: [97]



Εικόνα 70. Ιστολογικό παρασκεύασμα μηριαίου οστού σκύλου. Είναι εμφανής η παρουσία συστάδων δευτερογενών οστεώνων. (x100) Πηγή: [4]

Όσον αφορά στο μέγεθος των οστεώνων που παρατηρήθηκαν στα μακρά οστά, περιγράφεται ως μικρού [15,64,97,98] και μεσαίου μεγέθους [3,97], με μικρού [15,97] έως μεγάλου μεγέθους [97] Αβέρσειους σωλήνες. Το σχήμα τους ποικίλει από στρογγυλό έως ωοειδές και ελλειπτικό (Εικόνα 71) [97]. Η πυκνότητα των δευτερογενών οστεώνων φαίνεται πως εμφανίζει διαφορές ανάμεσα στα διαφορετικά μακρά οστά, αλλά και ανάμεσα σε διαφορετικά σημεία τομής του ίδιου οστού [15].



Εικόνα 71. Ιστολογικό παρασκεύασμα οστού κνήμης σκύλου (αριστερά). Παρατηρούνται οι μεσαίου μεγέθους οστεώνες καθώς και τα διάμεσα συστήματα. Δεξιά απεικονίζεται ιστολογική τομή ανθρώπινου οστού κνήμης για λόγους αντιπαραβολής. H&E, x40 Πηγή: [3]

Σε ιστολογικές τομές πλευρών σκύλου παρατηρήθηκε πυκνός δευτερογενής οστίτης ιστός [45]. Άλλοι ερευνητές παρατήρησαν σε ιστολογικές τομές πλευρών καθώς και μακρών οστών την ύπαρξη πυκνού δευτερογενούς οστίτη ιστού, πεταλιώδους οστίτη ιστού έσω του περίστευου και έξω του ενδόστευου και διάσπαρτους δευτερογενείς οστεώνες, ενώ στα αντίστοιχα οστά νεαρών σκύλων παρατηρήθηκε η ύπαρξη πλεγματοειδούς οστίτη ιστού και συστάδες οστεώνων στα εσωτερικά όρια του περίστευου [64]. Σε ακόμη μια ιστολογική μελέτη που αφορούσε μακρά οστά και πλευρές σκύλων δεν βρέθηκε πλεγματοειδής οστίτης ιστός στις ιστολογικές τομές πλευρών, σε αντίθεση με τα μηριαία οστά που εξετάστηκαν, αλλά ούτε και συστάδες οστεώνων [107].

Ίσως η απουσία πλεγματοειδούς οστίτη ιστού να οφείλεται στην πιθανή αντικατάστασή του από δευτερογενή οστίτη ιστό στα οστά τα οποία δεν δέχονται ισχυρές φορτίσεις, όπως είναι τα οστά των πλευρών [103]. Ακόμη, δεν φαίνεται να επηρεάζεται η πυκνότητα των οστεώνων από την πλευρά του σώματος του σκύλου στην οποία ανήκει το οστό της πλευράς το οποίο εξετάζεται [15].

Το γεγονός ότι στη φλοιώδη μοίρα των οστών του σκύλου παρατηρείται δευτερογενής αντικατάσταση του πρωτογενούς οστίτη ιστού [4,103], καθώς και το γεγονός ότι ο οστίτης ιστός των υπερήλικων σκύλων παρουσιάζει παρόμοια μορφολογικά στοιχεία οστεοπόρωσης με εκείνον του ανθρώπου¹¹ [109], καθιστά την

¹¹ Παρατηρήθηκε ομοιότητα στα ιστολογικά μορφολογικά στοιχεία μηριαίων οστών υπερήλικων σκύλων με εκείνα του ανθρώπου, όπως η οστική απορρόφηση, η ύπαρξη οστεώνων χαμηλής πυκνότητας και η ύπαρξη αποφραγμένων οστικών σωλήνων [109].

ιστολογική διάκριση, βάση της μικροαρχιτεκτονικής του ιστού, ιδιαίτερα δυσχερή μεταξύ των δύο ειδών [4].

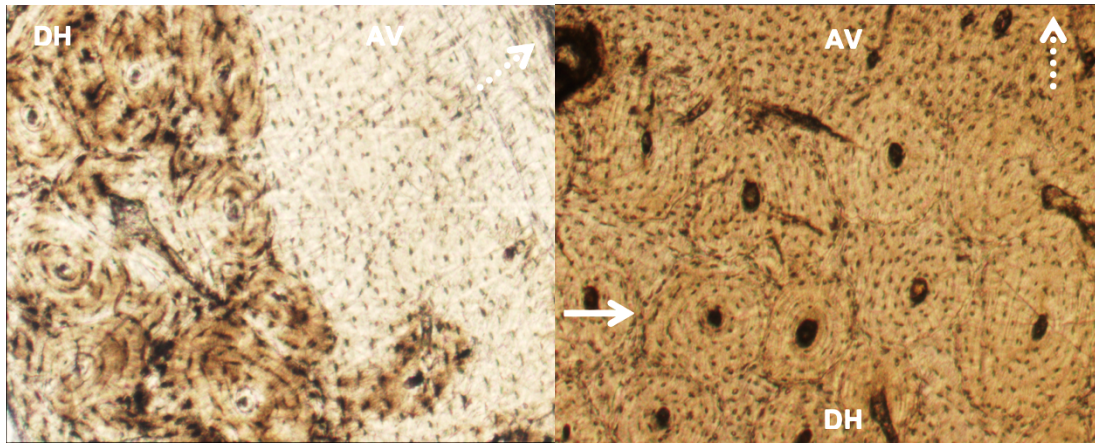
Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι η ολοκλήρωση της σκελετικής ανάπτυξης στις περισσότερες φυλές σκύλων επέρχεται κατά τους 10-12 μήνες και ως τους 14 μήνες, όπου παρατηρείται η σύγκλιση των επιφυσιακών γραμμών, ενώ η ταχύτερη οστική ανάπτυξη των μακρών οστών παρατηρείται ως τον πέμπτο μήνα της ζωής τους [89].

2.2.6. Γάτα

Ο φλοιός των οστών της γάτας (*Felis catus*) χαρακτηρίζεται κυρίως από δευτερογενή οστίτη ιστό και πεταλιώδη οστίτη ιστό σε ιστολογικό επίπεδο [4,45,64].

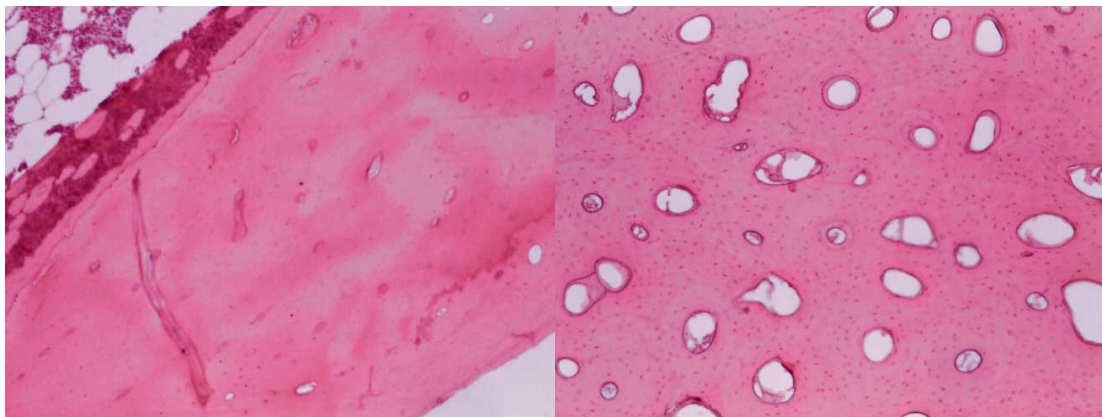
Σε ιστολογικές μελέτες μακρών οστών και πλευρών γάτας βρέθηκε ανεπτυγμένος πεταλιώδης ιστός στην περιοχή έξω του ενδόστεου, λιγότερο ανεπτυγμένος πεταλιώδης ιστός έσω του περιόστεου και πυκνός δευτερογενής οστίτης ιστός στο μεγαλύτερο μέρος του φλοιώδους οστού με εμφανή κανάλια του Volkmann [45,64]. Ακόμη, παρατηρήθηκαν μη αγγειώδεις περιοχές που διέθεταν διάσπαρτους δευτερογενείς οστεώνες και ανεπτυγμένα διάμεσα συστήματα [45].

Άλλοι ερευνητές παρατήρησαν μη αγγειώδη οστίτη ιστό και πυκνό δευτερογενή οστίτη ιστό σε ιστολογικές τομές μηριαίου οστού γάτας [97,98]. Επίσης, βρέθηκε πρωτογενής οστίτης ιστός επιμήκους αγγείωσης με τους πρωτογενείς οστεώνες να βρίσκονται κυκλικά τοποθετημένοι σχηματίζοντας συστάδες έσω του περιόστεου, ενώ στα εσωτερικά στρώματα του φλοιού παρατηρήθηκε δευτερογενής οστίτης ιστός με τους δευτερογενείς οστεώνες να σχηματίζουν συστάδες και να αφορίζονται από διάμεσα συστήματα, ενώ απουσίαζαν οι κοιλότητες οστικής απορρόφησης [97]. Σε ιστολογικές τομές κνήμης γάτας βρέθηκε μη αγγειώδης οστίτης ιστός και πυκνός δευτερογενής οστίτης ιστός με πυκνές συστάδες οστεώνων (Εικόνα 72) [97].



Εικόνα 72. Ιστολογικά παρασκευάσματα εφαιλατωμένων τομών μηριαίου οστού (αριστερά) και κνήμης (δεξιά) γάτας. Παρατηρείται μη αγγειώδης οστίτης ιστός (AV) και πυκνά Αβέρσεια συστήματα (DH), καθώς και συστάδες δευτερογενών οστεώνων (βέλος). Διακεκομμένο βέλος: κατεύθυνση του περιόστεου. (x100) Πηγή: [97]

Οι δευτερογενείς οστεώνες περιγράφονται μικρού [97,98], μεσαίου (Εικόνα 73) [3] και μεγάλου μεγέθους [4,97] και ακανόνιστου [4] ή ελλειπτικού [97] σχήματος με ευδιάκριτες γραμμές οστεοποίησης [97]. Το μέγεθος των σωλήνων του Havers εμφανίζεται από πολύ μικρό [64,97] έως μεγάλο [97]. Τέλος, αναφέρεται ότι η παρουσία των σωλήνων του Volkmann στα οστά της γάτας είναι πιο εκτεταμένη σε σχέση άλλα είδη θηλαστικών του ίδιου μεγέθους [97].



Εικόνα 73. Ιστολογικό παρασκεύασμα οστού κνήμης γάτας (αριστερά). Παρατηρούνται οι μεσαίου μεγέθους οστεώνες υψηλής πυκνότητας καθώς και τα εκτεταμένα διάμεσα συστήματα. Δεξιά απεικονίζεται ιστολογική τομή ανθρώπινου οστού κνήμης για λόγους αντιπαραβολής. H&E, x40 Πηγή: [3]

2.3. Ποσοτική μικροσκοπική διαφοροποίηση

Η ποσοτική ανάλυση των μικροσκοπικών χαρακτηριστικών του οστίτη ιστού [40] με μετρικές μεθόδους (ιστομορφομετρία) αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο της δικαστικής ανθρωπολογίας που εφαρμόζεται και στις περιπτώσεις διάκρισης ανθρώπινων-ζωικών οστικών υπολειμμάτων [4,5,13,14,66,99]. Οι μετρήσεις οι οποίες παρουσιάζουν διαφορές ανάμεσα στα είδη θηλαστικών αφορούν κυρίως τα μορφομετρικά χαρακτηριστικά και τον πληθυσμό των οστεώνων (osteon population density-OPD) [4].

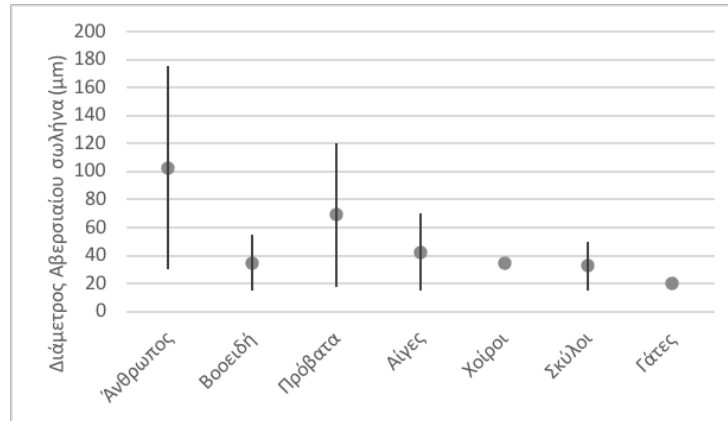
Τα μορφομετρικά χαρακτηριστικά των οστεώνων που συνήθως αξιολογούνται στις ερευνητικές μελέτες ιστολογικής διάκρισης ανθρώπινων-ζωικών οστικών υπολειμμάτων, αφορούν την ελάχιστη και τη μέγιστη διάμετρο, την περίμετρο και το εμβαδό των δευτερογενών οστεώνων και των Αβέρσειων σωλήνων, καθώς και το σχήμα των δευτερογενών οστεώνων [4,5,15,66].

Αβέρσειοι σωλήνες

Τα πιο αξιόπιστα μετρήσιμα χαρακτηριστικά για τη διάκριση της ανθρώπινης προέλευσης των οστών είναι τα μετρήσιμα μεγέθη των Αβέρσειων σωλήνων με τα μεγαλύτερα μεγέθη να συναντώνται στα ανθρώπινα οστικά μικροτεμάχια [4,5,110]. Μάλιστα έχει προταθεί το αξίωμα ότι, αν η διάμετρος ενός Αβέρσειου σωλήνα έχει μήκος μικρότερο από 50μm, τότε το οστό είναι ζωικής προέλευσης [66,110], αν και έχουν εντοπιστεί Αβέρσειοι σωλήνες σε ανθρώπινα οστά διαμέτρου μικρότερης των 50μm [110].

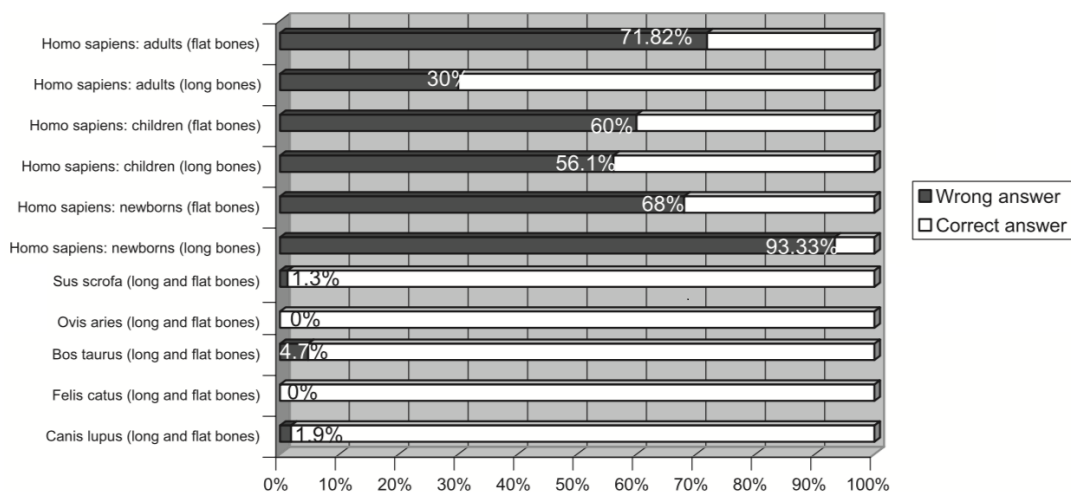
Ο οστίτης ιστός των μεγάλων και των μικρών μηρυκαστικών που διαθέτει δευτερογενείς οστεώνες εμφανίζει μεγέθη Αβέρσειων σωλήνων και δευτερογενών οστεώνων με αρκετές αποκλίσεις. Ενίοτε ευρίσκονται στο εύρος των αντίστοιχων μεγεθών που παρατηρούνται στα ανθρώπινα οστά, αλλά κατά βάση εμφανίζονται μικρότερα από εκείνα που παρατηρούνται στον ανθρώπινο οστίτη ιστό [4]. Ο οστίτης ιστός των χοίρων παρουσιάζει Αβέρσειους σωλήνες μεσαίου μεγέθους [15], οι οποίοι είναι μικρότερου μεγέθους σε σχέση με εκείνους των ανθρώπινων οστών [4]. Όσον αφορά τους Αβέρσειους σωλήνες των οστών σκύλων [89] και γατών, εμφανίζουν επίσης μικρότερα μεγέθη σε σχέση με τους ανθρώπινους [4]. Αξίζει να αναφερθεί ότι οι μεγαλύτερες αποκλίσεις των μέσων όρων των μετρήσιμων μεγεθών των Αβέρσειων

σωλήνων αλλά και των οστέων έχουν παρατηρηθεί στα ανθρώπινα οστά ενήλικων ατόμων (Διάγραμμα 1) [64,97]. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί, ότι τα οστά ατόμων μεγαλύτερης ηλικίας παρουσιάζουν Αβέρσειους σωλήνες μεγαλύτερου μεγέθους σε σχέση με εκείνους που ανήκουν σε οστά νεαρότερων ατόμων [15,64].



Διάγραμμα 1. Προσεγγιστικό αριθμητικό εύρος μετρήσεων της διαμέτρου των Αβέρσειων σωλήνων που προκύπτουν από παλαιότερες ιστολογικές μελέτες. Πηγή: [64]-Τροποποιημένο διάγραμμα.

Ερευνητές ανέπτυξαν μια κανονική διακριτική συνάρτηση (canonical discriminant function) που συμπεριλαμβάνει τις εξής μεταβλητές: εμβαδό, μέγιστη και ελάχιστη διάμετρο του Αβέρσειου σωλήνα, βάση της οποίας επιβεβαιώνεται ή αποκλείεται η ανθρώπινη προέλευση των οστών, με διακυμάνσεις στα ποσοστά επιτυχούς διάκρισης. Τα μεγαλύτερα ποσοστά λανθασμένης ταυτοποίησης οστών ως ζωικής προέλευσης αφορούσαν τα οστά των νεογνών και των ανήλικων ατόμων, καθώς και τα πλατέα οστά ανεξαρτήτως ηλικίας, ενώ σε μικρό ποσοστό ταυτοποιήθηκαν λανθασμένα ως ανθρώπινα, οστά προερχόμενα από σκύλους, χοίρους και βοοειδή (Διάγραμμα 2) [14].



Διάγραμμα 2. Ποσοστά λανθασμένων αποτελεσμάτων της ιστομορφομετρικής μελέτης οστών θηλαστικών. Πηγή: [14]-Τροποποιημένο

Άλλοι ερευνητές ανέπτυξαν επίσης, κανονικές διακριτικές συναρτήσεις που περιλαμβάνουν τις εξής μεταβλητές: εμβαδό και μέγιστη διάμετρο του Αβέρσειου σωλήνα, καθώς και τον αριθμό των δευτερογενών οστεώνων ανά mm² με αληθή διάκριση των ανθρώπινων οστών σε ποσοστό 94% [110]. Αντίστοιχες συναρτήσεις περιλαμβάνουν τα μεγέθη: μέγιστη διάμετρος οστεώνα, αριθμός οστεώνων ανά mm², μέγιστη διάμετρος του Αβέρσειου σωλήνα και πάχος φλοιώδους οστού που υπολογίστηκε από το εξωτερικό όριο του ενδόστεου έως το εσωτερικό όριο του περιόστεου, με ποσοστό αληθούς διάκρισης των ανθρώπινων οστών 100%. Ακόμη, στη συγκεκριμένη μελέτη κατέστη δυνατή η ταξινόμηση των ζωικών οστών κατά ομάδες, βάση των αποτελεσμάτων των συναρτήσεων [110].

Αν και στις περισσότερες μελέτες οστικών μικροτεμαχίων, που σκοπό είχαν την ταυτοποίηση του είδους, χρησιμοποιήθηκαν εφαιλατωμένες τομές, ερευνητές αξιοποίησαν τα μορφομετρικά χαρακτηριστικά των Αβέρσειων σωλήνων (διάμετρο και αριθμό ανά mm²), καθώς και τη διάμετρο των οστεώνων σε εφαιλατωμένες τομές καταλήγοντας σε επιτυχή διάκριση κατά 88,5% [3]. Όσον αφορά τις διαμέτρους των Αβέρσειων σωλήνων και των οστεώνων, παρατήρησαν σημαντική διαφορά ανάμεσα σε εκείνους που ανήκαν σε ανθρώπινα οστά από εκείνους που ανήκαν σε οστά προερχόμενα από σκύλους και γάτες, ενώ η διαφορά των ανθρώπινων μορφομετρικών χαρακτηριστικών δεν ήταν στατιστικά σημαντική σε σχέση με τις αντίστοιχες μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν σε οστά χοίρων και βοοειδών [3]. Ωστόσο, ο πληθυσμός των ανθρώπινων Αβέρσειων σωλήνων δεν παρουσίασε σημαντική διαφορά σε σχέση με εκείνον που παρατηρήθηκε στα οστά γάτας, ενώ διέφερε σημαντικά σε σχέση με τον αντίστοιχο πληθυσμό στα οστά σκύλων, χοίρων και βοοειδών [3].

Δευτερογενείς οστεώνες

Όσον αφορά το εμβαδό των δευτερογενών οστεώνων, το οποίο αποτελεί πιο αξιόπιστο μέγεθος σε σχέση με τη διάμετρό τους [99], εμφανίζεται συνήθως μεγαλύτερο στα ανθρώπινα οστά [61,110]. Πολλές φορές όμως οι παρατηρούμενες μετρήσεις αυτού του μεγέθους ανάμεσα στα οστά διαφορετικών ειδών θηλαστικών αλληλεπικαλύπτονται [4,5], ιδίως όσον αφορά τη σύγκριση των μεγεθών μεταξύ ανθρώπινων και οστεώνων βοοειδών [5] χοίρων και σκύλων [4]. Αξιοποιώντας το μέγεθος της διαμέτρου, ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η μέγιστη διάμετρος των δευτερογενών

οστεώνων σε συνδυασμό με το πάχος του φλοιώδους οστού αποτελούν σημαντικά στοιχεία για την αναγνώριση του είδους [110].

Άλλοι ερευνητές αναφέρουν ότι η διάμετρος των δευτερογενών οστεώνων των οστών σκύλων παρουσιάζει σημαντικά μικρότερο μέγεθος από εκείνη των ανθρώπινων οστεώνων και μπορεί να αποτελέσει παράγοντα διαφοροποίησης μεταξύ των δύο [15]. Ακόμη, αναφέρουν ότι οι αρσενικοί σκύλοι φέρουν οστεώνες μεγαλύτερης διαμέτρου από τους αντίστοιχους των θηλυκών [15]. Ενδεχομένως το μέγεθος των δευτερογενών οστεώνων να επηρεάζεται και από το μέγεθος της φυλής των σκύλων, που αποτελεί ένα χαρακτηριστικό το οποίο δεν αποσαφηνίζεται στις ερευνητικές μελέτες [4].

Σε μια συγκριτική μελέτη οστικών υπολειμμάτων αξιοποιήθηκαν για την ανάπτυξη διακριτικής συνάρτησης το εμβαδό, η περίμετρος και η ελάχιστη διάμετρος των δευτερογενών οστεώνων, καθώς και το εμβαδό, η περίμετρος, η ελάχιστη και η μέγιστη διάμετρος του Αβέρσειου σωλήνα, με απόλυτη επιτυχή ταυτοποίηση των ανθρώπινων οστών και χαμηλότερα ποσοστά επιτυχούς διάκρισης του είδους των ζωικών οστών [66]. Οι ερευνητές εφάρμοσαν μετρήσεις σε 50-100 Αβέρσειους σωλήνες και δευτερογενείς οστεώνες για κάθε ζωικό είδος, ώστε να καταλήξουν σε αξιόπιστα αποτελέσματα, καθώς τα μεγέθη αυτά επηρεάζονται από πολλές παραμέτρους [66]. Σε περιπτώσεις όμως όπου ανευρίσκονται μικρά οστικά υπολείμματα ενδεχομένως το διαθέσιμο πλήθος των συγκεκριμένων στοιχείων της μικροδομής του ιστού να μην επαρκεί [15].

Μία σημαντική παράμετρος που έχει βρεθεί ότι επηρεάζει το μέγεθος των δευτερογενών οστεώνων στα ανθρώπινα αλλά και στα ζωικά οστά [64] είναι η ηλικία, με την πάροδο της οποίας το μέγεθος μειώνεται [15,64,99]. Επιπλέον, η γενετική πληροφορία καθώς και οι μηχανικές φορτίσεις επηρεάζουν το μέγεθος των δευτερογενών οστεώνων, καθώς επιδρούν στη δράση των οστεοκλαστών και στην οστική ανακατασκευή [99]. Ακόμη, το είδος του οστού φαίνεται πως επηρεάζει το μέγεθός τους, όπως παρατηρήθηκε στα οστά των χοίρων, όπου τα μηριαία και τα βραχιόνια οστά εμφάνιζαν οστεώνες μεγαλύτερου μεγέθους σε σχέση με τις πλευρές, την κερκίδα και τα μετακάρπια [4]. Τέλος, έχει προταθεί ότι το ελάχιστο όριο του μεγέθους των οστεώνων ενός είδους ενδεχομένως να σχετίζεται με το μέγεθος των ερυθροκυττάρων του, ενώ το μέγιστο όριο του μεγέθους τους σχετίζεται ως ένα ποσοστό με το σωματικό μέγεθος του ενήλικου ατόμου [111].

Πληθυσμός οστεώνων

Ο πληθυσμός των οστεώνων, αν και έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε συνδυασμό με άλλες παραμέτρους [110], δεν θεωρείται αξιόπιστο χαρακτηριστικό για τη διάκριση του είδους εκ του οποίου προέρχεται ένα οστικό ιστοτεμάχιο, καθώς αποτελεί ένα μέγεθος που επηρεάζεται από πλήθος παραγόντων, όπως η ηλικία του ατόμου και το ανατομικό σημείο του οστού [4,5,8,112].

Τα ανθρώπινα οστά παρουσιάζουν το μικρότερο πληθυσμό δευτερογενών οστεώνων σε σχέση με τα υπόλοιπα θηλαστικά [110], αν και έχει παρατηρηθεί αλληλοεπικάλυψη των μετρήσεων μεταξύ των ανθρώπινων οστών και των οστών σκύλων [15]. Ο αριθμός των δευτερογενών οστεώνων ανά mm^2 αυξάνει με την ηλικία [15,64,99,112], κυρίως στην περιοχή έσω του περιόστεου [64] και επίσης εμφανίζονται κατακερματισμένοι οστεώνες εξαιτίας της οστικής ανακατασκευής [15]. Επιπλέον, παρατηρείται αυξημένος πληθυσμός στις θέσεις των μυϊκών ενθέσεων [64]. Το ίδιο μοτίβο, που αφορά στον πληθυσμό των οστεώνων κατά την οστική ανάπτυξη εμφανίζουν εκτός από τον άνθρωπο και τα υπόλοιπα είδη θηλαστικών [15].

Κυκλικότητα

Ακόμη ένα μέγεθος που έχει αξιοποιηθεί για την αναγνώριση του ζωικού είδους οστών αγνώστου προέλευσης είναι η κυκλικότητα (circularity) των οστεώνων και των Αβέρσειων σωλήνων που ορίζεται από την εξίσωση: Κυκλικότητα = 4π εμβαδό / περίμετρος² με τιμές από 0 έως 1 και τη μονάδα να αφορά τον απόλυτο κύκλο [15,87,113].

Ορισμένοι ερευνητές ανέπτυξαν μια διακριτική συνάρτηση, αξιοποιώντας το μέτρο της κυκλικότητας των δευτερογενών οστεώνων (μετρήθηκαν τουλάχιστον 12 οστεώνες ανά δείγμα) για τη διάκριση των ανθρώπινων από τα ζωικά οστικά υπολείμματα με τα ζωικά να εμφανίζονται, συνήθως, περισσότερο κυκλικά [15,61]. Ακόμη, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το φύλο δεν επηρεάζει την κυκλικότητα των οστεώνων, επομένως αποτελεί ένα στοιχείο το οποίο δεν είναι απαραίτητο να είναι γνωστό κατά τη διαφοροποίηση των ειδών βάση της κυκλικότητας των στοιχείων της μικροδομής του οστού [15].

Ωστόσο, η μελέτη αφορούσε μόνο μακρά οστά, δεν συμπεριλήφθηκαν οστά από νεαρά ανθρώπινα άτομα και απαιτήθηκε ιδιαίτερη προσοχή κατά τις μετρήσεις καθώς

η κυκλικότητα διέφερε μόνο κατά 2% ανάμεσα στους οστεώνες των ανθρώπινων και των ζωικών οστών που αξιολογήθηκαν [15]. Αξίζει να αναφερθεί ότι η κυκλικότητα των οστεώνων δεν παρουσίαζε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στα οστά των σκύλων και των χοίρων και επομένως δεν αποτελεί αξιόπιστο μέγεθος διαφοροποίησης μεταξύ αυτών των δύο θηλαστικών [15]. Τέλος, εν αντιθέσει με τις παρατηρήσεις των προαναφερθέντων ερευνητών, έχει παρατηρηθεί σε διαφορετικές μελέτες ότι οι ανθρώπινοι οστεώνες εμφανίζουν πιο στρογγυλό σχήμα σε σχέση με εκείνους των υπόλοιπων θηλαστικών [8,66].

Οστικά βοθρία

Η ανάγκη για αξιοποίηση επιπλέον ιστομορφομετρικών χαρακτηριστικών για την εξακρίβωση της ανθρώπινης προέλευσης οστικών μικροτεμαχίων οδήγησε κάποιους ερευνητές στην αξιοποίηση του μεγέθους των οστικών βοθρίων [5]. Οι βασικοί περιοριστικοί παράγοντες αφορούν στην τρισδιάστατη δομή τους και τη σχετική τους εξάρτηση από την κατεύθυνση των κολλαγόνων ινών του οστεώνα, περιορισμοί που μπορούν να αναιρεθούν με τη χρήση μεθόδων που επιτρέπουν την τρισδιάστατη απεικόνιση του ιστού, όπως είναι η μικροϋπολογιστική τομογραφία [5].

Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα οστικά βοθρία του ανθρώπινου οστίτη ιστού εμφανίζονται περισσότερο επιμήκη και διαθέτουν, κατά μέσο όρο, μεγαλύτερη διάμετρο και περίμετρο από τα αντίστοιχα του οστίτη ιστού χοίρου [5]. Παρόλα αυτά οι μετρήσεις αλληλεπικαλύπτονταν σε ορισμένες περιπτώσεις και αφορούσαν αποκλειστικά μακρά οστά, λόγοι για τους οποίους χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση στο συγκεκριμένο πεδίο για τη διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων [5]. Ακόμη ένας παράγοντας που εφιστά την προσοχή κατά την μορφομετρική μελέτη των οστικών βοθρίων είναι το γεγονός ότι αποτελούν τα πρώτα στοιχεία της μικροδομής του οστίτη ιστού τα οποία επηρεάζονται από προερχόμενες από μικροοργανισμούς ταφονομικές αλλοιώσεις [114].

Fractal/lacunarity

Μια νέα προσέγγιση για την ταυτοποίηση του είδους προτάθηκε από ερευνητές και αφορούσε την ανάλυση του *fractal* (μορφοκλασματικό σύνολο) και του *lacunarity* (πορώδες) εφραλατωμένων ιστολογικών τομών οστίτη ιστού με τη χρήση λογισμικού

ανάλυσης εικόνας [105]. Η μέθοδος αυτή επέτρεψε τη λεπτομερέστερη απεικόνιση της μικροαρχιτεκτονικής του ιστού και των διαφοροποιήσεών της μεταξύ των διαφορετικών ειδών, καθώς και μεταξύ διαφορετικών οστών του ίδιου ατόμου [105].

Μυελικός δείκτης

Ακόμη μια μετρική προσέγγιση των χαρακτηριστικών της μικροδομής των οστών που σκοπό είχε τη διερεύνηση του είδους, αφορούσε τον υπολογισμό του κλάσματος της μικρότερης διαμέτρου της μυελικής κοιλότητας προς τη διάμετρο της διάφησης του ίδιου σημείου του οστού (medullary index) [115]. Τα αποτελέσματα της μελέτης κατέδειξαν ότι τα ανθρώπινα οστά που εξετάστηκαν εμφάνιζαν στενότερη μυελική κοιλότητα σε σχέση με τη διάμετρο του οστού, ενώ τα ζωικά οστά εμφάνιζαν πυκνότερο φλοιώδη οστίτη ιστό σε σχέση με τα ανθρώπινα, καθώς και λιγότερο ευδιάκριτα όρια ανάμεσα στη σπογγώδη και τη φλοιώδη μοίρα του οστού [115]. Ωστόσο, η προσέγγιση αυτή αφορούσε αποκλειστικά μακρά και καλά διατηρημένα οστά [115].

Περιορισμοί

Είναι σημαντικό να γίνει περαιτέρω αναφορά στους περιορισμούς των ερευνητικών αποτελεσμάτων που προκύπτουν από τις συγκριτικές ιστομορφομετρικές μελέτες. Ο μικρός αριθμός δειγμάτων, οι διαφορές στα είδη οστών και στα ακριβή σημεία δειγματοληψίας, οι ηλικιακές διαφορές των ατόμων των εξεταζόμενων οστών ή/και η έλλειψη αναφοράς στην ηλικία, οι διαφορές στις μεθόδους προετοιμασίας των ιστοτεμαχίων και η χρήση διαφορετικών υπολογιστικών προγραμμάτων ιστομορφομετρικών μετρήσεων, αποτελούν τους βασικότερους περιοριστικούς παράγοντες [4]. Αυτοί οι περιορισμοί καθιστούν τα ερευνητικά αποτελέσματα των περισσότερων ιστομορφομετρικών μελετών διάκρισης ανθρώπινων και ζωικών οστικών υπολειμμάτων μη συγκρίσιμα ή συγκρίσιμα με επιφύλαξη [4,65].

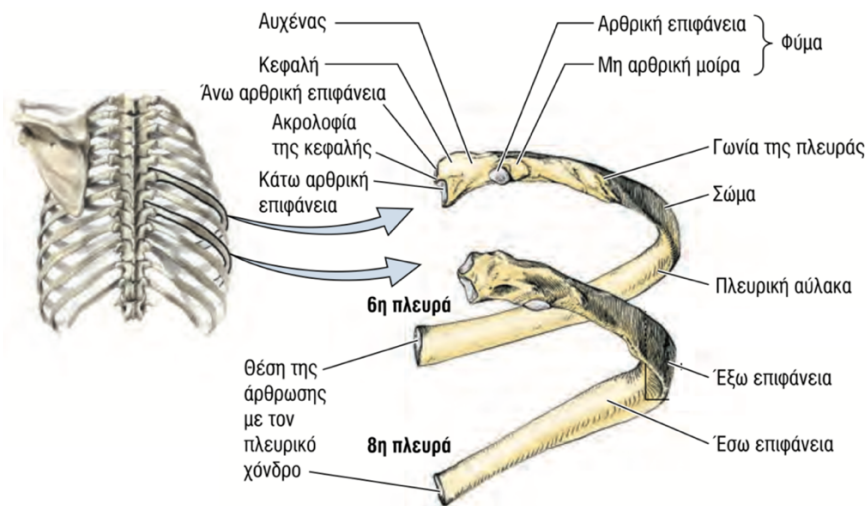
2.4. Μακροσκοπικά χαρακτηριστικά των πλευρών

Οι πλευρές με τους αντίστοιχους πλευρικούς χόνδρους αποτελούν το πλάγιο τοίχωμα του θωρακικού κλωβού, που απαρτίζεται περαιτέρω από το στέρνο, ως πρόσθιο τοίχωμα στον άνθρωπο και ως κοιλιακό τοίχωμα στα τετράποδα θηλαστικά και τους θωρακικούς σπονδύλους ως οπίσθιο τοίχωμα στον άνθρωπο και ως ραχιαίο τοίχωμα στα τετράποδα θηλαστικά [30,116]. Ο θωρακικός κλωβός διαθέτει σχήμα «κόλουρου κώνου, επιπεδωμένου από εμπρός προς τα πίσω» [116] στον άνθρωπο και σχήμα «κοίλου κώνου αποπλατυσμένου από τα πλάγια με την κορυφή του να στρέφεται προς τα εμπρός και την λοξά κομμένη βάση του προς τα πίσω» [30] στα τετράποδα θηλαστικά.

Μια τυπική πλευρά χαρακτηρίζεται από δύο μοίρες: την οπίσθια (ραχιαία στα τετράποδα θηλαστικά) που αποτελεί την οστέινη πλευρά και την πρόσθια (κοιλιακή στα τετράποδα θηλαστικά) που αποτελεί τον πλευρικό χόνδρο [30].

Στο οπίσθιο ή ραχιαίο άκρο τις οστέινης πλευράς βρίσκονται η κεφαλή, ο αυχένας και το φύμα [30]. Η κεφαλή διαθέτει δύο αρθρικές επιφάνειες (άνω και κάτω) που διαχωρίζονται από μια ακρολοφία και διαρθρώνονται με τα σπονδυλικά σώματα των παρακείμενων σπονδύλων καθώς και με το μεσοσπονδύλιο δίσκο [116]. Οι πλευρές 1-2 και 10-12 φέρουν μια μόνο αρθρική επιφάνεια επί της κεφαλής [116]. Ο αυχένας βρίσκεται ανάμεσα στην κεφαλή και το φύμα της πλευράς [30,116]. Το φύμα βρίσκεται ανάμεσα στον αυχένα και το σώμα της πλευράς και η αρθρική επιφάνεια στην κορυφή του αρθρώνεται με την εγκάρσια απόφυση του σπονδύλου [30,116].

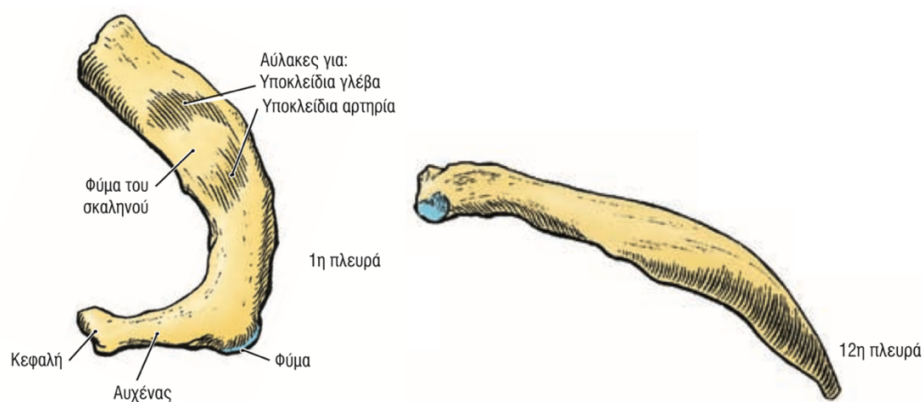
Ακολουθεί η γωνία της πλευράς στο σημείο όπου κάμπτεται προς τα εμπρός και κάτω [116]. Στη συνέχεια βρίσκεται το, αποπλατυσμένο από τα πλάγια, σώμα της πλευράς στο οποίο διακρίνονται η έξω, κυρτή επιφάνεια, η έσω, κοίλη επιφάνεια, το άνω χείλος (πρόσθιο για τα τετράποδα θηλαστικά) και το κάτω χείλος (οπίσθιο για τα τετράποδα θηλαστικά) [30,116]. Το άνω χείλος εμφανίζεται κοίλο και διαθέτει μια αύλακα όπου προσφύονται οι μύες, ενώ το κάτω χείλος εμφανίζεται κυρτό και διαθέτει, στα όρια με την έσω επιφάνεια, την πλευρική αύλακα όπου πορεύονται τα μεσοπλεύρια αγγεία και το ομώνυμο νεύρο [30,116]. Στο πρόσθιο ή κοιλιακό άκρο η πλευρά παρουσιάζει μια μικρή αύξηση της διαμέτρου της και απολήγει σε μια κοιλότητα όπου αρθρώνεται με τον πλευρικό χόνδρο (Εικόνα 74) [30,116].



Εικόνα 74. Μακροσκοπικά χαρακτηριστικά των τυπικών πλευρών στον άνθρωπο. Πηγή: [116]

Όσον αφορά την πρώτη πλευρά, εμφανίζεται βραχύτερη, παχύτερη στο σύνολό της, επιπεδωμένη από άνω προς τα κάτω και περισσότερο καμπυλωτή σε σχέση με τις υπόλοιπες πλευρές, διαθέτει μία αρθρική επιφάνεια στην κεφαλή που εμφανίζεται ογκωδέστερη, όπως και το φύμα της [30,116]. Ακόμη, δεν διαθέτει πλευρική αύλακα, αλλά φέρει δύο αύλακες στην άνω επιφάνεια για τα υποκλείδια αγγεία που χωρίζονται από το φύμα του σκαληνού μυός [116]. Η τελευταία πλευρά εμφανίζεται λεπτότερη, βραχύτερη και οξύληκτη, δεν διαθέτει αυχένα και το φύμα συγχωνεύεται πλήρως με τη μονή αρθρική επιφάνεια της κεφαλής (Εικόνα 75) [30].

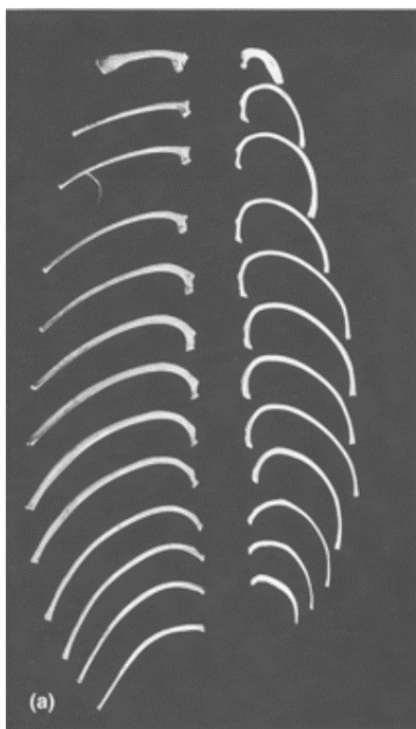
Τα παραπάνω χαρακτηριστικά των πρώτων και των τελευταίων πλευρών τις καθιστούν εύκολα αναγνωρίσιμες, σε αντίθεση με τις ενδιάμεσες πλευρές για τις οποίες η ταξινόμηση μπορεί να γίνει κατά προσέγγιση βάση του μήκους, της κυρτότητας και της απόστασης του φύματος από την κεφαλή [30].



Εικόνα 75. Μακροσκοπικά χαρακτηριστικά 1^{ης} και 12^{ης} πλευράς στον άνθρωπο. Πηγή: [116]

2.4.1. Άνθρωπος

Οι πλευρές του ανθρώπου «φέρονται λοξά προς τα κάτω και εμπρός» εκκινώντας από τους θωρακικούς σπονδύλους [116] και εμφανίζουν γωνίωση στο ραχιοκοιλιακό επίπεδο, χαρακτηριστικό στο οποίο οφείλεται η χαρακτηριστική προσθοπίσθια επιπέδωση του θωρακικού τοιχώματος (Εικόνα 76) [117]. Στο σύνολό τους είναι 24 πλευρές (12 ζεύγη), όσοι και οι θωρακικοί σπόνδυλοι, εκτός από σπάνιες περιπτώσεις όπου, είτε παρατηρείται έλλειψη μιας πλευράς, είτε επιπλέον αυχενικές ή/και οσφυϊκές πλευρές [118]. Από τις 12 πλευρές, οι 1-7 καλούνται γνήσιες πλευρές γιατί αρθρώνονται προς τα εμπρός με το στέρνο μέσω των αντίστοιχων πλευρικών χόνδρων, οι 8-10 καλούνται νόθες πλευρές, καθώς συνδέονται με τον υπερκείμενο πλευρικό χόνδρο σχηματίζοντας το πλευρικό τόξο και οι 11-12 ονομάζονται νόθες ασύντακτες πλευρές καθώς δεν συνδέονται με τους υπερκείμενους χόνδρους [116,118]. Όλες οι πλευρές αρθρώνονται οπισθίως με τους αντίστοιχους σπονδύλους [30,116].



Εικόνα 76. Πλευρές ανθρώπου (δεξιά) και ζωικές πλευρές προβάτου (αριστερά) σε ανατομική διάταξη. Είναι εμφανείς οι διαφορές στον αριθμό και το σχήμα των οστών με τον άνθρωπο να μετρά 12 πλευρές σχήματος C, ενώ το πρόβατο 13 επιμηκυμένες πλευρές. Πηγή: [1]

2.4.2. Βοοειδή

Στα βοοειδή απαντώνται 13 ζεύγη πλευρών, οι γνήσιες πλευρές είναι οι 1-8 και οι νόθες οι 9-13. Το μήκος τους αυξάνεται από την 1^η ως την 9^η πλευρά και μειώνεται από την 10^η ως την 13^η. Οι πλευρές των βοοειδών διαθέτουν μικρότερη κύρτωση και εμφανίζουν μεγαλύτερη διάμετρο στο κάτω ημιμόριό τους (Εικόνα 77). Ακόμη, η αρθρική επιφάνεια του φύματος εμφανίζεται κοίλη (σε αντίθεση με τα άλλα είδη όπου εμφανίζεται επίπεδη) και το οπίσθιο χείλος του σώματος εμφανίζεται αιχμηρό στις περισσότερες πλευρές [30].



Εικόνα 77. Πλάγια δεξιά όψη του θωρακικού τοιχώματος βοοειδούς. Πηγή: [119]

2.4.3. Αιγοπρόβατα

Τα αιγοπρόβατα διαθέτουν 13 ζεύγη πλευρών και ομοίως με τα μεγάλα μηρυκαστικά οι 1-8 αποτελούν τις γνήσιες πλευρές, οι 9-13 τις νόθες και αυξάνουν σε μέγεθος από την 1^η ως την 9^η, ενώ εμφανίζουν σταδιακά μικρότερο μέγεθος από την 10^η ως την 13^η (Εικόνα 78). Οι πλευρές της αίγας διαθέτουν μικρότερη διάμετρο σε σχέση με τις πλευρές του προβάτου. Ομοίως με τα βοοειδή, η αρθρική επιφάνεια του φύματος εμφανίζεται κοίλη και το οπίσθιο χείλος του σώματος αιχμηρό [30].



Εικόνα 78. Αριστερά: Πλάγια αριστερή όψη του θωρακικού τοιχώματος αίγας. Δεξιά: Πλάγια αριστερή όψη του θωρακικού τοιχώματος προβάτου. Πηγή: [119]

2.4.4. Χοίρος

Ο χοίρος διαθέτει 14 έως 15 ζεύγη πλευρών με τις πρώτες 7 να αποτελούν τις γνήσιες πλευρές και τις 8-14/15 τις νόθες πλευρές. Το μέγεθος αυξάνει από την 1^η ως την 7^η πλευρά και μειώνεται από την 8^η ως τη 15^η. Οι πλευρές 1-4 διαθέτουν μεγαλύτερη διάμετρο από τις υπόλοιπες και οι επόμενες πλευρές εμφανίζουν μια μικρή συστροφή με αποτέλεσμα το ραχιαίο άκρο να φέρεται εμπρός και το κοιλιακό άκρο προς τα πίσω (Εικόνα 79). Η συστροφή αυτή δεν εμφανίζεται στις τελευταίες πλευρές [30]. Αξίζει να σημειωθεί ότι έχουν παρατηρηθεί μακροσκοπικές ομοιότητες ανάμεσα στα οστά του χοίρου και του ενήλικου ανθρώπου [110].



Εικόνα 79. Πλάγια αριστερή όψη του θωρακικού τοιχώματος χοίρου. Πηγή: [119]

2.4.5. Σκύλος

Ο σκύλος διαθέτει 13 ζεύγη πλευρών εκ των οποίων οι 9 πρώτες αποτελούν τις γνήσιες πλευρές και οι 10^η-13^η τις νόθες πλευρές. Οι πλευρές του σκύλου είναι περισσότερο κυρτές, το σχήμα τους σχεδόν κυλινδροειδές και η πλευρική αύλακα μόλις εμφανής (Εικόνα 80) [30].



Εικόνα 80: Πλάγια αριστερή όψη θωρακικού τοιχώματος σκύλου. Πηγή: [119]

2.4.6. Γάτα

Ομοίως με το σκύλο, η γάτα διαθέτει 13 ζεύγη πλευρών με τις πρώτες 9 να αποτελούν τις γνήσιες και οι 10^η-13^η τις νόθες πλευρές [30]. Η κύρτωση και το κυλινδροειδές σχήμα εμφανίζει ομοιότητες με τις πλευρές του σκύλου, ενώ η διάμετρος είναι εμφανώς μικρότερη (Εικόνα 81).

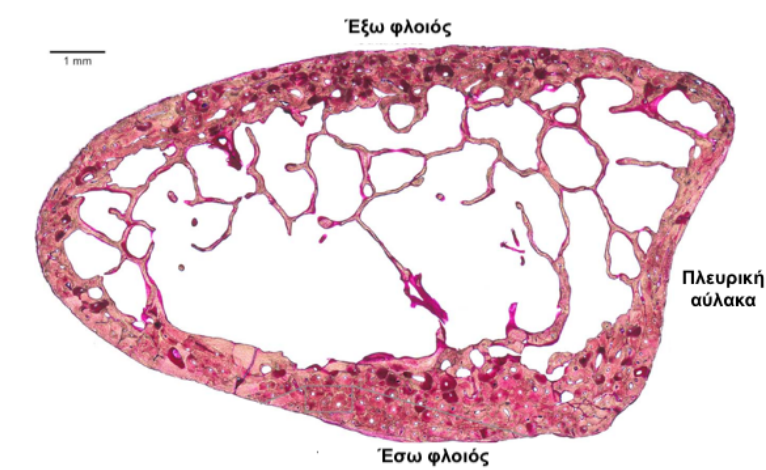


Εικόνα 81. Πλάγια αριστερή όψη θωρακικού τοιχώματος γάτας. Πηγή: [119]

2.5. Ιστολογικά γνωρίσματα οστίτη ιστού πλευρών

Τα οστά των πλευρών είναι ένα υλικό που χρησιμοποιείται στην κλινική έρευνα, ιδιαίτερα σε μελέτες μεταβολικών διαταραχών [99]. Στο πεδίο της δικαστικής ανθρωπολογίας μελετώνται σε ιστολογικό επίπεδο, κυρίως για την εκτίμηση της ηλικίας του ανθρώπου στον οποίο ανήκει το εξεταζόμενο δείγμα, καθώς το γεγονός ότι δεν επηρεάζονται από μηχανικές φορτίσεις τους προσδίδει ένα σημαντικό ερευνητικό πλεονέκτημα σε σχέση με τα μακρά οστά [65,112]. Ακόμη ένα ερευνητικό πλεονέκτημα του οστίτη ιστού των πλευρών οφείλεται στις σταθερές και περιοδικές δυνάμεις ανάσπασης που δέχονται τα οστά αυτά κατά τη διαδικασία της αναπνοής, που αποτελούν ένα κοινό λειτουργικό χαρακτηριστικό για κάθε εξεταζόμενο δείγμα [99].

Σε μια εγκάρσια διατομή πλευράς, ανατομικές περιοχές ιστολογικού ενδιαφέροντος αποτελούν η έσω και έξω φλοιώδης μοίρα του οστού [8]. Ο έσω φλοιός παρουσιάζει μεγαλύτερη εναπόθεση φλοιώδους οστού και εμφανίζεται παχύτερος από τον έξω φλοιό [4,99], ενώ στην έσω επιφάνεια του κάτω χείλους διακρίνεται η πλευρική αύλακα, στις πλευρές όπου υπάρχει (Εικόνα 82) [4]. Η πλευρική αύλακα συνήθως απουσιάζει στα νεογνά, αλλά γίνεται ολοένα και εμφανέστερη κατά την παιδική ηλικία [8]. Μακροσκοπικά, ένα κατακερματισμένο οστό πλευράς θηλαστικού είναι δυνατόν να διαχωριστεί από τα μακρά οστά, καθώς η σπογγώδη μοίρα των πλευρών διαθέτει χαρακτηριστική οργάνωση και χαμηλή πυκνότητα οστεοδοκίδων [63].



Εικόνα 82. Ιστολογικό παρασκεύασμα πλευράς σε εγκάρσια διατομή. Χρώση: Βασική Φουξίνη. Πηγή: [99]

Στα οστά των πλευρών του ανθρώπινου εμβρύου εμφανίζονται οι πρωτογενείς πυρήνες οστέωσης κατά την ενδέκατη έως τη δωδέκατη εβδομάδα της κύησης, ενώ οι δευτερογενείς πυρήνες οστέωσης εμφανίζονται στην εφηβική ηλικία όπου ο θωρακικός

κλωβός αναπτύσσεται πλήρως [8]. Σύμφωνα με άλλους συγγραφείς, οι πυρήνες οστέωσης του σώματος των πλευρών εμφανίζονται κατά την όγδοη εβδομάδα της εμβρυικής ζωής, ενώ οι πυρήνες οστέωσης του αρθρικού και του μη αρθρικού τμήματος του φύματος καθώς και της κεφαλής των πλευρών 1 έως 10 εμφανίζονται από τα 16 έως τα 24 έτη [116].

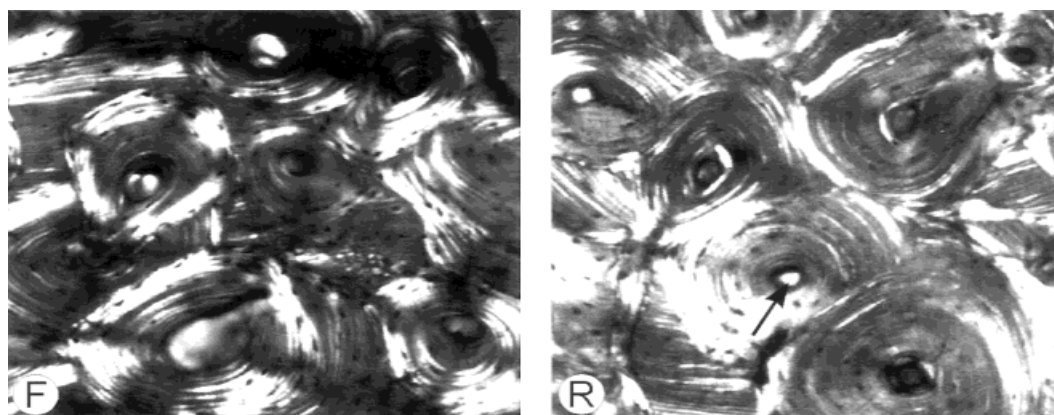
Στην εφηβική ηλικία η ανάπτυξη του θωρακικού κλωβού είναι ταχύτερη ακολουθώντας την ανάπτυξη των πνευμόνων [4,8]. Στο στάδιο αυτό παρατηρείται συντονισμένη οστική απορρόφηση και ανακατασκευή των πλευρών, που έχει ως αποτέλεσμα τη φλοιϊκή μετατόπιση και την αλλαγή του σχήματος των πλευρών, με τη μερική απορρόφηση του έσω φλοιού και την εναπόθεση οστέινης ουσίας στον έξω φλοιό [4,8]. Ωστόσο, για τη διατήρηση της μυελικής κοιλότητας κεντρικά της διάφυσης κατά τη φλοιϊκή της μετατόπιση, είναι απαραίτητη η απορρόφηση του ενδόστεου οστού του έξω φλοιού και η εναπόθεση ενδόστεου οστού στον έσω φλοιό [4]. Στο γεγονός αυτό ενδεχομένως να οφείλεται η εμφάνιση οστεώνων μικρότερου μεγέθους στον έξω φλοιό σε σχέση με το μέγεθος των οστεώνων του έσω φλοιού [99].

Οι δευτερογενείς οστεώνες στα οστά των ανθρώπινων πλευρών εμφανίζονται παράλληλα με τους δευτερογενείς οστεώνες των μηριαίων οστών, ενδεχομένως νωρίτερα από την ηλικία των 12,5 ετών [8], παρόλο που οι πλευρές επιδέχονται υψηλότερα ποσοστά ανακατασκευής [112]. Ακόμη, οι περιοχές του δευτερογενούς οστού και οι Αβέρσειοι σωλήνες στο φλοιό των πλευρών κυμαίνονται στα ίδια μεγέθη μεταξύ των ανήλικων και των ενήλικων ατόμων του ίδιου πληθυσμού [8], ενώ αναφέρεται ότι το μέγεθος των δευτερογενών οστεώνων μπορεί να ποικίλει σημαντικά σε μία ιστολογική τομή [15]. Ερευνητές παρατήρησαν ότι το μέγεθος των δευτερογενών οστεώνων μειώνεται με την πάροδο της ηλικίας, ενώ δεν παρατήρησαν διαφορές ανάμεσα στα δύο φύλα [99]. Επιπλέον, άλλοι ερευνητές παρατήρησαν αύξηση του αριθμού των οστεώνων και των κοιλοτήτων οστικής απορρόφησης και μείωση του ποσοστού ανακατασκευής των οστών των πλευρών με την πάροδο της ηλικίας [120].

Τα οστά των πλευρών επηρεάζονται από τις συστηματικές μεταβολές του μεταβολισμού περισσότερο από τα υπόλοιπα οστά του σκελετού [99,121] και στο γεγονός αυτό οφείλεται η προηγμένη εμφάνιση της σχετιζόμενης με την ηλικία απώλειας του οστίτη ιστού σε αυτά τα οστά [99]. Ακόμη, η επίδραση του μεταβολισμού και η έλλειψη δυνάμεων φόρτισης στα οστά των πλευρών ίσως να δικαιολογούν το μεγαλύτερο μέγεθος των οστεώνων τους σε σχέση με τα μακρά οστά [121]. Αναφορικά με τους Αβέρσειους σωλήνες, παρατηρήθηκαν από ερευνητές ελαφρώς μικρότερου

μεγέθους σωλήνες στα οστά των πλευρών ενηλίκων ατόμων σε σχέση με εκείνους που παρατηρήθηκαν στα μηριαία οστά τους (Εικόνα 83) [91].

Τέλος, σε μια έρευνα που αφορούσε ιστολογικές τομές από διαφορετικά οστά του ίδιου ανθρώπινου σκελετού, παρατηρήθηκε υψηλότερη εναπόθεση δευτερογενούς οστίτη ιστού με πυκνούς δευτερογενείς οστεώνες, ιδιαίτερα στις θέσεις ένθεσης των τενόντων και υψηλή ομοιογένεια της μικροδομής τους στις διαφορετικές ανατομικές θέσεις των οστών των πλευρών [12].



Εικόνα 83. Ιστολογικές τομές μηριαίου (F- αριστερά) και πλευράς (R-δεξιά) ενηλίκου παρατηρούμενες με πολωτικό μικροσκόπιο στα ίδια επίπεδα μεγέθυνσης. Οι οστεώνες παρουσιάζουν παρόμοια μεγέθη και στα δύο είδη οστών, ενώ οι Αβέρσειοι σωλήνες (βέλος) εμφανίζονται μικρότεροι στο οστό της πλευράς. Πηγή: [91]

Σε διαφορετικές συγκριτικές ιστολογικές μελέτες μεταξύ ανθρώπινων και ζωικών οστών πλευρών παρατηρήθηκε ότι οι δευτερογενείς οστεώνες του φλοιώδους οστού των ανθρώπινων πλευρών έχουν μεγαλύτερο μέγεθος σε σχέση με εκείνους που ανήκουν στο φλοιό των πλευρών προερχόμενες από σκύλο [113] και οι Αβέρσειοι σωλήνες διαθέτουν μεγαλύτερη διάμετρο στον οστίτη ιστό των ανθρώπινων πλευρών σε σχέση με εκείνους που ανήκουν σε πλευρές βοοειδών και σκύλων [103]. Ακόμη, η μέση τιμή της κυκλικότητας των οστεώνων σε συνδυασμό με την μέση τιμή του εμβαδού των οστεώνων, μεγέθη που εμφανίζουν μεγαλύτερες τιμές στα ανθρώπινα οστά των πλευρών σε σχέση με εκείνα του σκύλου, βρέθηκε ότι μπορούν να διαχωρίσουν τα δύο είδη σε ποσοστό ως 100% [113]. Ωστόσο, οι παρατηρήσεις μιας άλλης ερευνητικής μελέτης σε σχέση με την κυκλικότητα των οστεώνων έφερε αντίθετα αποτελέσματα, με τους οστεώνες των ανθρώπινων πλευρών να εμφανίζονται λιγότερο κυκλικοί συγκριτικά με τους οστεώνες των πλευρών που ανήκαν σε σκύλους και χοίρους [15].

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3. ΣΚΟΠΟΣ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, δεν είναι σπάνια η αποστολή οστικών υπολειμμάτων οικόσιτων ζώων στα εργαστήρια δικαστικής ανθρωπολογίας με σκοπό τη διερεύνηση της υπόστασης ή του αποκλεισμού του δικαστικού τους ενδιαφέροντος [1,4,9-11,61,64,65]. Στις περιπτώσεις όπου τα οστά παρουσιάζονται κατακερματισμένα και δεν είναι δυνατή η μακροσκοπική τους αναγνώριση, η μέθοδος επιλογής για τη διαπίστωση της ανθρώπινης ή της μη ανθρώπινης προέλευσής τους είναι η ιστολογική διερεύνηση [1,3,4,13-15,61].

Είναι γεγονός ότι οι βιβλιογραφικές αναφορές που αφορούν συγκριτικές ιστολογικές μελέτες πλευρών με σκοπό την ταυτοποίηση του είδους είναι περιορισμένες [13-15]. Ωστόσο, η συχνή εντόπιση Αβέρσειων συστημάτων στο φλοιώδη οστίτη ιστό των πλευρών πολλών θηλαστικών [45], ενδεχομένως εξαιτίας της έλλειψης δυνάμεων φόρτισης [103], καθιστά αυτά τα οστά ιδιαίτερα χρήσιμα στην προσπάθεια ανάπτυξης κριτηρίων ταυτοποίησης του είδους σε οστικά μικροτεμάχια δικαστικού ενδιαφέροντος. Επιπλέον, από πρακτική σκοπιά, τα οστά των πλευρών μπορούν εύκολα να αναγνωριστούν και να περισυλλεγούν κατά την εκταφή των ζώων, όπως σχετικά εύκολη είναι και η προμήθειά τους από κρεαταγορές, ενώ το μέγεθός τους επιτρέπει τον ευκολότερο χειρισμό τους και την ταχύτερη προετοιμασία των ιστολογικών παρασκευασμάτων σε σχέση με οστά μεγαλύτερου μεγέθους, όπως είναι τα μηριαία οστά.

Στην πλειοψηφία των ερευνητικών μελετών που αφορούσαν την ιστολογική αναγνώριση των ειδών εκ των οποίων προέρχονταν τα εξεταζόμενα οστέινα τεμάχια εξετάστηκαν εφαιλατωμένες τομές οστών [5,13-15,45,64,66,68,92,96-98,101-105,107,108,110,113], ενώ κατά τη βιβλιογραφική ανασκόπηση εντοπίστηκε μόνο μία μελέτη σε αυτό το πεδίο που αφορούσε αφαιλατωμένο οστίτη ιστό [3]. Ωστόσο, η λήψη ιστολογικών τομών οστίτη ιστού, έπειτα από την αφαιλάτωσή του είναι μια ευρέως εφαρμόσιμη τεχνική, η οποία δεν απαιτεί ειδικό εργαστηριακό εξοπλισμό [82]. Ακόμη, αναφέρεται ότι η λήψη ψηφιακών ιστολογικών εικόνων σε εφαιλατωμένες τομές αποδεικνύεται συχνά προβληματική, καθώς είναι απαραίτητη η συχνή επανεστίαση του αντικειμενικού φακού του οπτικού μικροσκοπίου για τη σωστή αξιολόγηση των στοιχείων της μικροδομής του ιστού [122]. Τέλος, σε μια πρόσφατη μελέτη παρατηρήθηκε ότι οι αφαιλατωμένες τομές παρουσίαζαν ευκρινέστερες ιστολογικές

εικόνες σε σχέση με τις εφαιλατωμένες τομές, τόσο σε παλαιά, όσο και σε νωπά οστέινα τεμάχια [123].

Για τους λόγους που αναφέρθηκαν παραπάνω, περισυλλέχθηκαν οστά πλευρών οικόσιτων ζώων που ευρίσκονται συχνά στην περιοχή της Αττικής. Για την προετοιμασία των ιστών επιλέχθηκε η τεχνική της αφαλάτωσης, έτσι ώστε να ακολουθηθεί το καθιερωμένο πρωτόκολλο της Μονάδας Ιστοπαθολογίας του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ με τον διαθέσιμο εξοπλισμό. Με αυτόν τον τρόπο εξασφαλίστηκε η δυνατότητα επανάληψης ερευνητικά ή/και διερευνητικά (διαγνωστικά) σε περίπτωση επιτυχούς έκβασης αυτής της αρχικής μελέτης. Από τα οστά προέκυψαν ιστολογικά παρασκευάσματα αφαιλατωμένων τομών και αναλύθηκαν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του ιστού ανά άτομο και είδος. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν μεταξύ τους με σκοπό τη διερεύνηση σημείων ποιοτικής ιστολογικής διαφοροποίησης μεταξύ των ειδών. Για το σκοπό της μελέτης συμπεριλήφθηκαν ιστολογικά παρασκευάσματα αφαιλατωμένων ανθρώπινων πλευρών, αναλύθηκαν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του ιστού και ελέγχθηκαν για σημεία ιστολογικής διαφοροποίησης από τα υπόλοιπα είδη. Τέλος, παρατέθηκαν οι ευκρινέστερες ιστολογικές εικόνες στο παράρτημα της εργασίας, ως αρχικό δείγμα αναφοράς οστίτη ιστού πλευρών οικόσιτων θηλαστικών, όπως προτείνεται σε σχετική ερευνητική μελέτη [97].

4. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

4.1. Υλικό

Για την εκπόνηση της μελέτης περισυλλέχθηκαν ενταφιασμένα οστά πλευρών σκύλων και γατών από κοιμητήριο μικρών ζώων της περιοχής της Αττικής. Το κάθε οστό ανήκε σε διαφορετικό άτομο, ενώ δεν υπήρχαν διαθέσιμες πληροφορίες για τη φυλή, το μέγεθος του ζώου, την ηλικία θανάτου και το χρόνο ταφής.

Τα οστά των σκύλων και των γατών ταξινομήθηκαν ανά είδος και συσκευάστηκαν σε χάρτινες συσκευασίες μέχρι τη μεταφορά τους στη Μονάδα Δικαστικής Ανθρωπολογίας του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ, όπου και καθαρίστηκαν από τα υπολείμματα χρώματος με τη χρήση μαλακής βούρτσας (Εικόνα 84).



Εικόνα 84. Αριστερά: Αριστερή πλευρά σκύλου (*Canis familiaris*). Δεξιά: Αριστερή πλευρά γάτας (*Felis catus*).

Επίσης, περισυλλέχθηκαν νωπά τεμάχια οστών πλευρών βοοειδών, αιγοπροβάτων και χοίρων από κρεαταγορά της περιοχής της Αττικής. Το κάθε οστό ανήκε σε διαφορετικό άτομο, ενώ δεν υπήρχαν πληροφορίες για τη φυλή και την ηλικία σφαγής του ζώου.

Τα νωπά οστά των σφάγιων έφεραν επιπλέον μαλακά μόρια, τα οποία αφαιρέθηκαν μαζί με το περίοστεο με μηχανικό τρόπο. Για τη διευκόλυνση της μηχανικής αφαίρεσης

των μαλακών μορίων, τα οστικά τεμάχια παρέμειναν στην ψύξη στους 4°C για δέκα ημέρες έτσι ώστε να επιτευχθεί ως ένα βαθμό η αυτόλυση των ιστών [124] και η μερική αποσύνθεσή τους εξαιτίας της ενζυμικής δράσης των αερόβιων μικροοργανισμών της επιφάνειάς τους [125]. Η ιστολογική εικόνα του οστίτη ιστού φαίνεται ότι δεν επηρεάζεται σημαντικά από την έκθεσή του ακόμη και σε χαμηλότερες θερμοκρασίες των 4°C [64,126,127].

Τα οστά αφού έφτασαν σε θερμοκρασία δωματίου, εμβαπτίστηκαν σε χλιαρό νερό βρύσης. Η παραμονή τους διήρκησε περίπου δύο ώρες και επιχειρήθηκε η κατά το δυνατόν αφαίρεση των μαλακών μορίων με τη χρήση χειρουργικού ψαλιδιού, ανατομικής λαβίδας και αιμοστατικής λαβίδας (Εικόνα 85). Με αυτόν τον τρόπο ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο αφαίρεσης μαλακών μορίων με τη βοήθεια χλιαρού νερού, όπως προτείνουν αρκετοί συγγραφείς [1,106,128-131] σε πολύ συντομότερο χρόνο, δίνοντας έμφαση στην προσεκτική μηχανική αφαίρεσή τους. Η επιλογή της εμβάπτισης σε χλιαρό νερό με σκοπό την αφαίρεση των μαλακών μορίων θεωρείται η πιο ασφαλής μέθοδος για τη διατήρηση της ακεραιότητας του οστίτη ιστού [131].

Έπειτα από την αφαίρεση των μαλακών μορίων, αφαιρέθηκε η υγρασία από την επιφάνεια των οστών με απορροφητικό χαρτί και τοποθετήθηκαν σε δοχείο με χαμηλά τοιχώματα. Το δοχείο σκεπάστηκε ερμητικά με πυκνό δίχτυ, έτσι ώστε να αποτρέπεται η επαφή αρθροπόδων με τους ιστούς και τοποθετήθηκε σε εξωτερικό, καλά αεριζόμενο χώρο, προστατευμένο από την άμεση ηλιακή ακτινοβολία. Η τοποθέτηση των οστών σε αυτό το περιβάλλον, τους επέτρεψε να στεγνώσουν επαρκώς έπειτα από τη διαβροχή τους, όπως προτείνεται [1].

Τα οστά παρέμειναν στο εξωτερικό περιβάλλον για τέσσερις εβδομάδες και ελέγχονταν καθημερινά για τυχόν αλλοιώσεις και δυσάρεστες οσμές. Η θερμοκρασία του περιβάλλοντος κυμαίνονταν από τους 8,5°C έως 19,6°C και η υγρασία από 62,2% έως 65,9%, σύμφωνα με την Εθνική Μετεωρολογική Υπηρεσία για τους μήνες Μάρτιο–Απρίλιο. Όταν η εξωτερική τους επιφάνεια και η σπογγώδης μοίρα απέκτησαν ξηρή όψη (Εικόνα 86) και περιορίστηκαν στο ελάχιστο οι δυσάρεστες οσμές, τοποθετήθηκαν σε χάρτινες συσκευασίες.



Εικόνα 85. Νοπά τεμάχια οστών πλευρών αιγοπροβάτων (*Capra*, *Ovis*) πάνω αριστερά, βοοειδών (*Bos taurus*) πάνω δεξιά, χοίρων (*Sus scrofa domestica*) κάτω αριστερά έπειτα από την παραμονή τους σε συνθήκες ψύξης και πριν την αφαίρεση των μαλακών μορίων. Κάτω δεξιά: Εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν για την αφαίρεση των μαλακών μορίων.



Εικόνα 86. Οστά πλευρών έπειτα από την αφαίρεση των μαλακών μορίων και την παραμονή τους στο εξωτερικό περιβάλλον. Αριστερά: Πλευρά χοίρου. Κέντρο: Πλευρά αιγοπροβάτου, Δεξιά: Τεμάχιο πλευράς βοοειδούς.

Τέλος, για λόγους σύγκρισης συμπεριλήφθηκε στη μελέτη ένα τμήμα ανθρώπινης πλευράς από δείγματα της Μονάδας Δικαστικής Ανθρωπολογίας του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ. Η πλευρά ανήκε σε νεαρό ενήλικο άνδρα, ηλικίας 25-30 ετών και παρασκευάστηκε με βρασμό. Ωστόσο, εξαιτίας της μη τυπικής ιστολογικής εικόνας που εμφάνισε το συγκεκριμένο ιστοτεμάχιο, συμπεριλήφθηκαν για το σκοπό της μελέτης ιστολογικά παρασκευάσματα ανθρώπινης πλευράς από νεκροτομικό υλικό της Μονάδας Ιστοπαθολογίας του Εργαστηρίου. Η πλευρά ανήκε σε γυναίκα 72 ετών και το ιστοτεμάχιο προήλθε από τη μεσότητα του σώματος του οστού.

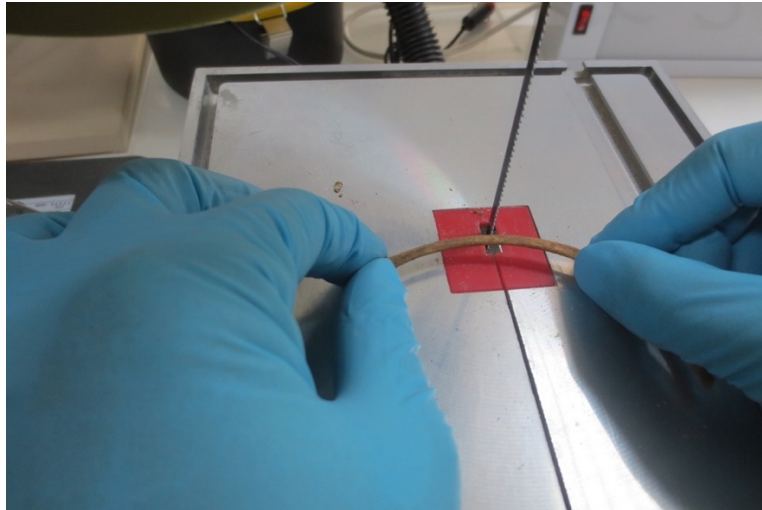
4.2. Μεθοδολογία

4.2.1. Λήψη ιστοτεμαχίων

Στη συνέχεια οι πλευρές τεμαχίστηκαν με τη χρήση ηλεκτρικού πριονιού και ελήφθησαν ιστοτεμάχια μήκους 1,5cm από τις πλευρές των βοοειδών και 3cm από τις πλευρές των υπόλοιπων ειδών (Εικόνες 87-88). Συγκεκριμένα οι τομές ελήφθησαν σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Ταξινόμηση ιστοτεμαχίων πλευρών.

<i>Canis familiaris</i> (CA)	<i>Felis catus</i> (FB)	<i>Sus scrofa</i> (SC)	<i>Ovis & Capra</i> (OD)	<i>Bos taurus</i> (BE)	<i>Homo sapiens</i> (HS)
I. Στερνικό άκρο	I. Στερνικό άκρο	I. Στερνικό άκρο	I. Στερνικό άκρο	I. Πιθανώς στερνικό άκρο	I. Μεσότητα σώματος
1. Δεξιά πλευρά-στερνικό άκρο	1. Δεξιά πλευρά-στερνικό άκρο	1. Δεξιά πλευρά-στερνικό άκρο	1. Δεξιά πλευρά-στερνικό άκρο	1. Πιθανώς στερνικό άκρο	
2. Δεξιά πλευρά-στερνικό άκρο	2. Αριστερή πλευρά-στερνικό άκρο	2. Δεξιά πλευρά-στερνικό άκρο	2. Δεξιά πλευρά-στερνικό άκρο	2. Πιθανώς στερνικό άκρο	
3. Αριστερή πλευρά-στερνικό άκρο	3. Αριστερή πλευρά-στερνικό άκρο	3. Στερνικό άκρο	3. Αριστερή πλευρά-στερνικό άκρο	3. Πιθανώς στερνικό άκρο	
	0. Στερνικό άκρο				



Εικόνα 87. Κοπή οστών με τη χρήση ηλεκτρικού πριονιού.



Εικόνα 88. Πάνω αριστερά: Πλευρές χοίρων έπειτα από τη λήψη ιστοτεμαχίων. Πάνω δεξιά: Πλευρές αιγοπροβάτων έπειτα από τη λήψη ιστοτεμαχίων. Κάτω: Πλευρές σκύλων (αριστερά) και γάτων (δεξιά) έπειτα από τη λήψη ιστοτεμαχίων.

Τα ιστοτεμάχια τοποθετήθηκαν σε άσηπτους περιέκτες και μεταφέρθηκαν στο παρασκευαστήριο της Μονάδας Ιστοπαθολογίας του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ για την προετοιμασία των ιστολογικών παρασκευασμάτων.

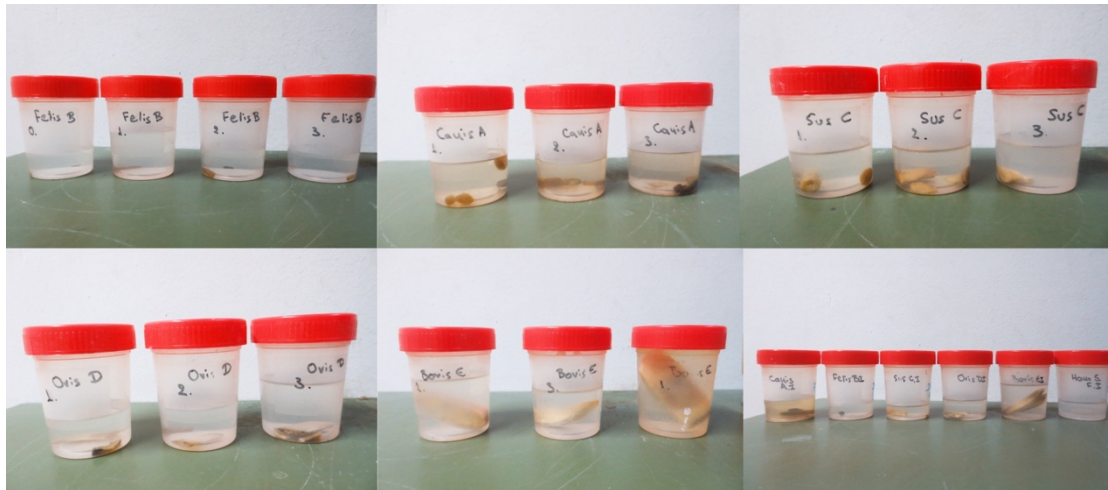
4.2.2. Μονιμοποίηση

Η μονιμοποίηση των οστικών ιστοτεμαχίων αποτελεί έναν απαραίτητο χειρισμό πριν από την οποιαδήποτε περαιτέρω επεξεργασία του ιστού με σκοπό τη λήψη ποιοτικών και πλήρως παρατηρήσιμων ιστολογικών τομών [75,82,132]. Με τη μονιμοποίηση των ιστών επιτυγχάνεται η παύση της αυτόλυσης και της βακτηριακής αποσύνθεσής τους, διατηρείται η μικροδομή τους, διευκολύνονται οι μελλοντικοί χειρισμοί τους καθώς αποκτούν σκληρότητα και ενισχύεται η χημική συγγένεια των ιστών με ορισμένες χρώσεις [82,132]. Ειδικότερα, σε ιστολογικές τομές οστών που πρόκειται να αφαλατωθούν η μονιμοποίηση προστατεύει τον ιστό από την καταστρεπτική δράση του διαλύματος αφαλάτωσης [75].

Στους μονιμοποιητικούς παράγοντες περιλαμβάνονται χημικοί παράγοντες, όπως αλδεΐδες, οξειδωτικοί παράγοντες, πηκτικοί παράγοντες, καθώς και φυσικοί παράγοντες, όπως η θερμότητα και η ψύξη [75,82,132]. Για τη μονιμοποίηση των ιστοτεμαχίων χρησιμοποιήθηκε διάλυμα φορμόλης. Η φορμόλη διαθέτει ικανοποιητική διεισδυτικότητα, αλλά σχετικά αργή μονιμοποιητική δράση, η οποία επιτυγχάνεται μέσω της ανάπτυξης ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ των καταλοίπων λυσίνης των πρωτεϊνών του ιστού [75,82].

Το κάθε ιστοτεμάχιο τοποθετήθηκε σε άσηπτο πλαστικό περιέκτη και καλύφθηκε με μονιμοποιητικό διάλυμα φορμόλης 10% έτοιμης προς χρήση. Για την παρασκευή του διαλύματος φορμόλης 10% (πραγματικής συγκέντρωσης 3,7%v/v) χρησιμοποιήθηκε εμπορικό σκεύασμα φορμαλδεΐδης 37% σταθεροποιημένο με 9%-14%w/w μεθανόλη και pH=7, το οποίο αραιώθηκε με απεσταγμένο νερό σε αναλογία 10% (100ml διαλύματος φορμαλδεΐδης σε 900ml απεσταγμένου νερού).

Ο όγκος του μονιμοποιητικού διαλύματος που τοποθετήθηκε σε κάθε περιέκτη υπολογίστηκε κατά προσέγγιση, έτσι ώστε να είναι τουλάχιστον δεκαπλάσιος έως εικοσαπλάσιος του όγκου του ιστοτεμαχίου, όπως προτείνεται από τη σχετική βιβλιογραφία [82]. Τα δείγματα παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου, προστατευμένα από ηλιακή ακτινοβολία και η πορεία της μονιμοποίησης ελεγχόταν σε εβδομαδιαία βάση (Εικόνα 89).



Εικόνα 89. Ιστοτεμάχια πλευρών τοποθετημένα σε περιέκτες με μονιμοποιητικό διάλυμα φορμόλης 10%.

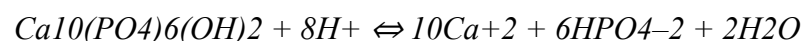
Το διάλυμα φορμόλης αλλάχθηκε με νέο σε διάστημα τριών εβδομάδων, για τα δείγματα CA.1, CA.2, CA.3, FB.0, FB.1, FB.2, FB.3, SC.1, SC.2, SC.3, OD.1, OD.2, OD.3, BE.1, BE.2, BE.3 και σε διάστημα 12 ημερών για τα δείγματα CA.I, FB.I, SC.I, OD.I, BE.I, HS.I, οπότε και διαπιστώθηκε έντονη θολερότητα του υγρού.

Η μονιμοποίηση των ιστών ολοκληρώθηκε σε 27 ημέρες για τα δείγματα CA.1, CA.2, CA.3, FB.0, FB.1, FB.2, FB.3, SC.1, SC.2, SC.3, OD.1, OD.2, OD.3, BE.1, BE.2, BE.3 και σε 14 ημέρες για τα δείγματα CA.I, FB.I, SC.I, OD.I, BE.I, HS.I.

Ο χρόνος που απαιτείται για τη μονιμοποίηση τομών συμπαγούς οστίτη ιστού υπολογίζεται περί τα 2mm ιστού ανά 24h κατά προσέγγιση, έτσι ένα οστέινο τεμάχιο ενδέχεται να χρειάζεται εβδομάδες για την ολοκλήρωση της μονιμοποίησής του [82].

4.2.3. Αφαλάτωση

Για την προετοιμασία των δειγμάτων της μελέτης τα ιστοτεμάχια αφαλατώθηκαν με τη χρήση διαλύματος οξέος. Η αφαλάτωση των οστών είναι μια απαραίτητη διαδικασία έτσι ώστε να επιτευχθεί η διάλυση των αλάτων του ιστού σύμφωνα με την παρακάτω χημική αντίδραση:



Η απομάκρυνση της ανόργανης ουσίας του οστού έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της σκληρότητάς του και καθιστά εφικτή τη λήψη ιστολογικών τομών έπειτα από τη σκλήνωση του ιστού σε κύβους παραφίνης [82]. Οι χημικές ουσίες που

χρησιμοποιούνται για την αφαλάτωση των οστών περιλαμβάνουν χηλικούς παράγοντες, ισχυρά και ασθενή οξέα.

Για το σκοπό της μελέτης χρησιμοποιήθηκε νιτρικό οξύ. Το αρχικό διάλυμα νιτρικού οξέος συγκέντρωσης 65%v/v αραιώθηκε με απεσταγμένο νερό και προέκυψαν δύο τελικά υδατικά διαλύματα νιτρικού οξέος συγκεντρώσεων 5% (πραγματική συγκέντρωση 3,25%v/v) και 7% (πραγματική συγκέντρωση 4,55%v/v) του αρχικού διαλύματος, με pH=1. Στους περιέκτες με τα δείγματα CA.1, CA.2, CA.3, FB.0, FB.1, FB.2, FB.3, SC.1, SC.2, SC.3, OD.1, OD.2, OD.3, BE.1, BE.2, BE.3 τοποθετήθηκαν 100ml διαλύματος 5% ανά περιέκτη. Στους περιέκτες με τα δείγματα CA.I, FB.I, SC.I, OD.I, BE.I, HS.I τοποθετήθηκαν 100ml διαλύματος 7% ανά περιέκτη και η πορεία της αφαλάτωσης ελεγχόταν καθημερινά. Τα δείγματα παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου.

Είναι σημαντικός ο έλεγχος του τελικού σημείου της αφαλάτωσης, καθώς η παρατεταμένη αφαλάτωση έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή της οργανικής θεμέλιας ουσίας του ιστού και την παρασκευή ιστολογικών εικόνων χαμηλής ευκρίνειας [75,82]. Ο έλεγχος μπορεί να γίνει με ακτινογραφικό έλεγχο, χημικό έλεγχο με διαλύματα οξαλικού αμμωνίου και υδροξειδίου του αμμωνίου και με διερευνητικούς χειρισμούς με τη χρήση αιχμηρών αντικειμένων [75,82].

Για λόγους ευχρηστίας το τελικό σημείο αφαλάτωσης κάθε δείγματος ελέγχθηκε με τη χρήση χειρουργικού νυστεριού, όπου κατέστη δυνατή η κοπή των οστέινων ιστοτεμαχίων. Η χρονική διάρκεια παραμονής των δειγμάτων στο διάλυμα αφαλάτωσης, που εξαρτάται από το μέγεθος και το πορώδες του ιστού [82], περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3).

Πίνακας 3. Χρονική διάρκεια παραμονής των ιστοτεμαχίων στα διαλύματα οξέων.

Νιτρικό οξύ 5%					Νιτρικού οξύ 7%
CA.1 3ημέρες	FB.0 2ημέρες	SC.1 14ημέρες	OD.1 2ημέρες	BE.1 30ημέρες	CA.I 1ημέρα
CA.2 2ημέρες	FB.1 2ημέρες	SC.2 14ημέρες	OD.2 2ημέρες	BE.2 30ημέρες	FB.I 1ημέρα
CA.3 2ημέρες	FB.2 2ημέρες	SC.3 14ημέρες	OD.3 7ημέρες	BE.3 30ημέρες	SC.I 6ημέρες
	FB.3 2ημέρες				OD.I 15ημέρες
					BE.I 15ημέρες
					HS.I 1ημέρα

Έπειτα από την αφαίρεση του κάθε δείγματος από το διάλυμα οξέος απομακρύνθηκε με χειρουργικό νυστέρι ιστός μήκους 2,5mm από το εγγύς άκρο των τομών. Έπειτα, ελήφθησαν τρεις παρακείμενες εγκάρσιες τομές ιστού, μήκους 2,5mm έκαστη για τα δείγματα [CA, FB, SC, OD, BE (0-3)] και μία εγκάρσια τομή μήκους 2,5mm για τα δείγματα CA.I, FB.I, SC.I, OD.I, BE.I., HS.I. Κατά συνέπεια, προέκυψαν συνολικά 24 ιστοτεμάχια. Στη συνέχεια τα ιστοτεμάχια τοποθετήθηκαν σε κασέτες έγκλεισης ιστών με προσανατολισμό του εγγύς άκρου προς τα κάτω και καταγράφηκαν με μολύβι οι κωδικοί των δειγμάτων. Τέλος, τοποθετήθηκαν σε δοχείο με νερό βρύσης έτσι ώστε να απομακρυνθεί το διάλυμα οξέος και επανατοποθετήθηκαν σε διάλυμα φορμόλης 10% μέχρι την έναρξη του επόμενου σταδίου.

4.2.4. Αφυδάτωση και διαύγαση

Για την έγκλειση των ιστών σε κύβους παραφίνης είναι απαραίτητη η προηγούμενη αφυδάτωσή τους και η πλήρης απομάκρυνση των υδάτινων διαλυμάτων, καθώς η παραφίνη είναι υδρόφοβη [75,82,133]. Η αφυδάτωση των ιστών γίνεται σταδιακά σε διαλύματα αλκοόλης αυξανόμενης συγκέντρωσης έτσι ώστε να αποφευχθεί η συρρίκνωση και η σκλήρυνση του ιστού [82,133]. Με τη διαύγαση του ιστού με τη χρήση ξυλόλης πραγματοποιείται ο καθαρισμός του ιστού από την αλκοόλη και καθίσταται δυνατός ο τελικός εμποτισμός του με υγρή παραφίνη [82]. Τέλος, η υγρή παραφίνη στους 60°C αντικαθιστά την ξυλόλη και καθιστά εφικτή την έγκλειση (σκλήρυνση) του ιστοτεμαχίου σε κύβους παραφίνης [82].

Για τους λόγους αυτούς οι κασέτες με τα ιστοτεμάχια τοποθετήθηκαν για επεξεργασία στην επιτραπέζια ιστοκινέτα Shandon Citadel 2000, Thermo Scientific (Εικόνα 90) με το ακόλουθο πρόγραμμα, συνολικής διάρκειας 18 ωρών (Πίνακας 4).

Πίνακας 4. Στάδια επεξεργασίας ιστών στην ιστοκινέτα.

Δοχείο	Διάλυμα	Διάρκεια	Θερμοκρασία	Δράση
1	Φορμόλη έτοιμη προς χρήση 10%	1:30h	T δωματίου	Ώσμωση /Μονιμοποίηση
2	Φορμόλη έτοιμη προς χρήση 10%	1:30h	T δωματίου	Ώσμωση/ Μονιμοποίηση
3	Αλκοόλη 70%	1h	T δωματίου	Αφυδάτωση
4	Αλκοόλη 80%	1h	T δωματίου	Αφυδάτωση
5	Αλκοόλη 95%	1h	T δωματίου	Αφυδάτωση
6	Αλκοόλη 95%	1h	T δωματίου	Αφυδάτωση

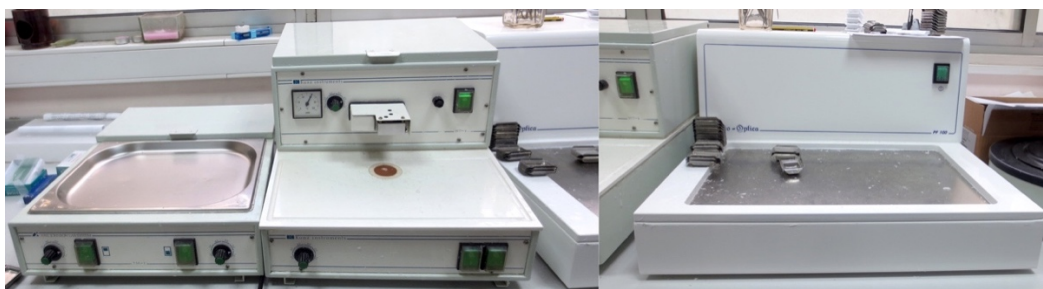
7	Αλκοόλη 100%	2h	T δωματίου	Αφυδάτωση
8	Αλκοόλη 100%	2h	T δωματίου	Αφυδάτωση
9	Ξυλόλη	1:30h	T δωματίου	Διαύγαση
10	Ξυλόλη	1:30h	T δωματίου	Διαύγαση
11	Υγρή παραφίνη	2h	60 °C	Αντικατάσταση Ξυλόλης/Εμποτισμός
12	Υγρή παραφίνη	2h	60 °C	Αντικατάσταση Ξυλόλης/Εμποτισμός



Εικόνα 90. Η επιτραπέζια ιστοκινέτα.

4.2.5. Έγκλειση σε παραφίνη

Για να καταστεί δυνατή η λήψη τομών από το μικροτόμο είναι απαραίτητη η στερέωση του ιστού σε κατάλληλο μέσο σκλήρωσης [75]. Για το λόγο αυτό, έπειτα από την ολοκλήρωση της επεξεργασίας των ιστών στην ιστοκινέτα, οι κασέτες τοποθετήθηκαν σε θερμαινόμενη πλάκα στους 60°C προς αποφυγή πήξης της παραφίνης. Το κάθε ιστοτεμάχιο τοποθετήθηκε με προσανατολισμό του εγγύς άκρου προς τα κάτω σε μεταλλικό καλούπι βιοψίας, και πραγματοποιήθηκε η έγκλειση του ιστού σε υγρή παραφίνη σε μηχανήμα σκλήρωσης. Στη συνέχεια, τα καλούπια με τους διαποτισμένους ιστούς με την υγρή παραφίνη τοποθετήθηκαν σε ψυχόμενη πλάκα, θερμοκρασίας 15°C, μέχρι που κατέστη δυνατή η αποκόλληση των κύβων παραφίνης-ιστού (block) από τα καλούπια χωρίς αντίσταση (Εικόνα 91). Τέλος, το block παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου ώσπου να ολοκληρωθεί η σκλήρωση των ιστών.



Εικόνα 91. Από αριστερά προς τα δεξιά απεικονίζονται η θερμαινόμενη πλάκα, το μηχάνημα σκίρωσης ιστών και η ψυχόμενη πλάκα.

4.2.6. Λήψη τομών

Για τη λήψη των ιστολογικών τομών, ο κάθε κύβος παραφίνης με τον εγκλεισμένο ιστό τοποθετήθηκε στην κεφαλή του περιστροφικού μικροτόμου Thermo-Shandon Finesse E, ο οποίος έφερε στη βάση του ατσάλινη λεπίδα A35. Αρχικά, απορρίφθηκαν τα εξωτερικά στρώματα της παραφίνης και του ιστού, έπειτα από το πλάνισμα του κύβου με τη λειτουργία «trim» του μικροτόμου, σε βάθος 10μ. Το block με την ομαλοποιημένη πλέον επιφάνεια του ιστού τοποθετήθηκε σε ψυχόμενη πλάκα και έπειτα λήφθηκαν εγκάρσιες ιστολογικές τομές πάχους 2-3μm.

Η κάθε ιστολογική τομή που λήφθηκε τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 45°C, το οποίο περιείχε απεσταγμένο νερό και ελάχιστο οινόπνευμα (περί τα 10ml). Στη συνέχεια επικολλήθηκε σε θετικώς φορτισμένη αντικειμενοφόρο πλάκα, έπειτα από την εμβάπτιση της δεύτερης παραπλεύρωσ της τομής (Εικόνα 92).

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τις τομές τοποθετήθηκαν σε μεταλλικά καλάθια και παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου να στεγνώσουν. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε κλίβανο, στους 60°C για >3 ώρες (εναλλακτικά, στους 40°C έως την επόμενη μέρα), ώστε να ολοκληρωθεί η αρχική αποπαραφίνωση του ιστού.



Εικόνα 92. Απεικονίζονται ο μικροτόμος (δεξιά) και το υδατόλουτρο (αριστερά).

4.2.7. Χρώσεις και επικάλυψη

Προκειμένου να είναι δυνατή η παρατήρηση του ιστού στο οπτικό μικροσκόπιο, είναι απαραίτητη η χρώση του με ειδικές ιστολογικές χρώσεις [75,133,134]. Η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη είναι η χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης [75,82,134].

Η αιματοξυλίνη εκχυλίζεται από τον κορμό του φυτού *Haematoxylon campechianum*, είναι μία φυσική χρωστική, η οποία συμπεριφέρεται ως βασική ένωση έπειτα από την ανάμιξή της με προστύμματα (mordants) αργιλίου [75,134]. Χρωματίζει μπλέ/μωβ τα βασίφιλα (όξινα) στοιχεία των ιστών, όπως οι πυρήνες των κυττάρων, ο χόνδρος, καθώς και βασίφιλες περιοχές του κυτταροπλάσματος [134].

Η ηωσίνη είναι μία όξινη ένωση που παρασκευάζεται από την φλουορεσκεΐνη και χρωματίζει ροζ έως κόκκινο τα οξύφιλα (βασικά) στοιχεία των ιστών, όπως το κυτταρόπλασμα των κυττάρων, οι ίνες κολλαγόνου, οι μυϊκές ίνες και τα ερυθροκύτταρα [133,134].

Για τη χρώση των τομών με αιματοξυλίνη-ηωσίνη, οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τους ιστούς τοποθετήθηκαν στο αυτόματο χρωστικό μηχάνημα Varistain V24-4, Thermo Shandon Limited (Εικόνα 93) με το ακόλουθο πρόγραμμα εργασιών, συνολικής διάρκειας 70min (Πίνακας 5).

Πίνακας 5. Στάδια χρώσης αιματοξυλίνης-ηωσίνης

Δοχείο	Διάλυμα	Διάρκεια	Δράση
1	Υποκατάστατο ξυλόλης	15min	Αποπαραφίνωση
2	Υποκατάστατο ξυλόλης	15min	Αποπαραφίνωση
3	Ξυλόλη/Ακετόνη: 50/50	30sec	Αποπαραφίνωση/ Απομάκρυνση ξυλόλης
4	Αλκοόλη 100%	2min	Απομάκρυνση ξυλόλης

5	Αλκοόλη 100%	2min	Απομάκρυνση ξυλόλης
6	Αλκοόλη 95%	2min	Σταδιακή ενυδάτωση
7	Αλκοόλη 95%	2min	Σταδιακή ενυδάτωση
8	Αλκοόλη 80%	2min	Σταδιακή ενυδάτωση
9	Αλκοόλη 70%	2min	Σταδιακή ενυδάτωση
10	Νερό βρύσης	20sec	Έκπλυση
11	Αιματοξυλίνη Harris	10min	Βασίφιλη χρώση
12	Νερό βρύσης	3min	Έκπλυση
13	Όξινη αλκοόλη: 0,5-1%v/v πυκνό δ/μα HCl/ αλκοόλη 70%	20sec	Διαφοροποίηση*
14	Νερό βρύσης	20sec	Έκπλυση
15	Ηωσίνη αλκοολική, 0,5%	2min	Οξύφιλη χρώση
16	Οινόπνευμα 100%	30sec	Αφυδάτωση
17	Οινόπνευμα 100%	30sec	Αφυδάτωση
18	Οινόπνευμα 100%	30sec	Αφυδάτωση
19	Υποκατάστατο ξυλόλης	5min	Διαύγαση
20	Υποκατάστατο ξυλόλης	5min	Διαύγαση

*Απομάκρυνση περίσσιας χρωστικής [132].



Εικόνα 93. Το αυτόματο μηχάνημα χρώσης αιματοξυλίνης/ηωσίνης του Εργαστηρίου.

Ακόμη μία ιστολογική χρώση που εφαρμόζεται στις ιστολογικές τομές οστίτη είναι η τριχρωματική Masson. Η διαγνωστική αξία αυτής της χρώσης στηρίζεται στην ιδιότητά της να διαχωρίζει το κολλαγόνο από το μυϊκό ιστό. Ως εκ τούτου, οι κολλαγόνες ίνες χρωματίζονται μπλε υπό την σύνδεσή τους με τη χρωστική aniline blue, οι μυϊκές ίνες και το κυτταρόπλασμα χρωματίζονται κόκκινα από την Fuchsin ronceau, ενώ η αιματοξυλίνη χρωματίζει μαύρους τους πυρήνες των κυττάρων [22,134,135].

Ακόμη, σε αφαιρωμένες τομές οστίτη ιστού έχει την ικανότητα να διαχωρίζει τον οστίτη ιστό που χρωματίζεται σκούρος μπλε από το χόνδρο, ο οποίος χρωματίζεται ανοικτό γαλάζιο [82]. Ωστόσο, αναφέρεται ότι σε ιστολογικές τομές ώριμου οστίτη ιστού κεχρωσμένες με τρίχρωμη Masson ενδέχεται να εμφανίζονται μπλε και κόκκινες

περιοχές οι οποίες δεν σχετίζονται με τη μικροσκοπική δομή του [135], ενώ αρκετοί συγγραφείς εντοπίζουν τον ώριμο επιμεταλλωμένο οστίτη από την κόκκινη και τον δικτυωτό από την μπλε χρώση [136-138]. Τέλος, υπάρχει διχογνωμία σχετικά με την απεικόνιση του οστεοειδούς, με ορισμένους συγγραφείς να αναφέρουν ότι εμφανίζει μπλε απόχρωση [135,137], ενώ άλλοι υποστηρίζουν ότι βάφεται κόκκινο έπειτα από τη χρώση του ιστού [36,139].

Για τη χρώση των τομών με τριχρωματική χρώση Masson, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρείας, έπειτα από την αποπαραφίνωσή τους και την ενυδάτωσή τους με απεσταγμένο νερό (Πίνακας 6):

Πίνακας 6. Στάδια χρώσης Masson Trichrome, σύμφωνα με το: *Diapath Masson Trichrome Kit for special stain data sheet*. Παρατηρήσεις: [135]

Διάλυμα	Διάρκεια	Δράση
Gill II hematoxylin	5min	Χρώση πυρήνων - Μαύρο
Τρεχούμενο νερό	5min	Έκπλυση
Saturated alcoholic solution picric acid	5min	Ενίσχυση χρώσης
Απεσταγμένο νερό	30sec	Έκπλυση
Fuchsin ponceau acc. Masson	10min	Χρώση κυτταροπλάσματος / μυϊκού ιστού - Ερυθρό
Τρεχούμενο νερό		Έκπλυση
Phosphomolybdic acid acc. Masson	4min	Ενίσχυση χρώσης κολλαγόνου- Απόρριψη μετά την εφαρμογή χωρίς έκπλυση
Aniline blue acc. Masson	1min	Χρώση κολλαγόνου - Μπλε
Αλκοόλη και υποκατάστατο ξυλόλης		Αφυδάτωση και Διαύγαση

Τέλος, οι τομές στις αντικειμενοφόρες πλάκες επικαλύφθηκαν με επικαλυπτικό υλικό και στην επιφάνειά τους στερεώθηκε η καλυπτρίδα, έτσι ώστε να προστατευτούν οι ιστοί και να καταστεί δυνατή η παρατήρησή τους σε οπτικό μικροσκόπιο [134].

4.2.8. Παρατήρηση και λήψη ψηφιακών εικόνων

Τα ιστολογικά παρασκευάσματα παρατηρήθηκαν με τη χρήση του οπτικού μικροσκοπίου Zeiss AxioLab με αντικειμενικούς φακούς Zeiss Achromplan, στο Εργαστήριο Ιστολογίας-Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ. Κατά τη λήψη των ψηφιακών μικροφωτογραφιών για το σκοπό της μελέτης επιλέχθηκαν κυρίως οι αντικειμενικοί φακοί μεγέθυνσης 5x/0,15 και 10x/0,25. Οι φακοί μεγαλύτερης μεγέθυνσης 20x/0,45 και 40x/0,65 χρησιμοποιήθηκαν για την σαφέστερη απεικόνιση

ορισμένων ιστολογικών δομών. Η φωτογράφιση των δειγμάτων έγινε με την ψηφιακή κάμερα SONY CCD-IRIS και ελήφθησαν ψηφιακές μικροφωτογραφίες σε μορφή .tiff μέσω του προγράμματος Image Pro-Plus 3.1 της Media Cybernetics. Η παρατήρησή τους, οι διορθώσεις και η επεξεργασία τους πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνας PixelmatorPro 2. Οι τελικές εικόνες που συμπεριλήφθηκαν στην εργασία ήταν μορφής .jpg λόγω του μικρότερου μεγέθους αρχείου.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Για το σκοπό της μελέτης παρασκευάστηκαν συνολικά 142 ιστολογικά παρασκευάσματα. Έπειτα από την ποιοτική αξιολόγησή τους με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου επιλέχθηκαν τα καταλληλότερα και ελήφθησαν συνολικά 511 ψηφιακές μικροφωτογραφίες. Ακολούθησε η ποιοτική ιστολογική ανάλυση και η σύγκριση των ιστολογικών χαρακτηριστικών μεταξύ των ειδών με σκοπό τη διερεύνηση σημείων ποιοτικής ιστολογικής διαφοροποίησης.

5.1. Άνθρωπος

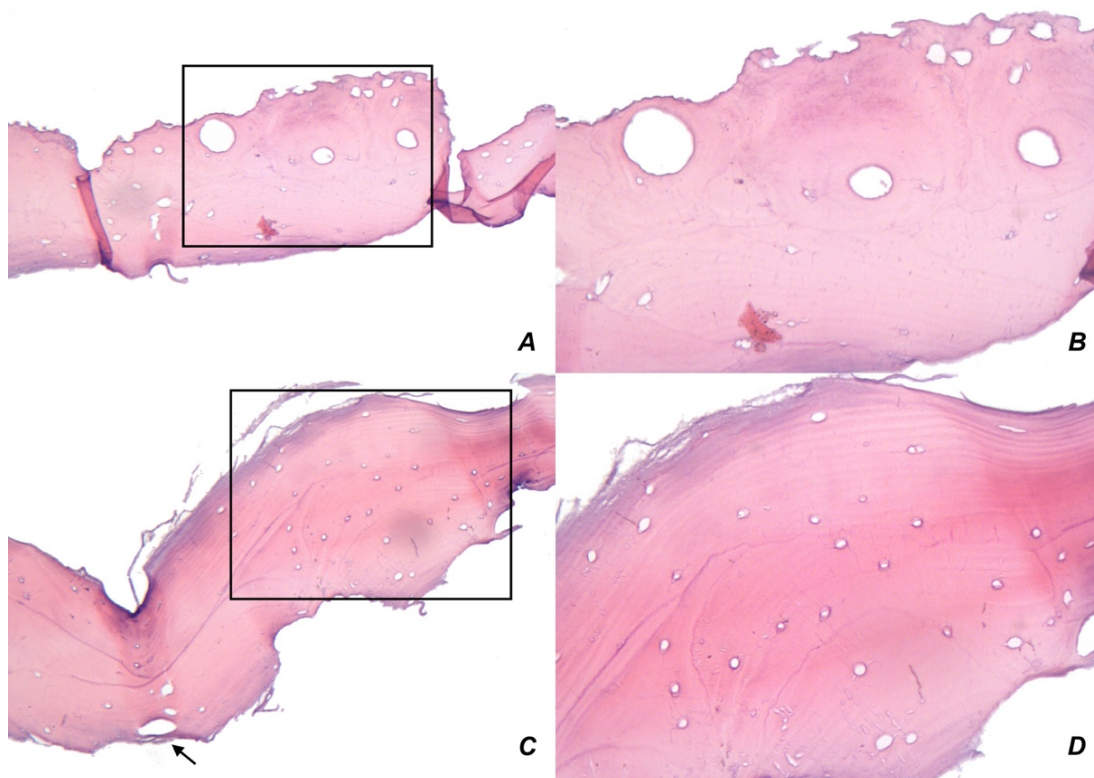
Αξιολόγηση τελικού σημείου αφαλάτωσης

Οι ιστολογικές εικόνες των παρασκευασμάτων που προέκυψαν έπειτα από την αφαλάτωση του ιστοτεμαχίου ανθρώπινης πλευράς του ατόμου HSF1 σε υδατικό διάλυμα νιτρικού οξέος 7%, για χρονική διάρκεια 24 ωρών ήταν ικανοποιητικές.

Ποιοτική ιστολογική ανάλυση

Ο συμπαγής οστίτης ιστός παρουσίαζε εκτεταμένες περιοχές πεταλιώδους οστίτη ιστού, περιφερικό και περιμυελικό πεταλιώδη οστίτη ιστό, με ελάχιστους αγγειακούς σωλήνες, ενώ στερούταν αγγείωσης στη μεγαλύτερη έκτασή του. Κατά μήκος των οστέινων πεταλίων ήταν εμφανή πολυάριθμα οστικά βοθρία, κυκλικού έως ελλειπτικού σχήματος, τα οποία παρατάσσονταν παράλληλα με τα οστέινα πετάλια του ιστού. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν περιοχές δευτερογενούς οστίτη ιστού με διάσπαρτους μεσαίου έως μεγάλου μεγέθους κυκλικούς οστεώνες, με εμφανείς γραμμές οστεοποίησης και εκτεταμένα διάμεσα συστήματα.

Η μικροαρχιτεκτονική του ιστού παρουσίαζε αρκετές αποκλίσεις από την αντιπροσωπευτική για το είδος εικόνα (Εικόνα 94), που αφορά πυκνό ή ακανόνιστο δευτερογενή οστίτη ιστό για τα οστά των πλευρών ενήλικων ατόμων [100]. Εξαιτίας της άτυπης μικροαρχιτεκτονικής του φλοιώδους οστού τα εν λόγω παρασκευάσματα εξαιρέθηκαν από τη συγκριτική μελέτη για την ταυτοποίηση των ειδών, όπως προτείνεται από τη σχετική βιβλιογραφία [64].



Εικόνα 94. Ιστολογικά παρασκευάσματα οστίτη ιστού ανθρώπινης πλευράς. A: Παρατηρούνται τρεις μεσαίου έως μεγάλου μεγέθους κυκλικοί δευτερογενείς οστεώνες με εμφανείς τις γραμμές οστεοποίησης στην περιφέρειά τους, με μεσαίου και μεγάλου μεγέθους Αβέρσειους σωλήνες και εκτεταμένα διάμεσα συστήματα. Ακόμη, εμφανή είναι ολιγάριθμα οστικά βοθρία, x100. B: Μεγέθυνση της περιγεγραμμένης περιοχής της εικόνας A: Παρατηρούνται ολιγάριθμα οστικά βοθρία στους οστεώνες, καθώς και στον περιφερικό πεταλιώδη ιστό, ο οποίος στερείται αγγείωσης, x200. C: Η περιοχή χαρακτηρίζεται από περιφερικό και περιμυελικό πεταλιώδη οστίτη ιστό που διαθέτει πολυάριθμα οστικά βοθρία, ενώ στερείται αγγείωσης στη μεγαλύτερη έκτασή του. Ακόμη είναι εμφανής ένας ελλειπτικός αγγειακός σωλήνας στα όρια με το ενδόστεο (βέλος), x100. D: Μεγέθυνση της περιγεγραμμένης περιοχής της εικόνας D: Είναι εμφανή τα οστικά βοθρία κυκλικού έως ελαφρώς ελλειπτικού σχήματος, που παρατάσσονται παράλληλα με τα οστείνα πετάλια του ιστού, x200. Χρώση H&E.

Για το σκοπό της μελέτης προστέθηκε ακόμη ένα ιστοτεμάχιο ανθρώπινης 4^{ης} πλευράς από νεκροτομικό υλικό της Μονάδας Ιστοπαθολογίας του Εργαστηρίου που ανήκει σε γυναίκα ηλικίας 72 ετών.

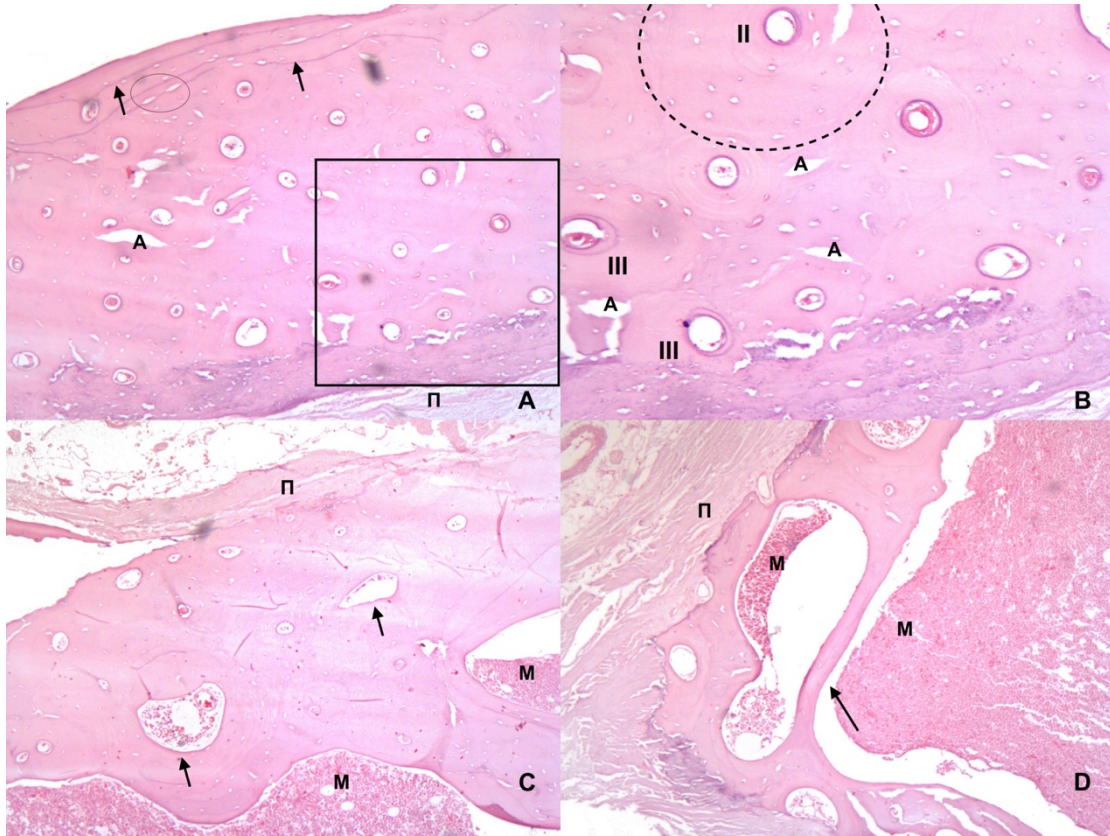
Ο συμπαγής οστίτης ιστός παρουσίαζε τη χαρακτηριστική οργάνωση του δευτερογενούς οστίτη ιστού. Στον παχύτερο έσω φλοιό ο πληθυσμός των οστεώνων ήταν υψηλότερος σε σχέση με τον λεπτότερο έξω φλοιό. Οι επιμήκως διατεταγμένοι μικρού έως μεγάλου μεγέθους κυκλικοί δευτερογενείς οστεώνες παρουσίαζαν γραμμές οστεοποίησης στην περιφέρειά τους και διάμεσα συστήματα περιορισμένης έκτασης. Οι Αβέρσειοι σωλήνες φέρονταν επιμήκως στον ιστό και το μέγεθός τους κυμαίνονταν από μικρό έως μεγάλο. Σε αυτή την περιοχή του ιστού παρατηρήθηκαν επιπλέον τύπου

Π-ένθετοι οστεώνες, καθώς και τύπου ΙΙΙ-οστεώνες διπλής ζώνης. Ακόμη, ο ιστός παρουσίαζε γραμμές ηρεμίας στην περιοχή έξω του ενδόστεου και γραμμές μεταστροφής έσω του περιόστεου. Κατά μήκος των γραμμών ηρεμίας εντοπίστηκαν πρωτογενείς οστεώνες, δύο από τους οποίους βρίσκονταν σε σειρά. Η περιοχή έσω του περιόστεου εμφάνιζε χαρακτηριστικά μη αγγειώδους δικτυωτού οστίτη ιστού, με τυχαία διάταξη των κολλαγόνων ινών και οστικά βοθρία μεγάλου μεγέθους και τυχαίας διάταξης, ο οποίος ενδεχομένως να οφειλόταν σε παθολογικά αίτια [140]. Τα περιμυελικά συστήματα έφεραν πεταλιώδη οστίτη ιστό, ο οποίος στερούταν αγγείωσης.

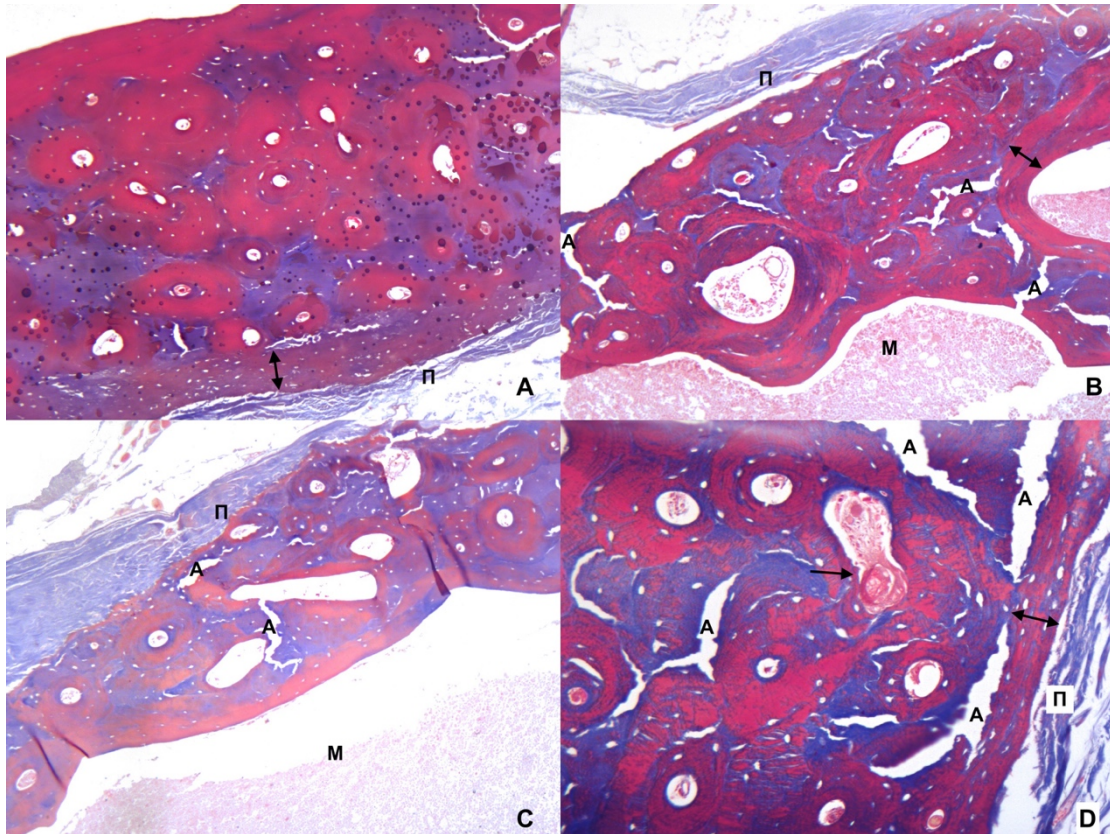
Στα χείλη της πλευράς ο συμπαγής οστίτης ιστός εμφάνιζε αρκετά μικρότερη διάμετρο με μικρό αριθμό ευμεγέθων αγγειακών σωλήνων στα όρια με το περιόστεο, καθώς και αγγειακούς σωλήνες με λοξή πορεία. Στην περιοχή αυτή εντοπίστηκε ένα σημείο απορρόφησης του οστού.

Στον έξω φλοιό του οστού ο αριθμός των δευτερογενών οστεώνων ήταν μικρότερος σε σχέση με τον έσω φλοιό και τα διάμεσα συστήματα περισσότερο εκτεταμένα. Οι περισσότεροι οστεώνες του έξω φλοιού είχαν μεγαλύτερο μέγεθος από εκείνους του έσω φλοιού και διέθεταν Αβέρσειους σωλήνες μεσαίου έως μεγάλου μεγέθους, κυκλικού έως ελλειπτικού σχήματος. Σε αυτήν την περιοχή του ιστού εντοπίστηκαν ευμεγέθεις Αβέρσειοι σωλήνες λοξής κατεύθυνσης, καθώς και δύο σωλήνες του Volkman. Ακόμη, εντοπίστηκε μη αγγειώδης πεταλιώδης οστίτης ιστός περιμυελικά.

Τέλος, σε όλη την έκταση του ιστού ήταν εμφανή τα οστικά βοθρία τόσο στα Αβέρσεια συστήματα, όσο και στα διάμεσα συστήματα (Εικόνες 95, 96).



Εικόνα 95. Ιστολογικά παρασκευάσματα οστίτη ιστού ανθρώπινης πλευράς. Α: Έσω φλοιός: Παρατηρούνται οι επιμήκως διατεταγμένοι μεσαίου έως μεγάλου μεγέθους κυκλικοί δευτερογενείς οστεώνες με εμφανείς τις γραμμές οστεοποίησης στην περιφέρειά τους και τα διάμεσα συστήματα περιορισμένης έκτασης. Εμφανείς είναι οι γραμμές ηρεμίας στην περιοχή του ενδόστεου (βέλη), καθώς και δύο πρωτογενείς οστεώνες σε σειρά (κύκλος), x50. Β: Μεγέθυνση της περιγεγραμμένης περιοχής της εικόνας Α: Είναι εμφανείς οι γραμμές οστεοποίησης στην περιφέρεια των οστεώνων. Επιπλέον, παρατηρούνται τα οστικά βοθρία τόσο στα Αβέρσεια συστήματα, όσο και στα διάμεσα συστήματα. Ακόμη, εμφανίζεται ένας τύπου ΙΙ-ένθετος οστεώνας (ΙΙ) και δύο τύπου ΙΙΙ-οστεώνες διπλής ζώνης (ΙΙΙ). Η περιοχή έσω του περιόστεου εμφανίζει χαρακτηριστικά δικτυωτού οστίτη ιστού, με τυχαία διάταξη των κολλαγόνων ινών και οστικά βοθρία μεγάλου μεγέθους και τυχαίας διάταξης. Ακόμη, στην ίδια περιοχή διακρίνονται οι γραμμές μεταστροφής, x100. C: Έξω φλοιός: Η πυκνότητα των οστεώνων είναι χαμηλότερη με περισσότερο εκτεταμένα διάμεσα συστήματα. Ακόμη, παρατηρούνται Αβέρσειοι σωλήνες με λοξή πορεία (βέλη), x50. D: Χείλος της πλευράς: Ο συμπαγής οστίτης ιστός εμφανίζει αρκετά μικρότερο και μικρό αριθμό ευμεγεθών αγγειακών σωλήνων στα όρια με το περιόστεο. Παρατηρείται μια λεπτή οστέινη δοκίδα (βέλος), x50. Μ: μυελοχώρος, Π: περιόστεο, Α: artifact. Χρώση Η&Ε.



Εικόνα 96. Ιστολογικά παρασκευάσματα οστίτη ιστού ανθρώπινης πλευράς. A: Έσω φλοιός: Παρατηρείται ευκρινώς η έκταση των δευτερογενών οστεώνων (κόκκινη χρώση), καθώς και η έκταση των διαμέσων συστημάτων (μπλε χρώση). Ακόμη, είναι εμφανής η περιοχή έσω του περιόστεου η οποία στερείται αγγείωσης, ενώ διαθέτει πολυάριθμα οστικά βοθρία (διπλό βέλος), x50. B: Έξω φλοιός: Παρατηρούνται επιμήκως διατεταγμένοι δευτερογενείς οστεώνες, καθώς και δύο Αβέρσειοι σωλήνες οι οποίοι φέρονται λοξά στον επιμήκη άξονα του ιστού. Ακόμη, παρατηρείται περιμυελικός πεταλιώδης ιστός ο οποίος στερείται αγγείωσης (διπλό βέλος), x50. C: Έξω φλοιός: Το πάχος του ιστού μειώνεται πλησίον του χείλους της πλευράς. Παρατηρούνται οι επιμήκως διατεταγμένοι δευτερογενείς οστεώνες, καθώς και εκείνοι που φέρονται λοξά στον ιστό, x50. D: Χείλος πλευράς: Παρατηρούνται οι επιμήκως διατεταγμένοι δευτερογενείς οστεώνες καθώς και μια περιοχή απορρόφησης του οστού (βέλος). Τέλος, παρατηρείται μια περιοχή έσω του περιόστεου η οποία στερείται αγγείωσης (διπλό βέλος), x100. M: μυελοχάρος, Π: περιόστεο, A: artifact. Χρώση Masson trichrome.

5.2.Βοοειδή

Αξιολόγηση τελικού σημείου αφαλάτωσης

Κατά τη διάρκεια της ποιοτικής αξιολόγησης των προερχόμενων από βοοειδή ιστολογικών παρασκευασμάτων διαπιστώθηκε ότι η αφαλάτωση τόσο των τομών που παρέμειναν στο διάλυμα νιτρικού οξέος 5% για 30 ημέρες, όσο και των τομών που παρέμειναν στο διάλυμα νιτρικού οξέος 7% για 15 μέρες δεν ήταν επαρκής. Για το λόγο αυτό, τα εναπομένοντα μερικώς αφαλατωμένα ιστοτεμάχια τα οποία παρέμειναν

σε διάλυμα φορμόλης επανατοποθετήθηκαν σε διάλυμα νιτρικού οξέος περιεκτικότητας 10% επί του αρχικού διαλύματος 65%v/v. Ο έλεγχος της πορείας της αφαλάτωσης ελεγχόταν καθημερινά και ο χρόνος που μεσολάβησε μέχρι το τελικό σημείο ήταν 10 ημέρες. Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν ιστολογικές τομές με ικανοποιητικό τελικό αποτέλεσμα.

Ποιοτική ιστολογική ανάλυση

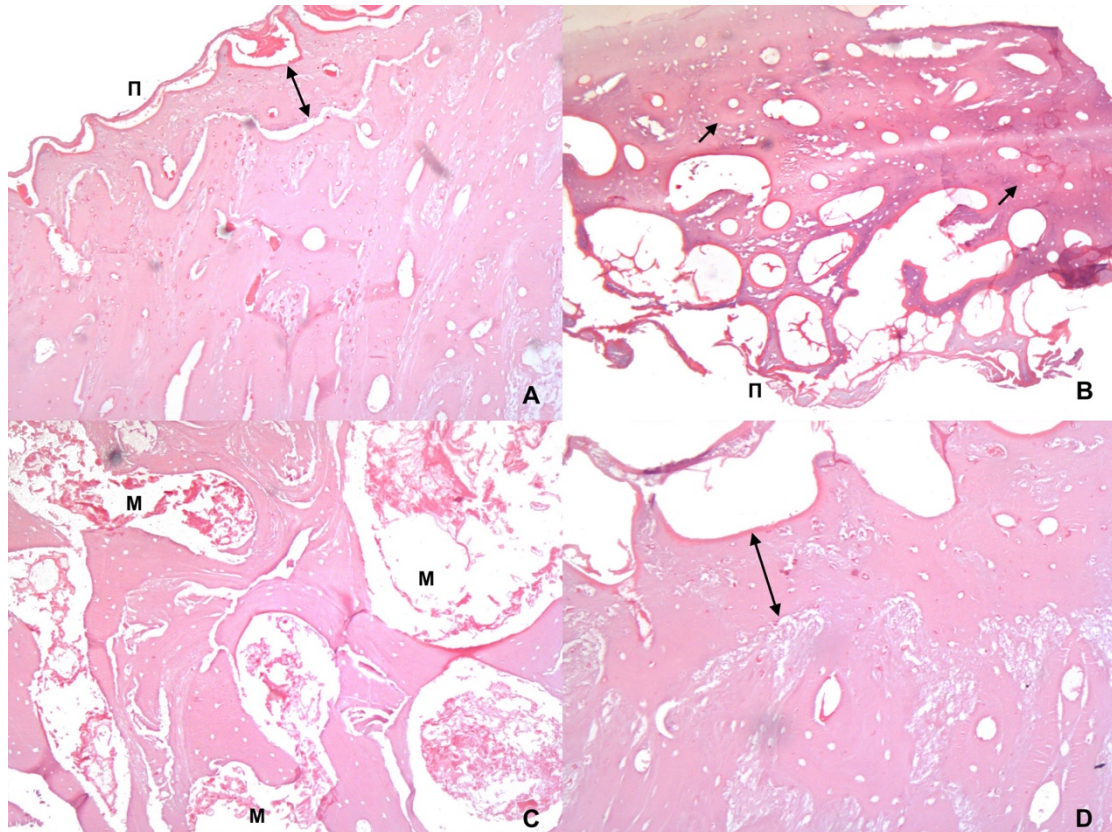
Ο συμπαγής οστίτης ιστός εμφάνιζε χαρακτηριστική στρωματοποίηση στον έξω φλοιό. Έσω του περιόστεου, παρατηρήθηκε μια περιγεγραμμένη περιοχή με χαρακτηριστικά δικτυωτού οστίτη ιστού, με τυχαία διάταξη των κολλαγόνων ινών και οστικά βοθρία με ανώμαλα όρια, καθώς και διάσπαρτους αγγειακούς σωλήνες μικρού μεγέθους. Στα εσωτερικά στρώματα η οργάνωση του ιστού ήταν υψηλότερη. Η πυκνότητα των αγγειακών σωλήνων ήταν υψηλότερη, παρατάσσονταν ακτινωτά, επιμήκως και ακανόνιστα στον ιστό και περιβάλλονταν από νησίδες πεταλιώδους οστίτη ιστού. Το σχήμα τους κυμαινόταν από κυκλικό έως ελλειπτικό και είχαν μικρό έως μεσαίο μέγεθος.

Στον έσω φλοιό του ιστού, καθώς και στα χείλη της πλευράς παρατηρήθηκε δοκιδώδες οστό [20] έσω του περιόστεου. Οι οστεοδοκίδες καταλάμβαναν από το 1/3 (έσω φλοιός) έως το μισό της διαμέτρου του ιστού (χείλη της πλευράς). Σε διαφορετική θέση του έσω φλοιού εντοπίστηκε πεταλιώδης οστίτης ιστός έσω του περιόστεου, ο οποίος διέθετε μικρού μεγέθους δευτερογενείς οστεώνες. Οι οστεώνες παρατάσσονταν σε συστάδες και οι Αβέρσειοι σωλήνες είχαν κυκλικό σχήμα και επιμήκη κατεύθυνση στον ιστό. Οι γραμμές οστεοποίησης των δευτερογενών οστεώνων ήταν ευκρινείς στις περισσότερες περιπτώσεις. Τα εσωτερικά στρώματα αποτελούσαν από πεταλιώδη οστίτη ιστό με διάσπαρτους, μικρού και μεσαίου μεγέθους οστεώνες, ενώ σε αρκετά σημεία παρατηρήθηκε δικτυωτός οστίτης ιστός στα διάμεσα συστήματα. Σε μια περιοχή των εσωτερικών στρωμάτων του ιστού εντοπίστηκε μια συστάδα τεσσάρων πρωτογενών οστεώνων. Ακόμη, υπήρχαν αγγειακοί σωλήνες μεσαίου μεγέθους, στρογγυλού έως ελλειπτικού σχήματος, καθώς και εκείνοι που ακολουθούσαν λοξή πορεία κατά μήκος του ιστού.

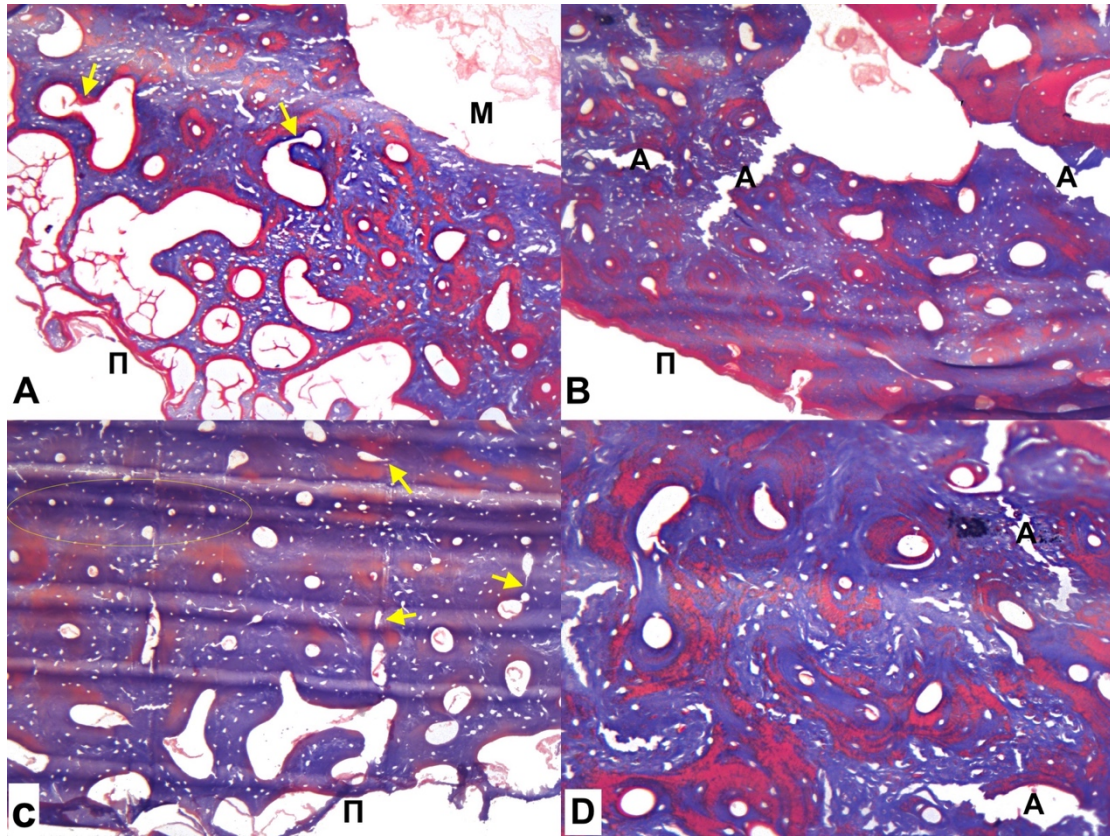
Σε ορισμένες θέσεις των ιστολογικών τομών εντοπίστηκαν παχιές οστεοδοκίδες, οι οποίες εμφανίζονταν ως νησίδες οστίτη ιστού. Ανάμεσα στις νησίδες του ιστού παρεμβάλλονταν οι μυελοχώροι. Στα σημεία αυτά παρατηρήθηκε κυρίως πεταλιώδης

οστίτης ιστός, αλλά και σημεία δικτυωτού οστίτη ιστού. Ο ιστός στερούταν αγγείωσης, ενώ ήταν ευδιάκριτα πολυάριθμα οστικά βοθρία.

Στον οστίτη ιστό των βοοειδών παρατηρήθηκαν σωλήνες του Volkmann, κυρίως στον έσω φλοιό και στα χείλη της πλευράς, καθώς και συστάδες πρωτογενών και δευτερογενών οστεώνων που έφταναν έως τους επτά στη σειρά (Εικόνες 97, 98).



Εικόνα 97. Ιστολογικά παρασκευάσματα οστίτη ιστού πλευρών βοοειδών. A: Έξω φλοιός: Ο συμπαγής οστίτης ιστός εμφανίζει χαρακτηριστική στρωματοποίηση. Έσω του περίστεου παρατηρείται μια περιγεγραμμένη περιοχή με χαρακτηριστικά ινώδους οστίτη ιστού (διπλό βέλος) και διάσπαρτους αγγειακούς σωλήνες μικρού μεγέθους. Στα εσωτερικά στρώματα του ιστού παρατηρείται υψηλότερη οργάνωση του ιστού, πυκνότερη εμφάνιση μικρού και μεσαίου μεγέθους αγγειακών σωλήνων, οι οποίοι παρατάσσονται ακτινωτά, επιμήκως και ακανόνιστα στον ιστό, x50. B: Έσω φλοιός: Παρατηρούνται οστεοδοκίδες έσω του περίστεου, οι οποίες επαλείφονται από το ενδόστεο και καταλαμβάνουν περί το 1/2 του της διαμέτρου του ιστού. Στα εσωτερικά στρώματα παρατηρείται πεταλιώδης οστίτης ιστός με διάσπαρτους, μικρού και μεσαίου μεγέθους οστεώνες (βέλη). Η διάμεση ουσία σε αρκετά σημεία διαθέτει μορφολογία δικτυωτού οστίτη ιστού. Διακρίνονται επίσης τα οστικά βοθρία, x50. C: Εσωτερικά στρώματα του ιστού: Παρατηρούνται παχιές οστεοδοκίδες, οι οποίες εμφανίζονται ως νησίδες οστίτη ιστού που περιβάλλουν τους μυελωχώρους. Ο ιστός στερείται αγγείωσης και διαθέτει πολυάριθμα οστικά βοθρία. Παρατηρείται κυρίως περιμυελικός πεταλιώδης οστίτης ιστός, ενώ σε σημεία υπάρχει εναπόθεση δικτυωτού οστίτη ιστού, x50. D: Υψηλότερη μεγέθυνση έξω φλοιού: Παρατηρείται ο δικτυωτός οστίτης ιστός, έσω του περίστεου με την τυχαία διάταξη των κολλαγόνων ινών και τα οστικά βοθρία μεγάλου μεγέθους και ανώμαλων ορίων (διπλό βέλος). Στο βαθύτερο στρώμα παρατηρούνται αγγειακοί σωλήνες που περιβάλλονται από νησίδες πεταλιώδους οστίτη ιστού, x100. M: μυελωχώροι, Π: περιοχή περίστεου. Χρώση H&E.



Εικόνα 98. Ιστολογικά παρασκευάσματα οστίτη ιστού πλευρών βοοειδών. A: Χείλος της πλευράς: Παρατηρούνται οστεοδοκίδες, έσω του περιόστεου, οι οποίες επαλείφονται από το ενδόστευο και καταλαμβάνουν περί το 1/2 του της διαμέτρου του ιστού. Στα εσωτερικά στρώματα παρατηρείται πεταλιώδης οστίτης ιστός με διάσπαρτους, μικρού και μεσαίου μεγέθους οστεώνες. Ακόμη, παρατηρούνται αγγειακοί σωλήνες οι οποίοι ακολουθούν λοξή πορεία κατά μήκος του ιστού, καθώς και σωλήνες του Volkmann (βέλη), ενώ είναι ευδιάκριτα τα οστικά βοθρία, x50. B: Έσω φλοιός: Παρατηρείται πεταλιώδης οστίτης ιστός με μικρού μεγέθους δευτερογενείς οστεώνες, έσω του περιόστεου, οι οποίοι παρατάσσονται σε σειρά. Σε αυτό το σημείο τα διάμεσα συστήματα έχουν περιορισμένη έκταση. Αντιθέτως, στα εσωτερικά στρώματα του ιστού παρατηρούνται εκτεταμένα διάμεσα συστήματα κα μεσαίου μεγέθους αγγειακοί σωλήνες στρογγυλού έως ελλειπτικού σχήματος, καθώς και εκείνοι με λοξή πορεία, x50. C: Έσω φλοιός: Στο σημείο αυτό το δοκιδώδες οστό καταλαμβάνει περί το 1/3 της διαμέτρου του ιστού, έσω του περιόστεου και το πεταλιώδες καταλαμβάνει τα εσωτερικά στρώματα του ιστού. Παρατηρούνται οστεώνες μικρού έως μεσαίου μεγέθους, καθώς και σωλήνες του Volkmann (βέλη). Εντοπίζεται μια συστάδα τεσσάρων πρωτογενών οστεώνων σε σειρά (έλλειψη), x50. D: Μεγαλύτερη μεγέθυνση περιοχής των εσωτερικών στρωμάτων του ιστού: Παρατηρούνται μικρού και μεσαίου μεγέθους οστεώνες και αγγειακοί σωλήνες οι οποίοι περιβάλλονται από πεταλιώδες οστό. Τα διάμεσα συστήματα αποτελούνται από δικτυωτό οστίτη ιστό στην πλειοψηφία τους, x100. M: μυελόχωρος, Π: περιοχή περιόστεου, A: artifact. Χρώση Masson's trichrome.

5.3. Αιγοπρόβατα

Αξιολόγηση τελικού σημείου αφαλάτωσης

Οι ιστολογικές εικόνες των παρασκευασμάτων που προέκυψαν σε συγκεκριμένους χρόνους έπειτα από την αφαλάτωση των αντίστοιχων ιστοτεμαχίων σε υδατικό διάλυμα νιτρικού οξέος 5% ήταν ικανοποιητικές. Συγκεκριμένα, για τα άτομο OD.1 και OD.2 η διάρκεια της αφαλάτωσης ήταν δύο ημέρες, ενώ για το άτομο OD.3 επτά ημέρες.

Αντιθέτως, η παραμονή του ιστοτεμαχίου OD1 σε πυκνότερο υδατικό διάλυμα νιτρικού οξέος 7% για 15 ημέρες είχε ως αποτέλεσμα την εκτεταμένη καταστροφή και τον κατακερματισμό του ιστού, καθιστώντας τα παρασκευάσματα διαγνωστικά ακατάλληλα.

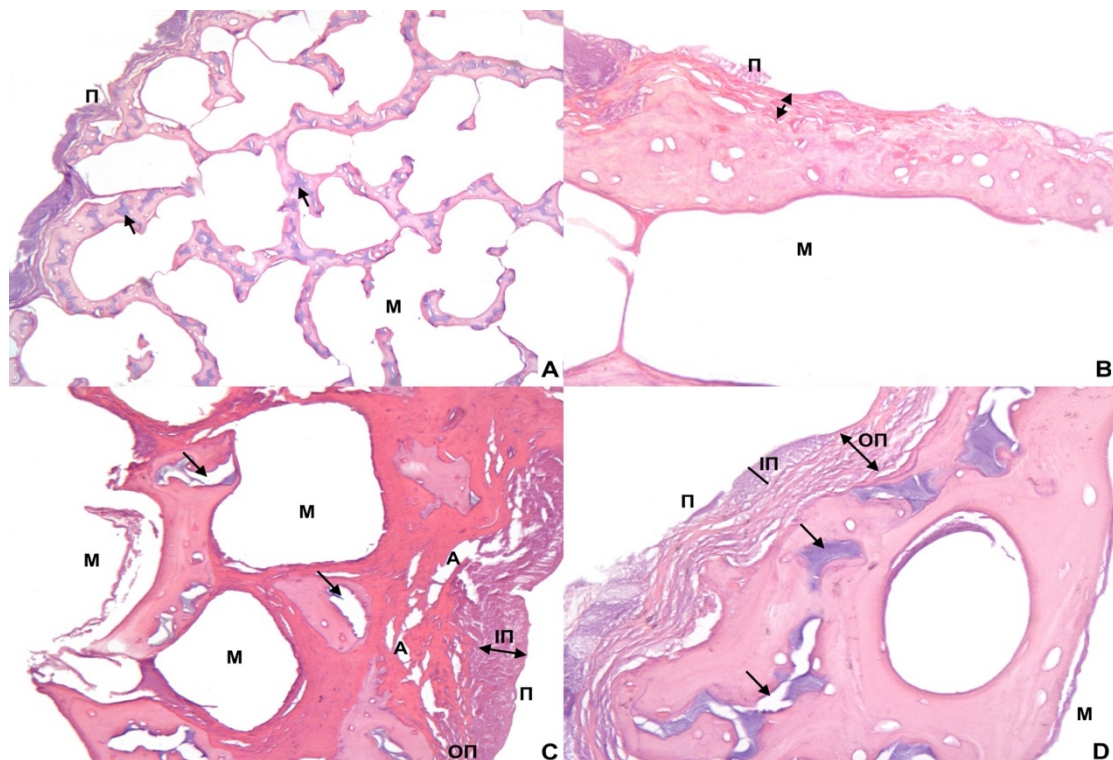
Ποιοτική ιστολογική ανάλυση

Τα ιστολογικά παρασκευάσματα παρουσίασαν παρόμοια εικόνα για τα δύο από τα τρία άτομα που εξετάστηκαν. Συγκεκριμένα, στα άτομα αυτά ο οστίτης ιστός βρισκόταν υπό τη διαδικασία της ενδομεμβρανικής οστέωσης εκ της οστεογόνου στοιβάδας του περιόστεου [20,72,140-142]. Ο επικρατέστερος ιστολογικός τύπος των παρασκευασμάτων ήταν το δοκιδώδες οστό και το ενεργό περίοστεο περιέβαλλε τις οστεοδοκίδες. Οι οστεοδοκίδες αποτελούταν στην πλειοψηφία τους από πεταλιώδη οστίτη ιστό, έφεραν βασίφιλες, οφιοειδείς περιοχές ασβεστοποιημένου χόνδρου [143], ολιγάριθμους αγγειακούς σωλήνες και οστικά βοθρία. Ο έξω φλοιός εμφάνιζε περιοχές συμπαγούς οστίτη ιστού, όπου κυριαρχούσε ο δικτυωτός οστίτης ιστός με τυχαία διάταξη των κολλαγόνων ινών και οστικά βοθρία με ανώμαλα όρια. Σε αυτές τις περιοχές εντοπίστηκαν διάσπαρτοι επιμήκεις αγγειακοί σωλήνες μικρού μεγέθους. Στο χείλος της πλευράς παρατηρήθηκε μια περιοχή με εκτεταμένη εναπόθεση νεοσχηματιζόμενου οστού, η οποία περιέβαλλε τις οστεοδοκίδες. Ο νεοσχηματιζόμενος οστίτης ιστός στερούταν αγγείωσης και δημιουργούσε ευρείς πρωτογενείς μυελοχώρους. Τέλος, η οστεογενής στοιβάδα του ενεργού περιόστεου εμφάνιζε υψηλή οργάνωση των κολλαγόνων ινών (Εικόνα 99).

Η ιστολογική εικόνα της πλευράς του τρίτου ατόμου διέφερε σημαντικά από τις παραπάνω. Σε αυτό το παρασκεύασμα ο πυκνός δευτερογενής οστίτης ιστός ήταν ο επικρατέστερος ιστολογικός τύπος. Συγκεκριμένα, στον έξω φλοιό παρατηρήθηκε η εναπόθεση ενός λεπτού στρώματος περιφερικού συστήματος μη αγγειώδους οστίτη

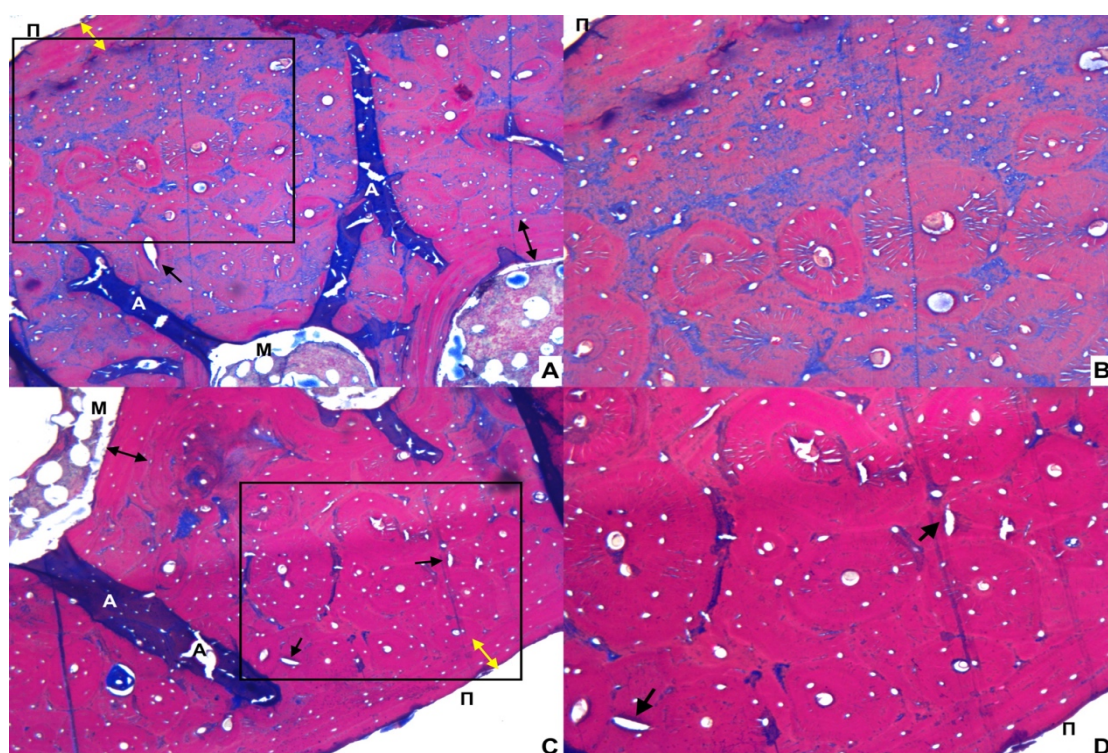
ιστού, έσω του περιόστεου που έφερε οστικά βοθρία. Εσωτερικά των περιφερικών συστημάτων υπήρχε ένα στρώμα πρωτογενών επιμήκων οστεώνων, οι οποίοι ανά περιοχές παρατάσσονταν σε συστάδες. Στα εσωτερικά στρώματα του ιστού υπήρχε πυκνός δευτερογενής οστίτης ιστός με πολυάριθμους, μεσαίου μεγέθους δευτερογενείς οστεώνες, με εμφανείς τις γραμμές οστεοποίησης στην περιφέρειά τους και μεσαίου μεγέθους Αβέρσειους σωλήνες επιμήκους κατεύθυνσης. Ορισμένοι από τους οστεώνες παρατάσσονταν σε συστάδες. Τα διάμεσα συστήματα ήταν περιορισμένης έκτασης και ο ιστός έφερε πολυάριθμα οστικά βοθρία. Ακόμη, εντοπίστηκαν ολιγάριθμοι σωλήνες του Volkmann. Τα περιμυελικά συστήματα αποτελούταν από μη αγγειώδη πεταλιώδη οστίτη ιστό με οστικά βοθρία.

Στον έσω φλοιό του οστού παρατηρήθηκε μη αγγειώδης οστίτης ιστός με οστικά βοθρία έσω του περιόστεου. Στα εσωτερικά στρώματα του ιστού υπήρχε δευτερογενής οστίτης ιστός με μικρού και μεσαίου μεγέθους δευτερογενείς οστεώνες με εμφανείς γραμμές οστεοποίησης και Αβέρσειους σωλήνες μικρού μεγέθους. Στην περιοχή αυτή εντοπίστηκαν οστικά βοθρία, ολιγάριθμοι σωλήνες του Volkmann και περιορισμένης έκτασης διάμεσα συστήματα. Στα περιμυελικά συστήματα παρατηρήθηκε μια περιοχή μη αγγειώδους πεταλιώδους οστίτη ιστού που έφερε ολιγάριθμα οστικά βοθρία (Εικόνα 100).



Εικόνα 99. Ιστολογικά παρασκευάσματα οστίτη ιστού πλευρών αιγοπροβάτων. Α: Έξω φλοιός: Παρατηρείται δοκιδώδες οστό κατά τη διαδικασία της ενδομεμβρανικής οστέωσης εκ της οστεογόνου στοιβάδας του περιόστεου.

Το περίοστεο περιβάλλει τις οστεοδοκίδες, οι οποίες φέρουν βασίφιλες, οφιοειδείς περιοχές ασβεστοποιημένου χόνδρου (βέλη), x50. B: Έξω φλοιός: Μεγεθυμένη περιοχή της συμπαγούς μοίρας του οστού. Είναι εμφανής ο δικτυωτός οστίτης ιστός, με τυχαία διάταξη των κολλαγόνων ινών και διάσπαρτους αγγειακούς σωλήνες μικρού μεγέθους. Ακόμη, παρατηρείται μια περιοχή νεοσχηματιζόμενου οστίτη ιστού (διπλό βέλος), x200, C: Χείλος της πλευράς: Είναι εμφανής η εκτεταμένη εναπόθεση νεοσχηματιζόμενου οστού (έντονο ροζ), περιμετρικά των οστέινων δοκίδων πεταλιώδους οστίτη ιστού (ανοικτό ροζ), οι οποίες φέρουν περιοχές ασβεστοποιημένου χόνδρου (βέλη), x100. D: Μεγεθυμένη οστεοδοκίδα έξω φλοιού: Παρατηρείται η εναπόθεση πεταλιώδους οστίτη ιστού στη συγκεκριμένη περιοχή. Εμφανή είναι: ένας πρωτογενής οστεώνας, ολιγάριθμα οστικά βοθρία και περιοχές ασβεστοποιημένου χόνδρου (βέλη). Η οστεογενής στοιβάδα του ενεργού περιόστεου εμφανίζει υψηλή οργάνωση των κολλαγόνων ινών, x200. M: μυελοχώρος, Π: περιοχή περιόστεου, ΙΠ: ινώδης στοιβάδα του περιόστεου, ΟΠ: οστεογόνος στοιβάδα του περιόστεου, A: artifact. Χρώση H&E.



Εικόνα 100. Ιστολογικά παρασκευάσματα οστίτη ιστού πλευράς αιγοπροβάτου. A: Έξω φλοιός: Παρατηρείται η εναπόθεση περιφερικού συστήματος μη αγγειώδους οστίτη ιστού, έσω του περιόστεου (διπλό κίτρινο βέλος) με οστικά βοθρία. Εσωτερικά των περιφερικών συστημάτων παρατηρείται ένα στρώμα πρωτογενών επιμήκων οστεώνων (5 σε σειρά). Ακολουθεί πυκνός δευτερογενής οστίτης ιστός με πολυάριθμους μεσαίου μεγέθους δευτερογενείς οστεώνες, περιορισμένης έκτασης διάμεσα συστήματα και πολυάριθμα οστικά βοθρία. Ακόμη, εντοπίζεται ένας σωλήνας του Volkmann (βέλος). Στα περιμυελικά συστήματα εντοπίζεται μη αγγειώδης οστίτης ιστός με οστικά βοθρία (διπλό βέλος), x50. B: Μεγέθυνση περιγεγραμμένης περιοχής της εικόνας A: Παρατηρούνται οι συστάδες πρωτογενών (5 σε σειρά) και δευτερογενών οστεώνων (4 σε σειρά), με εμφανείς τις γραμμές οστεοποίησης, x100. C: Έσω φλοιός: Έσω του περιόστεου παρατηρείται μη αγγειώδης οστίτης ιστός με οστικά βοθρία (διπλό κίτρινο βέλος). Ακολουθεί πυκνός δευτερογενής οστίτης ιστός με μικρού και μεσαίου μεγέθους δευτερογενείς οστεώνες και περιορισμένης έκτασης διάμεσα συστήματα. Εντοπίζονται δύο κανάλια του Volkmann (βέλη). Στα περιμυελικά συστήματα παρατηρείται μια περιοχή μη αγγειώδους οστίτη ιστού (διπλό βέλος), x50. D: Μεγέθυνση περιγεγραμμένης περιοχής της εικόνας C: Παρατηρούνται οι δευτερογενείς οστεώνες με τις γραμμές οστεοποίησης, τα οστικά βοθρία και τα περιορισμένα διάμεσα συστήματα. Ακόμη, διακρίνονται οι

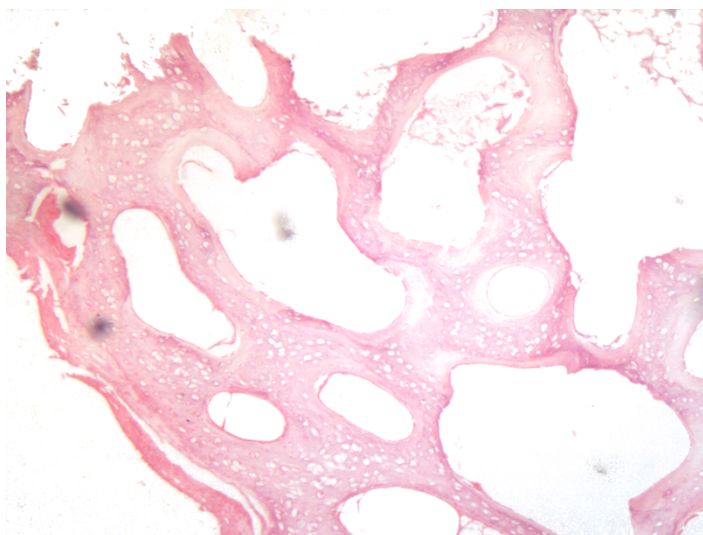
σωλήνες του Volkmann (βέλη), x100. Μ: μυελός των οστών, Π: περιοχή περιόστεου, Α: artifact. Χρώση Masson's trichrome.

5.4. Χοίρος

Αξιολόγηση τελικού σημείου αφαλάτωσης

Αρκετές από τις ιστολογικές εικόνες των παρασκευασμάτων που προέκυψαν έπειτα από την αφαλάτωση των αντίστοιχων ιστοτεμαχίων σε υδατικό διάλυμα νιτρικού οξέος 5% για 14 ημέρες ήταν ικανοποιητικές.

Αντιθέτως, η παραμονή του ιστοτεμαχίου SCI σε πυκνότερο υδατικό διάλυμα νιτρικού οξέος 7% για 7 ημέρες είχε ως αποτέλεσμα τον ανά σημεία κατακερματισμό του ιστού, τη δημιουργία κενοτοπιόδων περιοχών με ανώμαλα όρια και τη μη ικανοποιητική εφαρμογή της χρώσης αιματοξυλίνης/ηωσίνης, καθιστώντας τα παρασκευάσματα μη αποδεκτά (Εικόνα 101).



Εικόνα 101. Ιστολογικό παρασκεύασμα οστίτη ιστού πλευράς χοίρου, έπειτα από αφαλάτωση του ιστοτεμαχίου με χρήση διαλύματος νιτρικού οξέος 7%, διάρκειας 7 ημερών. Παρατηρείται η καταστροφή του ιστού επάνω αριστερά, οι κενοτοπιώδεις περιοχές με ανώμαλα όρια, καθώς και μη ικανοποιητική εφαρμογή της χρώσης. x50, χρώση H&E.

Ποιοτική ιστολογική ανάλυση

Τα ιστολογικά παρασκευάσματα που αφορούσαν οστίτη ιστό πλευρών χοίρων παρουσίασαν παρόμοια ιστολογική εικόνα. Συγκεκριμένα, στον έξω φλοιό καθώς και στη σπογγώδη μοίρα παρατηρήθηκε πεταλιώδης οστίτης ιστός, στερούμενος αγγείωσης με πολυάριθμα οστικά βοθρία. Η εξωτερική επιφάνεια της συμπαγούς

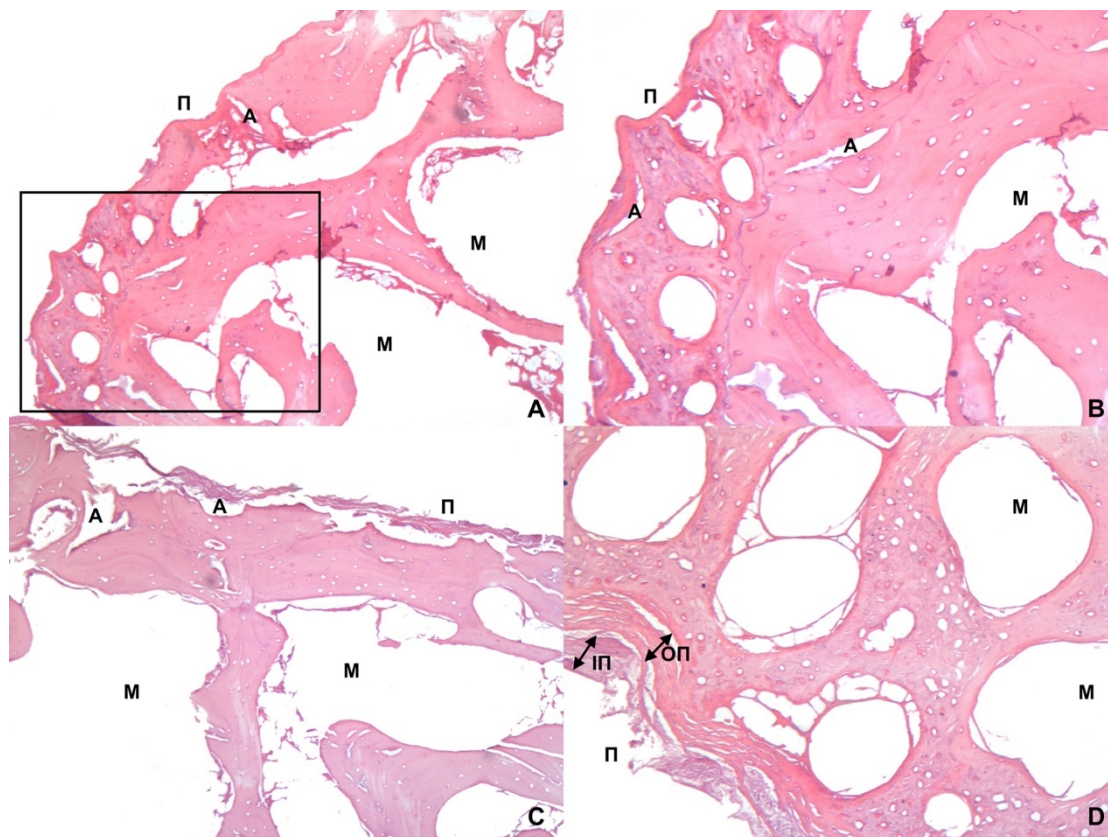
μοίρας του οστού, έσω του περιόστεου εμφάνιζε ανώμαλα χείλη. Προσεγγίζοντας τον ιστό από τον έξω φλοιό προς τα χείλη της πλευράς παρατηρήθηκαν κυκλικοί, ευμεγέθεις αγγειακοί σωλήνες, επιμήκους κατεύθυνσης, έσω του περιόστεου. Ο ιστός της περιοχής έφερε χαρακτηριστικά δικτυωτού οστίτη ιστού με τυχαία διάταξη των κολλαγόνων ινών και ευμεγέθη οστικά βοθρία με ανώμαλα όρια και αφοριζόταν από τα εσωτερικά στρώματα του ιστού με μία βασίφιλη γραμμή μεταστροφής. Στα εσωτερικά στρώματα, καθώς και στις παχιές οστεοδοκίδες εντοπίστηκε μη αγγειώδης πεταλιώδης οστίτης ιστός με οστικά βοθρία, τα οποία ακολουθούσαν την κατεύθυνση των κολλαγόνων ινών. Η εξωτερική επιφάνεια του συμπαγούς οστίτη ιστού της περιοχής εμφάνιζε κυματοειδή μορφολογία.

Ο έσω φλοιός χαρακτηριζόταν από την παρουσία δοκιδώδους οστίτη ιστού με ακανόνιστου σχήματος μυελοχώρους έσω του περιόστεου. Στα εσωτερικά στρώματα εντοπίστηκε συμπαγής οστίτης ιστός με ευμεγέθεις αγγειακούς σωλήνες επιμήκους κατεύθυνσης και εκτεταμένα διάμεσα συστήματα.

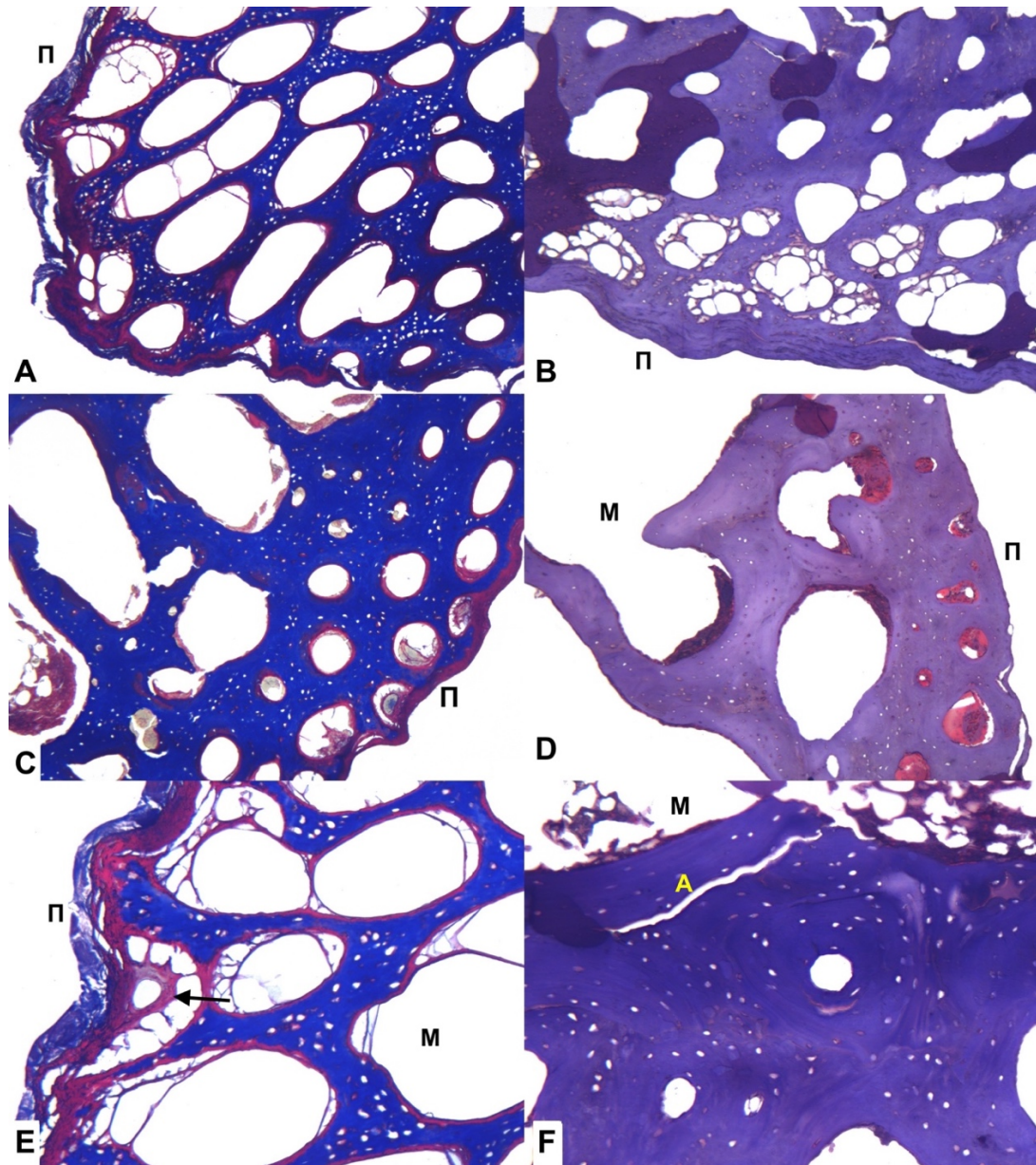
Στο οπίσθιο χείλος των πλευρών εντοπίστηκε δοκιδώδης οστίτης ιστός με μεγάλο μεγέθους πρωτογενείς μυελοχώρους, οι οποίοι εμφάνιζαν ωοειδές ή/και ακανόνιστο σχήμα και ακτινική κατεύθυνση στον ιστό. Περιμετρικά των μυελοχώρων παρατηρήθηκε δικτυωτός οστίτης ιστός με πολυάριθμα, ευμεγέθη οστικά βοθρία. Η συγκεκριμένη περιοχή του οστού βρισκόταν υπό τη διαδικασία της ενδομεμβρανικής οστέωσης και η ενεργός οστεογόνος στοιβάδα του περιόστεου εμφάνιζε υψηλή οργάνωση των κολλαγόνων ινών. Η εξωτερική επιφάνεια του ιστού εμφάνιζε κυματοειδή μορφολογία.

Το πρόσθιο χείλος των πλευρών εμφάνισε μικρές διαφορές ανάμεσα στα άτομα: Σε ένα παρασκεύασμα εντοπίστηκε συμπαγής οστίτης ιστός με ευμεγέθεις, κυκλικού έως ελλειπτικού σχήματος και επιμήκους κατεύθυνσης αγγειακούς σωλήνες, καθώς και πολυάριθμα οστικά βοθρία. Στα εσωτερικά στρώματα του ιστού, έξω των περιμυελικών συστημάτων εντοπίστηκαν πρωτογενείς οστεώνες μικρού μεγέθους. Στη συμπαγή μοίρα του πρόσθιου χείλους της πλευράς διαφορετικού ατόμου εντοπίστηκε μία σειρά πρωτογενών οστεώνων μικρού έως μεγάλου μεγέθους. Οι αγγειακοί σωλήνες διέθεταν κυκλικό και ελλειψοειδές σχήμα και επιμήκη κατεύθυνση. Η μονή σειρά αυτών των οστεώνων επεκτεινόταν σαν αλυσίδα από το πρόσθιο χείλος της πλευράς ως τον έσω φλοιό. Στα εσωτερικά στρώματα της περιοχής παρατηρήθηκε η εναπόθεση δικτυωτού οστίτη ιστού και εντοπίστηκαν ολιγάριθμοι μικρού μεγέθους δευτερογενείς οστεώνες

με μικρού μεγέθους Αβέρσειους σωλήνες επιμήκους κατεύθυνσης. Οι μυελοχώροι που παρατηρήθηκαν περιβάλλονταν από πεταλιώδη οστίτη ιστό (Εικόνες 102, 103).



Εικόνα 102. Ιστολογικά παρασκευάσματα οστίτη ιστού πλευρών χοίρων. Α: Έξω φλοιός: Παρατηρείται μια εκτεταμένη περιοχή μη αγγειώδους, πεταλιώδους συμπαγούς οστίτη ιστού με πολυάριθμα οστικά βοθρία, άνω δεξιά. Στην κάτω αριστερά περιοχή, προς το χείλος της πλευράς, έσω του περίστεου παρατηρούνται ευμεγέθεις αγγειακοί σωλήνες, επιμήκους κατεύθυνσης σε έδαφος δικτυωτού οστίτη ιστού. Η εξωτερική επιφάνεια του συμπαγούς οστίτη ιστού εμφανίζει κυματοειδή μορφολογία. Ακόμη, εντοπίζονται παχιές οστεοδοκίδες πεταλιώδους οστίτη ιστού που στερείται αγγείωσης και φέρει πολυάριθμα οστικά βοθρία, x50. Β: Μεγέθυνση περιγεγραμμένης περιοχής της εικόνας Α: Παρατηρείται η εναπόθεση δικτυωτού οστίτη ιστού με τυχαία διάταξη των κολλαγόνων ινών και ευμεγέθη οστικά βοθρία με ανώμαλα όρια. Η περιοχή αφορίζεται από τη βασίφιλη γραμμή μεταστροφής. Στα εσωτερικά στρώματα εντοπίζεται μη αγγειώδης πεταλιώδης οστίτης ιστός με οστικά βοθρία που ακολουθούν την κατεύθυνση των κολλαγόνων ινών, x100. Γ: Έξω φλοιός: Στη συμπαγή, καθώς και στη σπογγώδη μοίρα του οστού εντοπίζεται μη αγγειώδης πεταλιώδης οστίτης ιστός με οστικά βοθρία. Η εξωτερική επιφάνεια του συμπαγούς οστίτη ιστού εμφανίζει ανώμαλα χείλη. Διασώζεται τμήμα του περίστεου που έχει αποκολληθεί τεχνητά από το οστό, x50. Δ: Οπίσθιο χείλος της πλευράς, μεγεθυμένη περιοχή: Παρατηρείται δοκιδώδης οστίτης ιστός υπό τη διαδικασία της ενδομεμβρανικής οστέωσης εκ του περίστεου. Είναι εμφανής η εναπόθεση δικτυωτού οστίτη ιστού περιμετρικά των πρωτογενών μυελοχώρων, καθώς και η οστεογόνος στοιβάδα του ενεργού περίστεου που εμφανίζει υψηλή οργάνωση των κολλαγόνων ινών, x100. Μ: μυελοχώροι, Π: περιοχή περίστεου, ΙΙΙ: ινώδης στοιβάδα του περίστεου, ΟΠ: οστεογόνος στοιβάδα του περίστεου, Α: artifact. Χρώση Η&Ε.



Εικόνα 103. Ιστολογικά παρασκευάσματα οστίτη ιστού πλευρών χοίρων. A: Οπίσθιο χείλος της πλευράς: Παρατηρείται δοκιδώδης οστίτης ιστός με πολυάριθμα ευμεγέθη οστικά βοθρία. Οι μεγάλοι μεγέθους μυελοχώροι εμφανίζουν ωοειδές σχήμα με ακτινική κατεύθυνση. Η ενεργή οστεογόνος στοιβάδα του περιόστεου εμφανίζεται κόκκινη και η εξωτερική επιφάνεια του ιστού διαθέτει κυματοειδή μορφολογία, x50. B: Έσω φλοιός: Παρατηρείται δοκιδώδης οστίτης ιστός έσω του περιόστεου με ακανόνιστου σχήματος μυελοχώρους, υπό τη διαδικασία της ενδομεμβρανικής οστέωσης. Στα εσωτερικά στρώματα εντοπίζεται συμπαγής οστίτης ιστός με ευμεγέθεις αγγειακούς σωλήνες και εκτεταμένα διάμεσα συστήματα, x50. C: Πρόσθιο χείλος της πλευράς: Παρατηρείται συμπαγής οστίτης ιστός με ευμεγέθεις αγγειακούς σωλήνες, κυκλικού έως ελλειπτικού σχήματος και επιμήκους κατεύθυνσης, καθώς και πολυάριθμα οστικά βοθρία. Στα εσωτερικά στρώματα του ιστού, έξω των περιμυελικών συστημάτων διακρίνονται οστεώνες μικρού μεγέθους, x50. D: Πρόσθιο χείλος της πλευράς: Εντοπίζεται μία σειρά κυκλικών και ελλειψοειδών οστεώνων επιμήκους κατεύθυνσης στη συμπαγή μοίρα του ιστού. Το μέγεθός τους ποικίλει από μικρό έως μεγάλο. Στα εσωτερικά στρώματα παρατηρείται η εναπόθεση δικτυωτού οστίτη ιστού και εντοπίζονται δύο μικρού μεγέθους οστεώνες. Παρατηρούνται ακόμη οι μυελοχώροι οι οποίοι περιβάλλονται από πεταλώδη οστίτη ιστό, x50. E: Οπίσθιο χείλος της πλευράς: Παρατηρείται δοκιδώδης οστίτης ιστός υπό τη διαδικασία της ενδομεμβρανικής οστέωσης. Εντοπίζεται η εναπόθεση νεοσχηματιζόμενου οστίτη ιστού εκ του

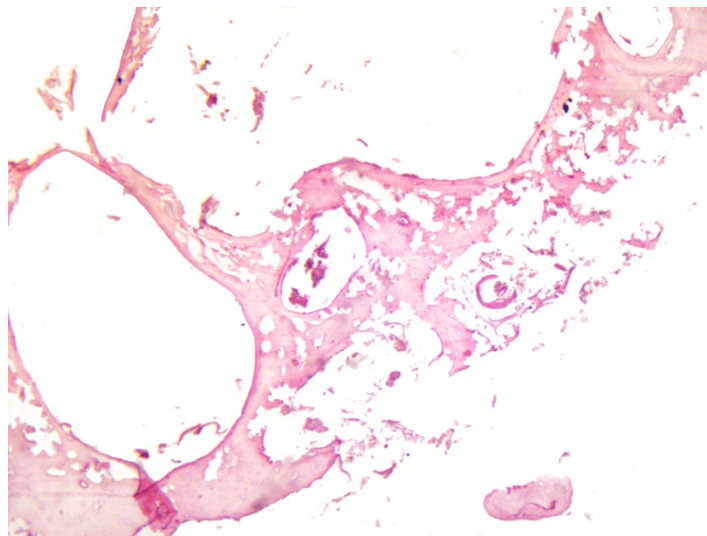
περίστεου, περιμετρικά ενός πρωτογενούς οστεάνα, εντός ενός πρωτογενούς μυελοχώρου (βέλος), x00. F: Εσωτερικά στρώματα του ιστού: Εντοπίζονται δύο δευτερογενείς οστεόνες σε έδαφος πεταλιώδους οστίτη ιστού. Είναι ευδιάκριτος ο περιμυελικός πεταλιώδης οστίτης ιστός, τα διάμεσα συστήματα, καθώς και τα οστικά βοθρία, x100. M: μυελοχώρος, Π: περιοχή περίστεου, A: artifact. Χρώση Masson's trichrome.

5.5. Σκύλος

Αξιολόγηση τελικού σημείου αφαλάτωσης

Οι ιστολογικές εικόνες των παρασκευασμάτων που προέκυψαν σε συγκεκριμένους χρόνους έπειτα από την αφαλάτωση των αντίστοιχων ιστοτεμαχίων σε υδατικό διάλυμα νιτρικού οξέος 5% ήταν ικανοποιητικές. Συγκεκριμένα, για το άτομο CA.1 η διάρκεια της αφαλάτωσης ήταν τρεις ημέρες, για το άτομο CA.2 δύο ημέρες και για το άτομο CA.3 δύο ημέρες.

Αντιθέτως, η 24ωρη παραμονή του ιστοτεμαχίου CAI σε πυκνότερο υδατικό διάλυμα νιτρικού οξέος 7% είχε ως αποτέλεσμα την εκτεταμένη καταστροφή του ιστού, καθιστώντας τα παρασκευάσματα διαγνωστικά ακατάλληλα (Εικόνα 104)



Εικόνα 104. Ιστολογικό παρασκεύασμα οστίτη ιστού πλευράς σκύλου, έπειτα από 24ωρη αφαλάτωση του ιστοτεμαχίου με χρήση διαλύματος νιτρικού οξέος 7%. Παρατηρείται η εκτεταμένη καταστροφή του ιστού. x50, χρώση H&E.

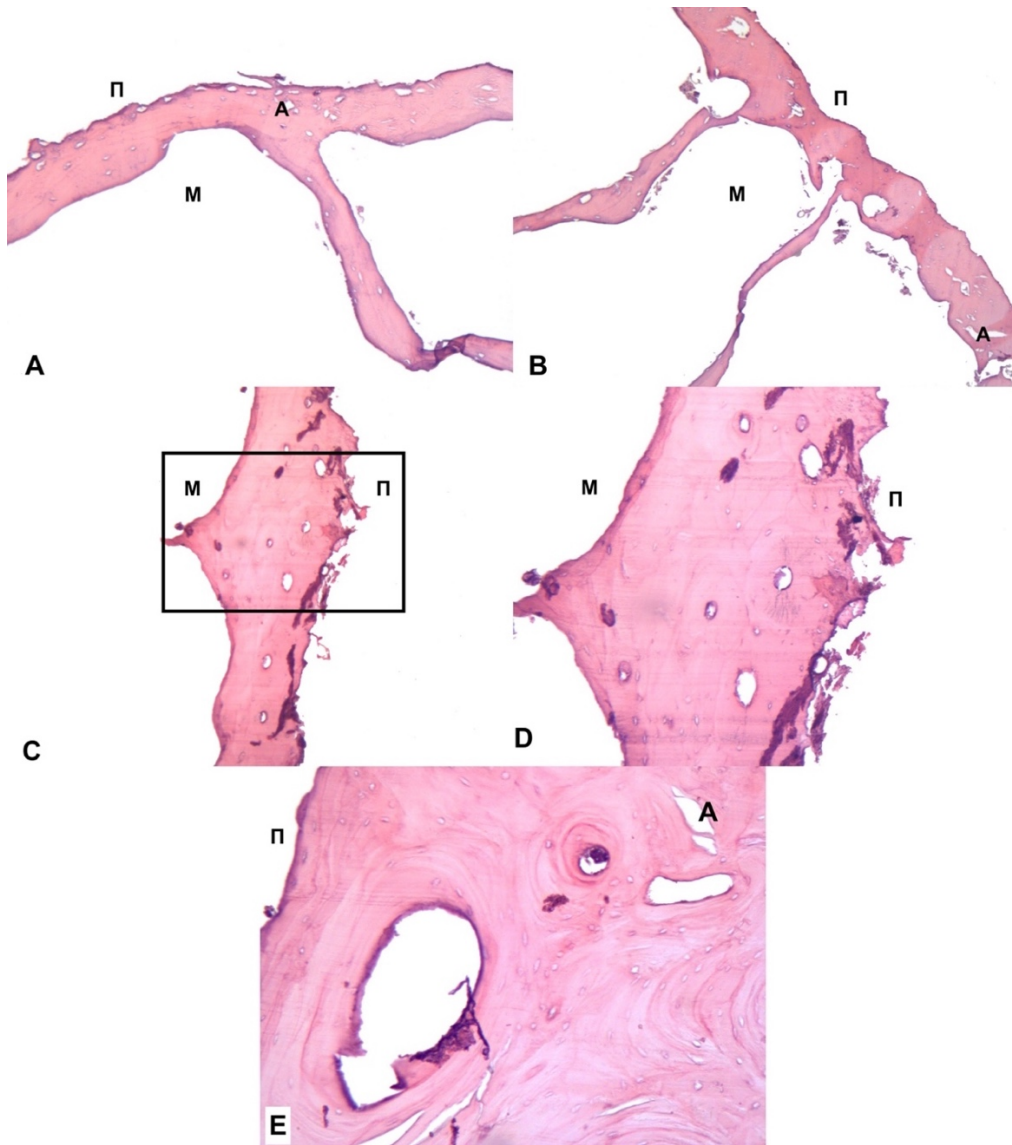
Ποιοτική ιστολογική ανάλυση

Ο οστίτης ιστός που παρατηρήθηκε στα ιστολογικά παρασκευάσματα πλευρών σκύλων παρουσίαζε παρόμοια ιστολογική εικόνα και στα τρία άτομα που εξετάστηκαν. Συγκεκριμένα, στον έξω φλοιό παρατηρήθηκε πεταλιώδης οστίτης ιστός ο οποίος

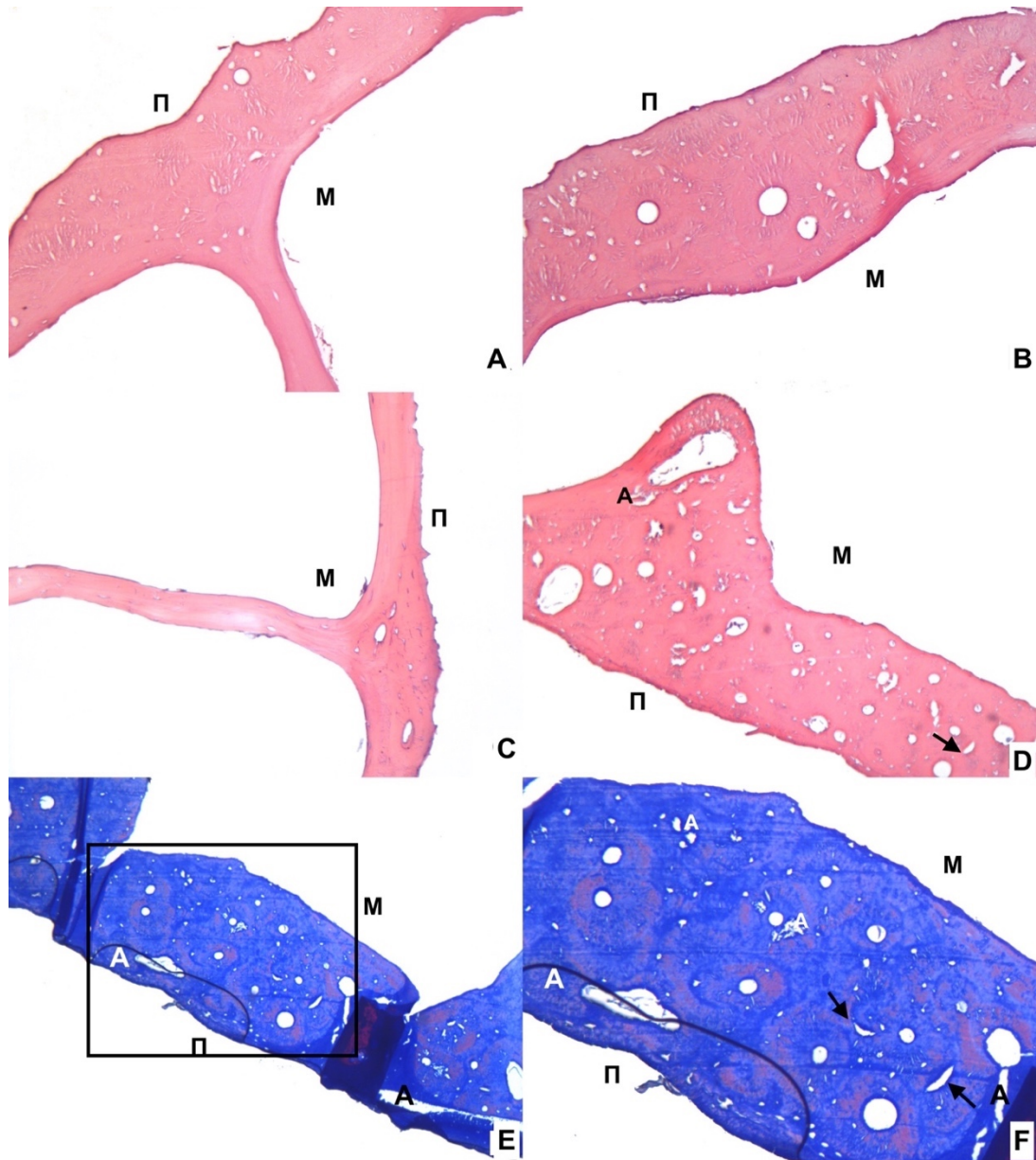
στερούταν αγγείωσης στη μεγαλύτερη έκτασή του. Σε ορισμένες θέσεις εντοπίστηκαν μεμονωμένοι κυκλικοί οστεώνες μικρού μεγέθους έσω του περιόστεου, ενώ σε αντίστοιχη θέση πλευράς άλλου ατόμου υπήρχαν διάσπαρτοι δευτερογενείς οστεώνες, με Αβέρσειους σωλήνες μικρού ως μεγάλου μεγέθους και επιμήκους κατεύθυνσης, καθώς και εκτεταμένα διάμεσα συστήματα. Σε ακόμη μία περιοχή μη αγγειώδους ιστού παρεμβάλλονταν ολιγάριθμοι ευμεγέθεις, επιμήκεις αγγειακοί σωλήνες. Σε όλη την επιφάνεια του ιστού εντοπίστηκαν οστικά βοθρία, ενώ παρατηρήθηκε και ένας σωλήνας του Volkman. Τα εξωτερικά όρια του συμπαγούς οστίτη ιστού εμφάνιζαν ανά περιοχές κυματοειδή μορφολογία. Τέλος, παρατηρήθηκαν περιοχές της συμπαγούς μοίρας οι οποίες εμφάνιζαν δαντελωτά εξωτερικά όρια με κενотоπιώδεις περιοχές, καθώς και ακτινωτές κενотоπιώδεις περιοχές στα εσωτερικά στρώματα ως αποτέλεσμα ιστικής φθοράς.

Στον έσω φλοιό παρατηρήθηκε δευτερογενής οστίτης ιστός ο οποίος διέθετε διάσπαρτους οστεώνες μικρού έως μεσαίου μεγέθους με Αβέρσειους σωλήνες επιμήκους κατεύθυνσης και εκτεταμένα διάμεσα συστήματα. Οι γραμμές οστεοποίησης δεν διακρίνονταν ευκρινώς με τη χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης, ενώ ήταν ευδιάκριτες με την τρίχρωμη χρώση Masson. Επιπλέον, σε ορισμένα σημεία του ιστού εντοπίστηκαν ολιγάριθμοι ευμεγέθεις αγγειακοί σωλήνες καθώς και σωλήνες του Volkman. Στα περιφερικά συστήματα παρατηρήθηκαν λεπτά στρώματα μη αγγειώδους οστίτη ιστού. Ο ιστός διέθετε οστικά βοθρία σε όλη του την έκταση.

Στην περιοχή του χείλους των πλευρών παρατηρήθηκε πεταλιώδης οστίτης ιστός. Το ιστολογικό παρασκεύασμα ενός ατόμου διέθετε μία σειρά από μεσαίου μεγέθους δευτερογενείς οστεώνες, με Αβέρσειους σωλήνες επιμήκους κατεύθυνσης, στα εξωτερικά στρώματα της συμπαγούς μοίρας, έσω του περιόστεου. Στα μεσαία στρώματα ο ιστός εμφάνιζε ολιγάριθμους, διάσπαρτους, μικρού μεγέθους οστεώνες με εκτεταμένα διάμεσα συστήματα. Η γραμμή οστεοποίησης στην περιφέρεια των δευτερογενών οστεώνων ήταν ευδιάκριτη στις περισσότερες περιπτώσεις. Περιμυελικά εντοπίστηκε κυρίως πεταλιώδης οστίτης ιστός, ο οποίος στερούταν αγγείωσης. Στο ιστολογικό παρασκεύασμα διαφορετικού ατόμου εντοπίστηκε μια περιοχή πεταλιώδους οστίτη ιστού με διάσπαρτους, μικρού μεγέθους αγγειακούς σωλήνες, ελλειπτικού σχήματος. Εκατέρωθεν της περιοχής παρατηρήθηκε μη αγγειώδης πεταλιώδης οστίτης ιστός. Όλη η έκταση του ιστού διέθετε οστικά βοθρία. Τέλος, το συμπαγές οστό παρουσίασε μια ιστική περιοχή που προέβαλε ως ακρολοφία στο μυελοχώρο (Εικόνες 105, 106).



Εικόνα 105. Ιστολογικά παρασκευάσματα οστίτη ιστού πλευρών σκύλων. Α: Έξω φλοιός: Παρατηρείται μη αγγειώδης πεταλιώδης οστίτης ιστός στη συμπαγή μοίρα του ιστού και στην οστεοδοκίδα. Εντοπίζονται ολιγάριθμα οστικά βοθρία. Ο ιστός έσω του περιόστεου εμφανίζει δαντελωτά όρια και κενοτοπιώδεις περιοχές ως αποτέλεσμα ιστικής φθοράς, x100. Β: Έξω φλοιός: Παρατηρούνται περιοχές μη αγγειώδους πεταλιώδους οστίτη ιστού στις οποίες παρεμβάλλονται ολιγάριθμοι ευμεγείς, επιμήκεις αγγειακοί σωλήνες. Εντοπίζονται οστικά βοθρία. Ο ιστός διαθέτει εξωτερικά όρια κυματοειδούς μορφολογίας και λεπτές οστεοδοκίδες, x50. C: Χείλος της πλευράς: Παρατηρείται μία σειρά από μεσαίου μεγέθους δευτερογενείς οστεώνες, στα εξωτερικά στρώματα της συμπαγούς μοίρας, έσω του περιόστεου. Στα μεσαία στρώματα ο ιστός εμφανίζει ολιγάριθμους, διάσπαρτους, μικρού μεγέθους οστεώνες και εκτεταμένα διάμεσα συστήματα. Περιμελικά εντοπίζεται κυρίως πεταλιώδης οστίτης ιστός, ο οποίος στερείται αγγείωσης, x50. D: Μεγέθυνση περιγεγραμμένης περιοχής της εικόνας C: Παρατηρούνται οι δευτερογενείς οστεώνες οι περισσότεροι από τους οποίους διαθέτουν εμφανή γραμμή οστεοποίησης στην περιφέρειά τους. Εμφανή είναι τα οστικά βοθρία, καθώς και τα εκτεταμένα διάμεσα συστήματα. Τα όρια του ιστού εμφανίζονται ανόμαλα εξαιτίας της ιστικής φθοράς, x100. E: Μεγεθυμένη περιοχή έξω φλοιού: Απεικονίζεται ένας αγγειακός σωλήνας λοξής κατεύθυνσης, ένας μικρού μεγέθους, επιμήκης οστεώνας και ένας σωλήνας του Volkmann σε έδαφος πεταλιώδους οστίτη ιστού, x100. Μ: μυελόχωρος, Π: περιοχή περιόστεου, Α: artifact. Χρώση H&E.



Εικόνα 106. Ιστολογικά παρασκευάσματα οστίτη ιστού πλευρών σκύλων. Α: Έξω φλοιός: Στη συμπαγή μοίρα, καθώς και στην οστέινη δοκίδα παρατηρείται πεταλιώδης οστίτης ιστός που στερείται αγγείωσης, με ευμεγέθη οστικά βοθρία. Εντοπίζεται ένας κυκλικός οστεώνας μικρού μεγέθους, στα εξωτερικά στρώματα του ιστού. Ο ιστός εμφανίζει ακτινωτές κενοτοπιώδεις περιοχές ως αποτέλεσμα ιστικής φθοράς, x100. Β: Μεγεθυμένη περιοχή έξω φλοιού: Παρατηρείται πεταλιώδης οστίτης ιστός με διάσπαρτους δευτερογενείς οστεώνες μεσαίου μεγέθους και επιμήκους κατεύθυνσης, καθώς και οστικά βοθρία. Ακόμη, παρατηρούνται ακτινωτές κενοτοπιώδεις περιοχές ως αποτέλεσμα ιστικής φθοράς, x100. Γ: Χείλος της πλευράς: Στη συμπαγή μοίρα του ιστού εντοπίζεται μία περιοχή πεταλιώδους οστίτη ιστού με διάσπαρτους, μικρού μεγέθους αγγειακούς σωλήνες, ελλειπτικού σχήματος. Εκατέρωθεν της περιοχής, καθώς και στη λεπτή οστέινη δοκίδα παρατηρείται μη αγγειώδης πεταλιώδης οστίτης ιστός, x100. Δ: Έσω φλοιός Ο συμπαγής οστίτης ιστός διαθέτει διάσπαρτους οστεώνες μικρού έως μεσαίου μεγέθους και Αβέρσειους σωλήνες μικρού ως μεγάλου μεγέθους και επιμήκους κατεύθυνσης. Οι γραμμές οστεοποίησης δεν διακρίνονται ευκρινώς. Επιπλέον, εντοπίζονται δύο ευμεγέθεις αγγειακοί σωλήνες. Στον ιστό παρατηρούνται οστικά βοθρία, ένας σωλήνας του Volkmann (βέλος) και κενοτοπιώδεις περιοχές με ανώμαλα όρια ως αποτέλεσμα τεχνουργήματος (artifact). Ακόμη εντοπίζεται μια περιοχή η οποία προβάλλει ως ακρολοφία στο μυελόχορδο, x50. Ε: Έσω φλοιός: Στα μεσαία στρώματα της συμπαγούς μοίρας του ιστού παρατηρούνται μικρού

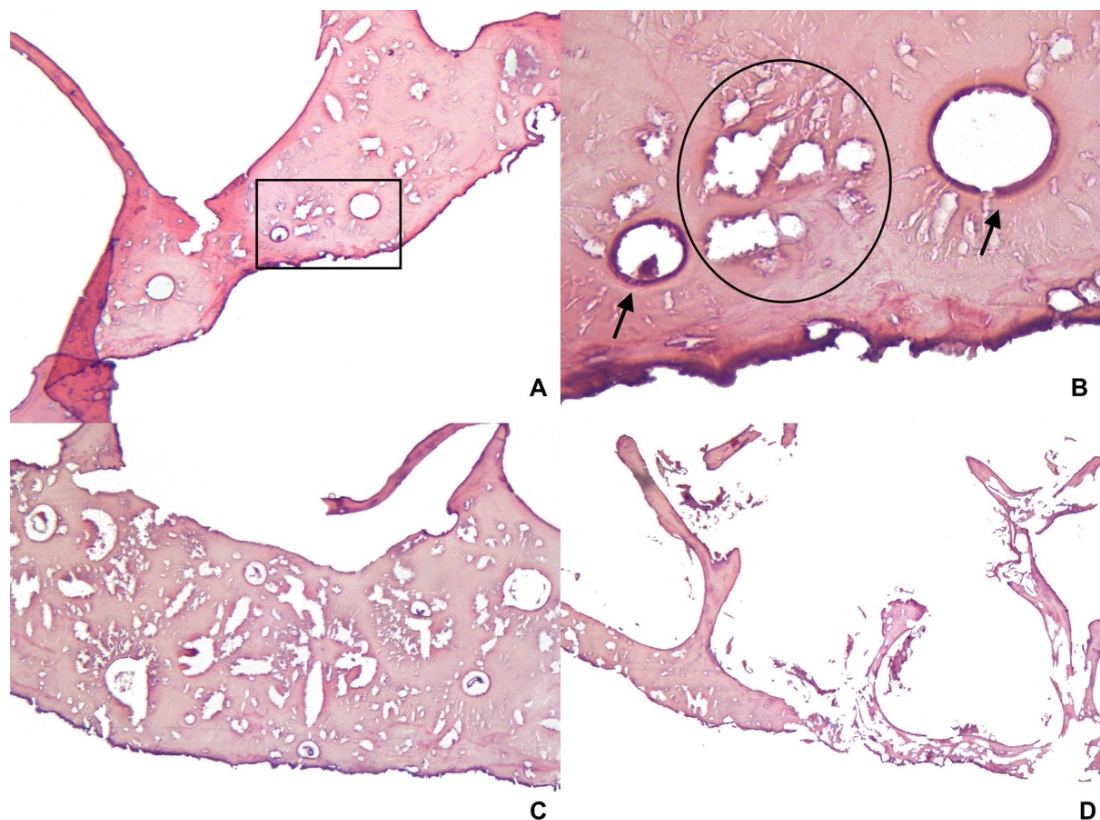
και μεσαίου μεγέθους δευτερογενείς οστεάνες που φέρονται επιμήκως στον ιστό, καθώς και εκτεταμένα διάμεσα συστήματα. Στο περιφερικό σύστημα παρατηρείται ένα λεπτό στρώμα μη αγγειώδους οστίτη ιστού, x50. F: Μεγέθυνση περιγεγραμμένης περιοχής της εικόνας E: Παρατηρούνται μικρού και μεσαίου μεγέθους οστεάνες με εμφανείς τις γραμμές οστεοποίησης στην περιφέρειά τους. Στον ιστό εντοπίζονται οστικά βοθρία και δύο σωλήνες του Volkmann (βέλη), x100. M: μυελοχώρος, Π: περιοχή περιόστεου, A: artifact. Χρώση H&E (A, B, C, D). Χρώση Masson's trichrome (E, F).

5.6. Γάτα

Αξιολόγηση τελικού σημείου αφαλάτωσης

Οι ιστολογικές εικόνες των παρασκευασμάτων FB.0, FB.1 και FB.3 που προέκυψαν έπειτα από την αφαλάτωση των αντίστοιχων ιστοτεμαχίων σε υδατικό διάλυμα νιτρικού οξέος 5%, χρονικής διάρκειας 2 ημερών ήταν ικανοποιητικές. Αντιθέτως, το ιστολογικό παρασκεύασμα του ατόμου FB.2 παρουσίασε σημεία παρατεταμένης αφαλάτωσης υπό τη μορφή ακανόνιστου σχήματος κενοτοπίων με δαντελωτά όρια.

Εκτεταμένη ήταν η καταστροφή του ιστού έπειτα από την 24ωρη παραμονή του ιστοτεμαχίου FBI σε πυκνότερο υδατικό διάλυμα νιτρικού οξέος 7% καθιστώντας τα παρασκευάσματα διαγνωστικά ακατάλληλα (Εικόνα 107).



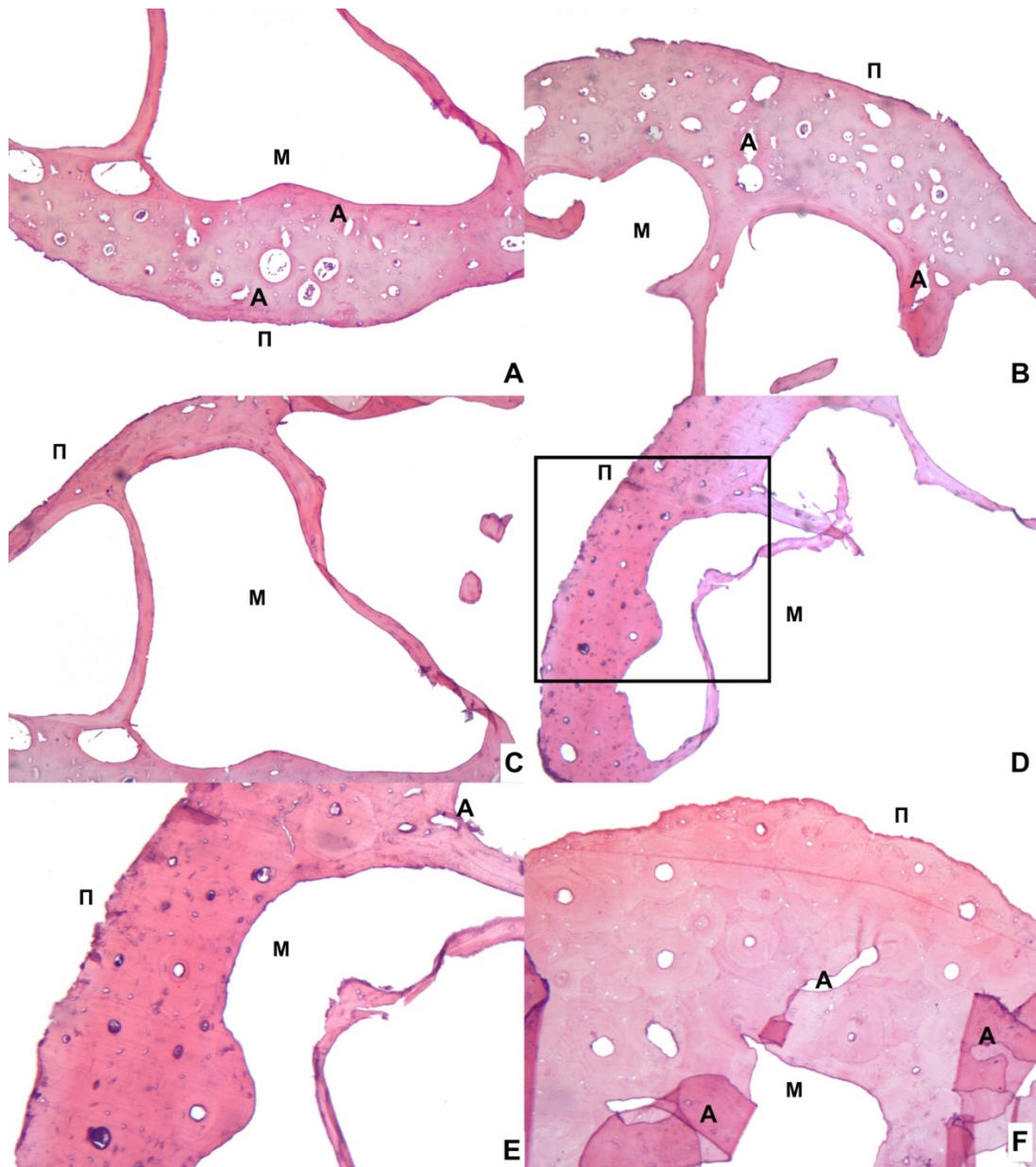
Εικόνα 107. Ιστολογικά παρασκευάσματα οστίτη ιστού πλευράς γάτας. A, B, C: Άτομο FB.2 έπειτα από 48ωρη αφαλάτωση του ιστοτεμαχίου με χρήση διαλύματος νιτρικού οξέος 5%. A, C: Παρατηρούνται σημεία παρατεταμένης αφαλάτωσης υπό τη μορφή ακανόνιστου σχήματος κενοτοπίων, x100. B: Μεγεθυμένη αποτύπωση της εικόνας A (περιγεγραμμένη περιοχή): Είναι εμφανή τα δαντελωτά όρια των κενοτοπίων που προέκυψαν από τη δράση του οξέος (κύκλος), σε αντίθεση με τα σαφή και ομαλά όρια των αγγειακών σωλήνων (βέλη), x400. D: Άτομο FBI έπειτα από 24ωρη αφαλάτωση του ιστοτεμαχίου με χρήση διαλύματος νιτρικού οξέος 7%. Είναι εμφανής η εκτεταμένη καταστροφή του ιστού, x50. Χρώση H&E.

Ποιοτική ιστολογική ανάλυση

Τα ιστολογικά παρασκευάσματα του οστίτη ιστού των πλευρών γατών παρουσίασαν παρόμοια ιστολογικά χαρακτηριστικά στο σύνολο των ατόμων που εξετάστηκαν. Μακροσκοπικά, οι ιστολογικές τομές των πλευρών που προέρχονταν από γάτες είχαν σχεδόν κυκλικό σχήμα χωρίς ευδιάκριτα χείλη και πλευρική αύλακα. Μικροσκοπικά παρατηρήθηκε κυρίως δευτερογενής οστίτης ιστός με ακανόνιστη οργάνωση των δευτερογενών οστεώνων και εκτεταμένα διάμεσα συστήματα, ενώ διασφoζόταν το αραιό δίκτυο των λεπτών οστέινων δοκίδων στις οποίες εντοπίστηκε μη αγγειώδης πεταλιώδης οστίτης ιστός.

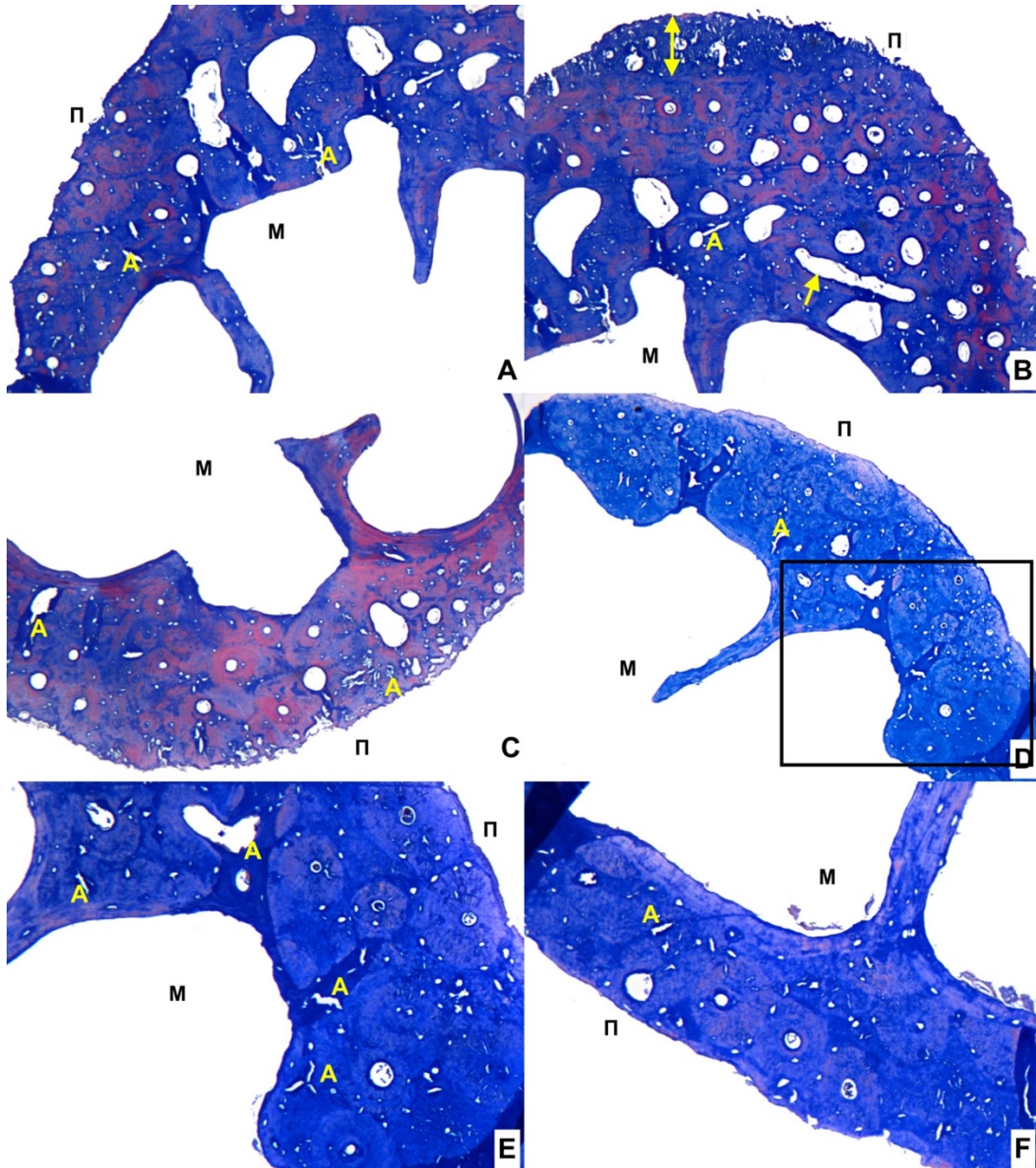
Στον έξω φλοιό παρατηρήθηκε δευτερογενής οστίτης ιστός με δευτερογενείς οστεώνες μικρού έως μεσαίου μεγέθους με εμφανείς τις γραμμές οστεοποίησης στην περιφέρειά τους. Οι οστεώνες εμφάνιζαν πυκνή οργάνωση στον ιστό και εκτείνονταν από τα περιφερικά στρώματα, έσω του περιόστεου ως τα περιμυελικά στρώματα του ιστού, με την εξαίρεση ενός ατόμου όπου η παρουσία τους στον ιστό ήταν αραιότερη. Οι Αβέρσειοι σωλήνες είχαν κυκλικό σχήμα στην πλειοψηφία τους, μικρό έως μεγάλο μέγεθος και φέρονταν επιμήκως στον ιστό. Στην περίπτωση ενός ατόμου ο ιστός της περιοχής εμφάνιζε μεγαλύτερη διάμετρο και στα εσωτερικά του στρώματα εντοπίστηκαν μεγάλου μεγέθους αγγειακοί σωλήνες, οι οποίοι φέρονταν λοξά στον ιστό. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν περιοχές στη συμπαγή μοίρα, όπου ο ιστός στερούταν αγγείωσης, καθώς και περιοχές με διάσπαρτους αγγειακούς σωλήνες. Μη αγγειώδης οστίτης ιστός εντοπίστηκε και στα περιμυελικά συστήματα αρκετών περιοχών. Σε όλη την έκταση του ιστού ήταν εμφανή τα οστικά βοθρία, ενώ αναγνωρίστηκε και ένας σωλήνας του Volkmann. Ακόμη, παρατηρήθηκαν αρκετές κενοτοπιώδεις περιοχές με ανώμαλα όρια, καθώς και δαντελωτά εξωτερικά όρια της συμπαγούς μοίρας, ως αποτέλεσμα ιστικής φθοράς. Τέλος, το συμπαγές οστό παρουσίαζε ιστικές περιοχές που προέβαλαν ως ακρολοφίες στους μυελοχώρους.

Στον έσω φλοιό παρατηρήθηκε δευτερογενής οστίτης ιστός με μικρού και μεσαίου μεγέθους δευτερογενείς οστεώνες με ευκρινείς τις γραμμές οστεοποίησης, οι οποίοι είχαν πυκνότερη οργάνωση στα μεσαία στρώματα του ιστού. Οι Αβέρσειοι σωλήνες είχαν μικρό έως μεγάλο μέγεθος, κυκλικό σχήμα και επιμήκη κατεύθυνση. Στον ιστό εντοπίστηκαν μεμονωμένοι αγγειακοί σωλήνες μεγάλου μεγέθους οι οποίοι είχαν λοξή κατεύθυνση. Ακόμη, εντοπίστηκε μία συστάδα τριών δευτερογενών οστεώνων. Τα διάμεσα συστήματα πεταλιώδους οστίτη ιστού ήταν εκτεταμένα και τα περιμυελικά συστήματα αποτελούταν από μη αγγειώδη πεταλιώδη οστίτη ιστό. Σε όλη την έκταση του ιστού παρατηρήθηκαν πολυάριθμα οστικά βοθρία, καθώς και κενοτοπιώδεις περιοχές με ανώμαλα όρια, ως αποτέλεσμα ιστικής φθοράς (Εικόνες 108, 109).



Εικόνα 108. Ιστολογικά παρασκευάσματα οστίτη ιστού πλευρών γατών. Α: Έσω φλοιός: Παρατηρείται πεταλιώδης οστίτης ιστός με μικρού και μεσαίου μεγέθους οστεώνες, αγγειακούς σωλήνες επιμήκους κατεύθυνσης και εκτεταμένα διάμεσα συστήματα. Εντοπίζονται δύο αγγειακοί σωλήνες μεγάλου μεγέθους και ελλειπτικού σχήματος, καθώς και οστικά βοθρία. Ο ιστός εμφανίζει αρκετές κενοδοκίδες περιοχές ως αποτέλεσμα artifact, x50. Β: Έξω φλοιός: Παρατηρείται πεταλιώδης οστίτης ιστός με οστεώνες μικρού και μεσαίου μεγέθους, αγγειακούς σωλήνες επιμήκους κατεύθυνσης και σχήματος κυκλικού έως ελλειπτικού. Τα διάμεσα συστήματα είναι εκτεταμένα όπως και το περιμυελικό σύστημα. Στην οστεοδοκίδα εντοπίζεται ένας αγγειακός σωλήνας ελλειπτικού σχήματος. Είναι εμφανή τα οστικά βοθρία, καθώς και κενοδοκίδες σχηματισμοί ως αποτέλεσμα artifact, x50. Γ: Οστεοδοκίδες: Διασώζονται οι λεπτές οστεοδοκίδες στις οποίες εντοπίζεται μη αγγειώδης πεταλιώδης οστίτης ιστός. Στον έξω φλοιό παρατηρείται κυρίως μη αγγειώδης οστίτης ιστός στον οποίο παρεμβάλλονται ολιγάριθμοι αγγειακοί σωλήνες μικρού μεγέθους, x50. Δ: Έξω φλοιός/χειλος: Σε όλη την επιφάνεια της συμπαγούς μοίρας παρατηρούνται πολυάριθμοι δευτερογενείς οστεώνες μικρού μεγέθους που φέρονται επιμήκως στον ιστό. Εντοπίζεται μία περιοχή του συμπαγούς οστού που προβάλλει ως ακρολοφία στο μυελοχώρο, x50. Ε: Μεγέθυνση περιγεγραμμένης περιοχής της εικόνας Δ: Είναι εμφανείς οι γραμμές οστεοποίησης στην περιφέρεια των οστεώνων, τα οστικά βοθρία και οι εκτεταμένα διάμεσα συστήματα, x100. ΣΤ: Έξω φλοιός: Παρατηρείται πυκνός δευτερογενής οστίτης που

εκτείνεται από τα περιμυελικά ως τα περιφερικά στρώματα του ιστού και διαθέτει μικρού και μεσαίου μεγέθους δευτερογενείς οστεώνες με ευδιάκριτες γραμμές οστεοποίησης. Οι Αβέρσειοι σωλήνες έχουν κυκλικό σχήμα, μικρό έως μεσαίο μέγεθος και φέρονται επιμήκως στον ιστό. Είναι ευδιάκριτα τα οστικά βοθρία και τα εκτεταμένα διάμεσα συστήματα, x100. Μ: μυελοχώρος, Π: περιοχή περιόστεου, Α: artifact. Χρώση Η&Ε.



Εικόνα 109. Ιστολογικά παρασκευάσματα οστίτη ιστού πλευρών γατών. Α: Έξω φλοιός/χείλος: Παρατηρείται η εναπόθεση δευτερογενούς οστίτη ιστού με μικρού και μεσαίου μεγέθους οστεώνες που φέρονται επιμήκως στον ιστό. Στα άνω πεδία της εικόνας εντοπίζονται ευμεγέθεις αγγειακοί σωλήνες οι οποίοι φέρονται λοξά στον ιστό. Περιμυελικά ο ιστός στερείται αγγείωσης, όπως και στις οστεοδοκίδες που διασάζονται. Ο ιστός φέρει κενοτοπιώδεις περιοχές με ανώμαλα όρια, καθώς και δαντελωτά εξωτερικά όρια της συμπαγούς μοίρας, ως αποτέλεσμα ιστικής φθοράς. Τα οστικά βοθρία είναι εμφανή σε όλη την επιφάνεια του ιστού, x50. Β: Έξω φλοιός: Παρατηρείται δευτερογενής οστίτης ιστός με μικρού και μεσαίου μεγέθους οστεώνες που φέρονται επιμήκως στα μεσαία στρώματα του ιστού. Έσω της παραπάνω περιοχής εντοπίζονται αγγειακοί σωλήνες μεγάλου μεγέθους, οι οποίοι φέρονται λοξά στον ιστό, καθώς και ένας σωλήνας του Volkmann (βέλος). Στα εξωτερικά στρώματα

εντοπίζεται μια περιοχή με ενδείξεις έντονης ιστικής φθοράς (διπλό βέλος), x50. C: Έσω φλοιός/χείλος: Παρατηρούνται μικρού και μεσαίου μεγέθους οστεώνες κυρίως στα μεσαία στρώματα του ιστού, με Αβέρσειους σωλήνες επιμήκους κατεύθυνσης. Οι γραμμές οστεοποίησης διακρίνονται ευκρινώς. Εντοπίζεται ένας αγγειακός σωλήνας που φέρεται λοξά στον ιστό, καθώς και πολυάριθμα οστικά βοθρία. Τα περιμελικά συστήματα φέρουν πεταλιώδη οστίτη ιστό που στερείται αγγείωσης. Ο ιστός εμφανίζει κενοδοπιώδεις περιοχές με ανώμαλα όρια ως αποτέλεσμα ιστικής φθοράς ή artifact, x50. D: Έξω φλοιός/χείλος: Παρατηρείται δευτερογενής οστίτης ιστός με μικρού και μεσαίου μεγέθους δευτερογενείς οστεώνες επιμήκους κατεύθυνσης και ακανόνιστης οργάνωσης, με εκτεταμένα διάμεσα συστήματα. Ο ιστός παρουσιάζει δύο περιοχές συμπαγούς οστίτη ιστού που προβάλλουν ως ακρολοφίες στο μυελοχώρο, x50. E: Μεγέθυνση περιγεγραμμένης περιοχής της εικόνας D: Παρατηρούνται οι δευτερογενείς οστεώνες με τις ευδιάκριτες γραμμές οστεοποίησης, τα εκτεταμένα διάμεσα συστήματα και τα ευμεγέθη οστικά βοθρία, x100. F: Έσω φλοιός/χείλος: Εντοπίζεται μια συστάδα τριών δευτερογενών οστεώνων με Αβέρσειους σωλήνες μικρού μεγέθους σε έδαφος δευτερογενούς οστίτη ιστού. Στο πεδίο παρατηρούνται εκτεταμένα διάμεσα συστήματα, καθώς και περιμελικά συστήματα πεταλιώδους οστίτη ιστού, x100. M: μυελοχώρος, Π: περιοχή περιόστεου, A: artifact. Χρώση Masson's trichrome.

6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

6.1. Περιορισμοί της μελέτης

Κατά τη διάρκεια της ερευνητικής εργασίας προέκυψαν οι εξής περιορισμοί:

1. Ηλικία των ατόμων: Η ηλικία των ζώων από τα οποία προήλθαν τα οστά κατά το θάνατο ή τη σφαγή τους δεν ήταν γνωστή. Ωστόσο, ήταν γνωστή η ηλικία των ανθρώπων κατά το θάνατό τους. Επιπλέον, δεν υπήρχε διαθέσιμο οστό πλευράς ανήλικου ανθρώπου ώστε να συμπεριληφθεί στη μελέτη, καθώς τα ιστολογικά χαρακτηριστικά των οστών που προέρχονται από άτομα νεαρής ηλικίας συγχέονται συχνότερα με τα ιστολογικά χαρακτηριστικά των οστών των λοιπών θηλαστικών [4,8,14].
2. Φυλή των ζώων: Η φυλή είναι ένα χαρακτηριστικό το οποίο ενδεχομένως να επηρεάζει τις ιστολογικές δομές του οστίτη ιστού των σκύλων, καθώς βάση αυτής προκύπτουν σημαντικές διαφορές στο σωματικό μέγεθος των ατόμων [4]. Ωστόσο, η φυλή των ζώων εκ των οποίων προήλθαν τα οστά δεν ήταν γνωστή.
3. Διάρκεια ταφής / Ταφικό περιβάλλον: Η διάρκεια της ταφής φαίνεται πως επηρεάζει τη μικροδομή των οστών. Όπως έχει παρατηρηθεί, οι εδαφικοί μικροοργανισμοί συνεχίζουν να προκαλούν εστιακές αλλοιώσεις σε προηγουμένως ανεπηρέαστα σημεία των οστών έπειτα από τουλάχιστον επτά χρόνια ταφής [114]. Επιπλέον, η σύσταση και η συμπεριφορά των οστών επηρεάζεται από τις ταφονομικές αλλοιώσεις που οφείλονται στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του ταφικού περιβάλλοντος [71]. Αναφορικά με τα οστά των ζώων που περισυλλέχθηκαν από το κοιμητήριο ζώων (σκύλοι και γάτες), δεν υπήρχαν διαθέσιμες πληροφορίες για την ημερομηνία ταφής και για τα χαρακτηριστικά του ταφικού περιβάλλοντος.
4. Προσδιορισμός πλευράς (siding): Ο προσδιορισμός της πλευράς του σκελετού στην οποία ανήκε η κάθε πλευρά ήταν δυνατή για ένα μέρος του συνόλου των οστών που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη. Ωστόσο, σύμφωνα με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών, η πλευρά του σώματος στην οποία ανήκουν τα ιστοτεμάχια οστίτη ιστού πλευρών δεν επηρεάζει τα ιστολογικά του χαρακτηριστικά [8,15].
5. Μικροαρχιτεκτονική δομή του ιστού: Επιλέγοντας την τεχνική της αφαλάτωσης των οστών ελήφθη υπόψη ότι θα ήταν δυνατή η παρατήρηση της οργανικής ουσίας του

ιστού και των δομών της, ενώ δεν θα ήταν ευδιάκριτη η μικροαρχιτεκτονική του δομή, όπως παρατηρείται σε εφραλατωμένες τομές οστίτη ιστού [48].

6.2. Αφαλάτωση

Έχει γίνει ήδη αναφορά στη σημασία του ελέγχου του τελικού σημείου της αφαλάτωσης για την παρασκευή ιστολογικών παρασκευασμάτων υψηλής ευκρίνειας [75,82]. Στη συγκεκριμένη μελέτη δόθηκε έμφαση στην αξιολόγηση της πυκνότητας του οξέος και του χρόνου παραμονής των ιστοτεμαχίων από κάθε ζωικό είδος σε αυτό (Πίνακας 7).

Πίνακας 7. Ιδανική πυκνότητα υδατικού διαλύματος νιτρικού οξέος και διάρκεια αφαλάτωσης για οστικά τεμάχια πλευρών ανά είδος θηλαστικού.

Είδος θηλαστικού	Πυκνότητα νιτρικού οξέος	Διάρκεια αφαλάτωσης
Βοοειδή	10%	>10 ημέρες
Αιγοπρόβατα	5%	2-7 ημέρες
Χοίροι	5%	14 ημέρες
Σκύλοι	5%	2-3 ημέρες
Γάτες	5%	≤2 ημέρες

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι για την αφαλάτωση των οστικών τεμαχίων πλευρών βοοειδών η ιδανική πυκνότητα του διαλύματος νιτρικού οξέος ήταν 10% και χρειάστηκε 10 ημέρες ως το τελικό σημείο αφαλάτωσης. Ωστόσο, πρέπει να αναφερθεί ότι είχε επιχειρηθεί ανεπιτυχώς η αφαλάτωση των συγκεκριμένων ιστοτεμαχίων με αραιότερα διαλύματα νιτρικού οξέος για παρατεταμένο χρονικό διάστημα. Επομένως, για την ικανοποιητική αφαλάτωση ιστοτεμαχίων πλευρών βοοειδών, είναι απαραίτητη η παραμονή τους σε διάλυμα νιτρικού οξέος 10% για χρονικό διάστημα που ξεπερνά τις 10 ημέρες, με συχνό έλεγχο της πορείας της.

Αναφορικά με την αφαλάτωση των ιστοτεμαχίων πλευρών αιγοπροβάτων, η παραμονή τους σε διάλυμα νιτρικού οξέος πυκνότητας 5% έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα σε σύντομο χρονικό διάστημα. Συγκεκριμένα, για την αφαλάτωση των ιστοτεμαχίων που υπέδειξαν ιστολογικά δοκιδώδες οστό χρειάστηκαν δύο ημέρες, ενώ για το ιστοτεμάχιο που υπέδειξε δευτερογενή οστίτη ιστό χρειάστηκαν επτά ημέρες παραμονής στο διάλυμα. Αντιθέτως, το διάλυμα νιτρικού οξέος 7% είχε καταστρεπτικές συνέπειες για τον ιστό και δεν συνιστάται η χρήση του για την αφαλάτωση ιστοτεμαχίων πλευρών αιγοπροβάτων. Επομένως, για την ικανοποιητική αφαλάτωση

ιστοτεμαχίων πλευρών αιγοπροβάτων, είναι απαραίτητη η παραμονή τους σε διάλυμα νιτρικού οξέος 5% για χρονικό διάστημα από δύο έως επτά ημέρες, με συχνό έλεγχο της πορείας της.

Για την αφαλάτωση των ιστοτεμαχίων πλευρών χοίρων η δράση του διαλύματος νιτρικού οξέος, πυκνότητας 5% για χρονικό διάστημα 14 ημερών έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα. Αντιθέτως η παραμονή τους σε διάλυμα νιτρικού οξέος 7% είχε ως αποτέλεσμα τη λήψη ιστολογικών παρασκευασμάτων μη αποδεκτής ποιότητας. Επομένως, για την ικανοποιητική αφαλάτωση ιστοτεμαχίων πλευρών χοίρων, είναι απαραίτητη η παραμονή τους σε διάλυμα νιτρικού οξέος 5% για χρονικό διάστημα 14 ημερών, με συχνό έλεγχο της πορείας της.

Τα ιστοτεμάχια πλευρών σκύλων παρέμειναν σε διάλυμα νιτρικού οξέος πυκνότητας 5% για δύο έως τρεις μέρες και οι ιστολογικές εικόνες που προέκυψαν ήταν ικανοποιητικές. Ωστόσο, εντοπίστηκαν κενοδοπιώδη σημεία στον ιστό που παρέπεμπαν στην καταστρεπτική δράση του οξέος. Αντιθέτως, η παραμονή του ιστού σε διάλυμα νιτρικού οξέος 7% για 24 ώρες είχε ως αποτέλεσμα την εκτεταμένη καταστροφή του. Επομένως, για την ικανοποιητική αφαλάτωση ιστοτεμαχίων πλευρών σκύλων, είναι απαραίτητη η παραμονή τους σε διάλυμα νιτρικού οξέος 5% για χρονικό διάστημα δύο έως τριών ημερών, με αυστηρό έλεγχο της πορείας της.

Η παραμονή των ιστοτεμαχίων που προέρχονταν από πλευρές γατών σε διάλυμα νιτρικού οξέος πυκνότητας 5% για χρονικό διάστημα δύο ημερών είχε ως αποτέλεσμα την λήψη ιστολογικών παρασκευασμάτων ικανοποιητικής ποιότητας στην πλειοψηφία τους. Ωστόσο, εντοπίστηκαν κενοδοπιώδεις περιοχές ως αποτέλεσμα της καταστρεπτικής δράσης του οξέος στον ιστό και ένα ιστοτεμάχιο παρουσίασε εκτεταμένη ιστική καταστροφή. Η παραμονή του ιστοτεμαχίου σε διάλυμα νιτρικού οξέος 7% για 24 ώρες είχε ως αποτέλεσμα την εκτεταμένη καταστροφή του ιστού. Επομένως, για την ικανοποιητική αφαλάτωση ιστοτεμαχίων πλευρών γατών, είναι απαραίτητη η παραμονή τους σε διάλυμα νιτρικού οξέος 5% για χρονικό διάστημα έως δύο ημερών, με αυστηρό έλεγχο της πορείας της.

Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί ότι ο χρόνος που χρειάζεται ο κάθε ιστός προκειμένου να αφαλατωθεί εξαρτάται από το μέγεθος και το πορώδες του ιστού [82] και ως εκ τούτου η αφαλάτωση του κάθε ιστοτεμαχίου θα πρέπει να εξετάζεται κατά περίπτωση.

6.3. Χρώσεις

Η ιστολογική χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης είναι μια ευρέως διαδεδομένη χρώση στα ιστολογικά και παθολογοανατομικά εργαστήρια [75,82,134] και η συχνότερα χρησιμοποιούμενη χρώση στο παρασκευαστήριο του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής όπου πραγματοποιήθηκε η προετοιμασία των δειγμάτων της μελέτης. Το παρασκευαστήριο του Εργαστηρίου διαθέτει επίσης εμπειρία στην εφαρμογή της τρίχρωμης χρώσης Masson.

Για την παρασκευή των ιστολογικών παρασκευασμάτων χρησιμοποιήθηκαν η χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης, καθώς και η τρίχρωμη χρώση Masson. Η εφαρμογή των δύο χρώσεων στα ιστολογικά παρασκευάσματα της μελέτης σκόπευε στη διερεύνηση των διαφορών στην απεικόνιση των δομικών στοιχείων των ιστών και στην εκτίμηση της αξίας της κάθε χρώσης για το σκοπό της μελέτης.

Τα κεχρωσμένα ιστολογικά παρασκευάσματα με τη χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης απέδωσαν εικόνες ικανοποιητικής έως υψηλής διαγνωστικής αξίας και οι ιστολογικές δομές διέθεταν υψηλή ευκρίνεια. Επιπλέον, η απεικόνιση της οργάνωσης της οργανικής ουσίας του ιστού ήταν ικανοποιητική και οι διαφορές ανάμεσα στον πεταλιώδη και στον δικτυωτό οστίτη ιστό απεικονίζονταν ευκρινώς.

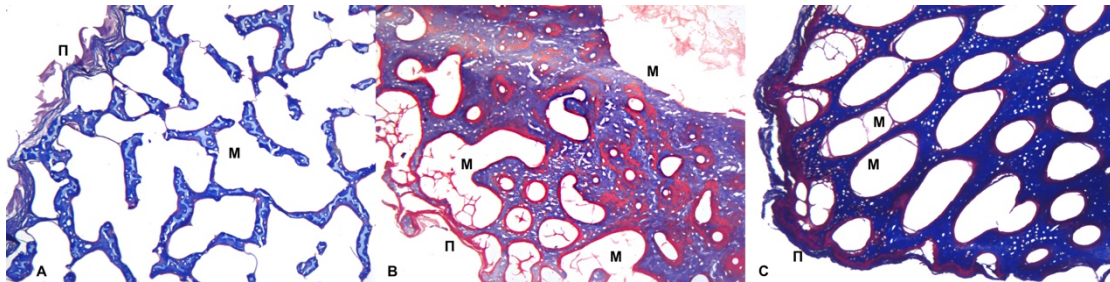
Με την εφαρμογή της τρίχρωμης χρώσης Masson παρατηρήθηκε ευκρινέστερα η έκταση των δευτερογενών οστεώνων σε σχέση με τα παρασκευάσματα στα οποία εφαρμόστηκε η χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης. Αντιθέτως, η ευκρίνεια της οργάνωσης του ιστού στα διάμεσα συστήματα δεν ήταν υψηλή στα περισσότερα δείγματα. Ακόμη, το αποτέλεσμα της χρώσης δεν εμφάνισε συνέπεια στις δομές του ιστού των διαφορετικών παρασκευασμάτων. Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα αφορά στην απεικόνιση των οστεώνων, οι οποίοι σε ορισμένες ιστολογικές τομές απεικονίζονταν μπλε, ενώ σε άλλες έντονο ροζ/κόκκινο ακόμη και σε ιστοτεμάχια θηλαστικών του ίδιου είδους. Η τυχαία απεικόνιση μπλε και κόκκινων περιοχών στον οστίτη ιστό με την τρίχρωμη χρώση Masson έχει αναφερθεί και από άλλους συγγραφείς, ενώ ένα πλήθος παραγόντων όπως, η θερμοκρασία του περιβάλλοντος, το pH του διαλύματος και του ιστού και η επίδραση του μονιμοποιητικού παράγοντα στον ιστό είναι ικανοί να επηρεάσουν το αποτέλεσμα της τρίχρωμης χρώσης [135].

6.4. Ποιοτικά ιστολογικά χαρακτηριστικά

Κατά την παρατήρηση των ιστολογικών παρασκευασμάτων που προέρχονταν από ιστοτεμάχια πλευρών βοοειδών, αιγοπροβάτων (δύο από τα τρία άτομα) και χοίρων εντοπίστηκε δοκιδώδες οστό ως κοινό ιστολογικό χαρακτηριστικό. Συμπερασματικά, τα οστικά ιστοτεμάχια προέρχονταν από σφάγια νεαρών ζώων, στα οποία δεν είχε ολοκληρωθεί η τελείωση των οστών, καθώς το δοκιδώδες οστό κυριαρχεί κατά τη διάρκεια της ενδομεμβρανικής οστέωσης εκ της οστεογόνου στοιβάδας του περιόστεου [20].

Ιδιαίτερα όσον αφορά τις πλευρές αιγοπροβάτων, ο δοκιδώδης οστίτης ιστός ήταν ο κυρίαρχος ιστολογικός τύπος σε δύο από τα τρία άτομα και εντοπίστηκαν περιοχές συμπαγούς οστίτη ιστού μόνο τμηματικά. Ο μήνας περισυλλογής των οστών (τέλη Φεβρουαρίου) σε συνδυασμό με τη συνήθη εποχή των γεννήσεων των αιγοπροβάτων (Οκτώβρης-Δεκέμβρης) οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα συγκεκριμένα ιστοτεμάχια προέρχονταν από ζώα ηλικίας από δύο έως τεσσάρων μηνών. Αντιθέτως, το ιστοτεμάχιο πλευράς του τρίτου αιγοπροβάτου έφερε αποκλειστικά δευτερογενή οστίτη ιστό με Αβέρσεια συστήματα. Συμπερασματικά, το άτομο αυτό είχε ηλικία μεγαλύτερη ή ίση του ενός έτους, σύμφωνα με τα αποτελέσματα μιας ερευνητικής μελέτης [104].

Ο δοκιδώδης οστίτης ιστός εντοπιζόταν στα έξω στρώματα του έξω φλοιού και των χειλέων των πλευρών των βοοειδών και καταλάμβανε το 1/3 ως το 1/2 του ιστού. Οι μυελοχώροι παρουσίαζαν ακανόνιστο σχήμα και τυχαία κατεύθυνση στον ιστό. Στις πλευρές των χοίρων εντοπίστηκε δοκιδώδες οστό επιπλέον στον έξω φλοιό, ενώ στον έξω φλοιό και στο οπίσθιο χείλος των πλευρών καταλάμβανε το μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειας του ιστού. Στο οπίσθιο χείλος των πλευρών των χοίρων οι ευμεγέθεις μυελοχώροι εμφάνιζαν χαρακτηριστική ακτινική κατεύθυνση στον ιστό (Εικόνα 110)



Εικόνα 110. Ιστολογικά παρασκευάσματα οστίτη ιστού πλευρών προερχόμενες από σφάγια ζώων. Παρατηρούνται οι διαφορές της μικροαρχιτεκτονικής δομής του δοκιδώδους οστού: Α: αιγοπροβάτου, Β: βοοειδούς, C: χοίρου. x50, Π: περιοχή περιόστεου, Μ: μυελοχώροι, χρώση Masson's trichrome.

Στον οστίτη ιστό των βοοειδών, παρατηρήθηκαν περιοχές μη αγγειώδους οστίτη ιστού, σε συμφωνία με αποτελέσματα προηγούμενων μελετών [66,68,98,102], οι οποίες εντοπίζονταν στον έξω φλοιό, καθώς και σε αρκετές από τις οστέινες νησίδες. Ωστόσο, ο μη αγγειώδης οστίτης ιστός επικρατούσε στη συμπαγή μοίρα του έξω φλοιού των ιστοτεμαχίων των χοίρων που παρατηρήθηκαν. Επομένως, το συμπέρασμα των ερευνητών ότι η παρουσία οστίτη ιστού που στερείται αγγείωσης υποδεικνύει τη βόεια προέλευση των ιστοτεμαχίων [66,102], δεν βρίσκει εφαρμογή στη συγκεκριμένη μελέτη.

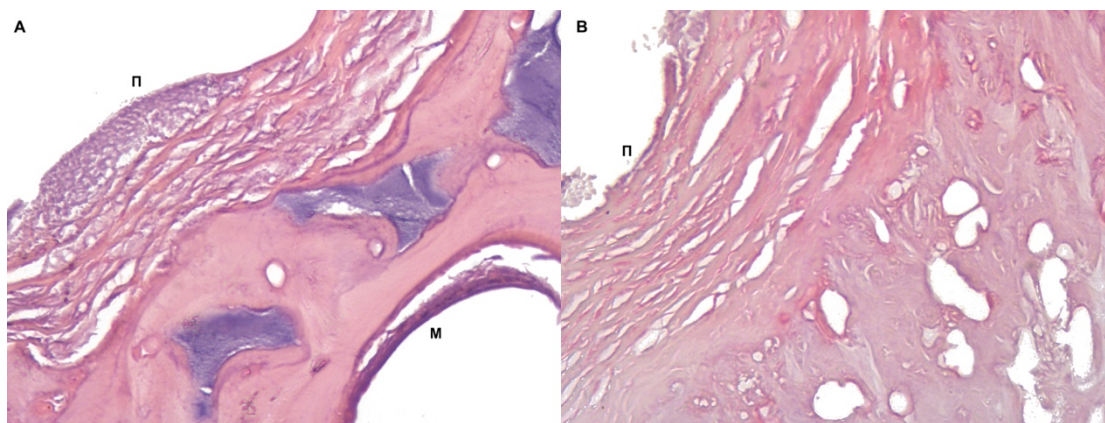
Ο εντοπισμός δευτερογενούς οστίτη ιστού με πυκνή οργάνωση οστεώνων στα εσωτερικά και στα περιμυελικά στρώματα του συμπαγούς οστού των βοοειδών συμβαδίζει με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών [4,45,66,102]. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν συστάδες οστεώνων στα μεσαία στρώματα του ιστού, σε συμφωνία με βιβλιογραφικές αναφορές [64,68]. Τέλος, η εντόπιση μικρού και μεσαίου μεγέθους αγγειακών σωλήνων που περιβάλλονταν από πεταλιώδη οστίτη ιστό και φέρονταν ακτινωτά στα μεσαία στρώματα του ιστού του έξω φλοιού αποτέλεσε ένα χαρακτηριστικό εύρημα για τον οστίτη ιστό των πλευρών βοοειδών.

Στα ιστολογικά παρασκευάσματα πλευρών χοίρων παρατηρήθηκαν ελάχιστοι δευτερογενείς οστεώνες στα εσωτερικά και περιμυελικά στρώματα, ενώ δεν εντοπίστηκαν περιοχές οστικής απορρόφησης στον ιστό. Τα ευρήματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με προηγούμενη μελέτη οστίτη ιστού χοίρων όπου είχε εντοπιστεί πυκνός δευτερογενής οστίτης ιστός με πολυάριθμες κοιλότητες οστικής απορρόφησης [102]. Την απουσία περιοχών οστικής απορρόφησης από τον οστίτη ιστό χοίρων επιβεβαιώνουν τα αποτελέσματα και άλλων ερευνών [64,97]. Αντιθέτως, χαρακτηριστική ήταν η εντόπιση πολυάριθμων, ευμεγέθων, κυκλικών και ακανόνιστων αγγειακών σωλήνων που φέρονταν επιμήκως στον ιστό. Επιπλέον, στα εξωτερικά στρώματα του πρόσθιου χείλους της πλευράς ενός ατόμου οι αγγειακοί σωλήνες παρατάσσονταν σε σειρά σχηματίζοντας μια αλυσίδα αγγειακών σωλήνων έσω του περιόστεου.

Αναφορικά με τα χαρακτηριστικά των δευτερογενών οστεώνων που παρατηρήθηκαν στον οστίτη ιστό των χοίρων, είχαν μικρό και μεσαίο μέγεθος, κυκλικό σχήμα, φέρονταν επιμήκως στον ιστό και τα όριά τους ήταν ευδιάκριτα στα κεχρωσμένα παρασκευάσματα με την τρίχρωμη χρώση Masson. Οι παρατηρήσεις αυτές έρχονται σε αντίθεση με τα ευρήματα προηγούμενης μελέτης, όπου το σχήμα των οστεώνων περιγράφεται ως ακανόνιστο, τα όριά τους δυσδιάκριτα και το μέγεθός τους μεσαίο έως μεγάλο [3]. Ωστόσο, δεν εντοπίστηκε ικανός αριθμός δευτερογενών οστεώνων

στους ιστούς των χοίρων που εξετάστηκαν, έτσι ώστε να προκύψουν ασφαλή συμπεράσματα για τη μορφολογία τους.

Τέλος, στα ιστολογικά παρασκευάσματα των παραπάνω ζώων παρατηρήθηκαν εκτεταμένες περιοχές στα εξωτερικά στρώματα των ιστών που αφορίζονταν από την ενεργή οστεογόνο στοιβάδα του περιόστεου [20,72,140-142] (Εικόνα 111). Οι κολλαγόνες ίνες του νεοσχηματιζόμενου οστίτη ιστού εκ του περιόστεου δημιουργούσαν ένα χαρακτηριστικό δικτυωτό σχηματισμό, ο οποίος ενδεχομένως να αφορά τον ινοπεταλιώδη πλεγματοειδή οστίτη ιστό που συναντάται στα εξωτερικά στρώματα της συμπαγούς μοίρας των οστών των ανωτέρων ειδών [4, 5,15,45,64,66,102,106,107]. Ωστόσο, ο συγκεκριμένος ιστολογικός τύπος δεν έχει περιγραφεί σε αφαλατωμένες τομές οστών και επομένως δεν μπορεί να επιβεβαιωθεί ο συγκεκριμένος ισχυρισμός χωρίς τη σύγχρονη λήψη αφαλατωμένων τομών από τα διαθέσιμα ιστοτεμάχια.



Εικόνα 111. Ιστολογικά παρασκευάσματα αφαλατωμένου οστίτη ιστού πλευρών προερχόμενες από σφάγια Α: αιγοπρόβατο, Β: χοίρου. Παρατηρείται η εναπόθεση νεοσχηματιζόμενου οστίτη ιστού δικτυωτού σχηματισμού εκ της οστεογόνου στοιβάδας του περιόστεου. Π: περιοχή περιόστεου, Μ: μυελοχώροι, x400, χρώση Η&Ε.

Στα ιστοτεμάχια προερχόμενα από σκύλους, γάτες, ένα αιγοπρόβατο και άνθρωπο επικρατούσε δευτερογενής οστίτης ιστός με Αβέρσεια συστήματα.

Ο οστίτης ιστός της πλευράς του ενήλικου αιγοπρόβατο διέθετε πυκνή οργάνωση δευτερογενών οστεώνων οι οποίοι εκτείνονταν σε όλη την έκταση του συμπαγούς οστίτη ιστού, με εξαίρεση τα περιφερικά και περιμυελικά συστήματα που αποτελούνταν από μη αγγειώδη πεταλιώδη οστίτη ιστό. Αντιθέτως, σε προηγούμενες μελέτες εντοπίστηκαν διάσπαρτοι οστεώνες στον οστίτη ιστό των προβάτων [92,97]. Ο Enlow εντόπισε πυκνό δευτερογενή οστίτη ιστό στα οστά των πλευρών της αίγας [45], ωστόσο η πληροφορία αυτή δεν επαρκεί για να αποδείξει την αίγεια προέλευση του ιστοτεμαχίου της παρούσας μελέτης.

Στα όρια του περιόστεου και του ενδόστεου του οστίτη ιστού αιγοπροβάτου δεν παρατηρήθηκαν οστεώνες, σε αντίθεση με τα αποτελέσματα διαφορετικής ερευνητικής μελέτης [66]. Αντιθέτως, παρατηρήθηκαν συστάδες οστεώνων σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες [92,105]. Οι οστεώνες είχαν κυκλικό και ωοειδές σχήμα και εντοπίστηκαν σωλήνες του Volkman, όπως έχει ήδη παρατηρηθεί [97], ενώ οι Αβέρσειοι σωλήνες εμφάνιζαν μικρό έως μεσαίο μέγεθος και κυκλικό σχήμα, σε αντίθεση με τα ευρήματα άλλων μελετών όπου εντοπίστηκαν σωλήνες μεγάλου μεγέθους [97] και ακανόνιστου σχήματος [64].

Στις ιστολογικές τομές πλευρών σκύλων δεν παρατηρήθηκε πλεγματοειδής οστίτης ιστός, σε αντίθεση με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών [64,97,98] και σε συμφωνία με τα ιστολογικά ευρήματα πλευρών σκύλων διαφορετικής μελέτης [107]. Ωστόσο, σε συμφωνία με τις παρατηρήσεις ερευνητών εντοπίστηκε μη αγγειώδης πεταλιώδης οστίτης ιστός στα περιφερικά συστήματα και διάσπαρτοι δευτερογενείς οστεώνες στα μεσαία στρώματα του φλοιού [64,97,98]. Χαρακτηριστική ήταν η ύπαρξη εκτεταμένου μη αγγειώδους οστίτη ιστού στη συμπαγή μοίρα του έξω φλοιού και η εντόπιση μεμονωμένων δευτερογενών οστεώνων σε αυτήν την περιοχή.

Το μέγεθος των δευτερογενών οστεώνων που παρατηρήθηκαν στον οστίτη ιστό πλευρών σκύλων συμφωνεί με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών, καθώς εντοπίστηκαν οστεώνες μικρού [15,64,97,98] και μεσαίου μεγέθους [3,97] με εκτεταμένα διάμεσα συστήματα στον ιστό [3]. Οι Αβέρσειοι σωλήνες είχαν μικρό έως μεγάλο μέγεθος και σχήμα κυκλικό έως ελλειπτικό, όπως έχει παρατηρηθεί και από άλλους ερευνητές [97]. Επιπλέον, εντοπίστηκε μια συστάδα δευτερογενών οστεώνων, έξω του περιόστεου, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα μιας ερευνητικής μελέτης [64].

Ο οστίτης ιστός που προερχόταν από πλευρές γατών παρουσίαζε εκτεταμένο πυκνό δευτερογενή οστίτη ιστό στη συμπαγή μοίρα του οστού και μη αγγειώδη πεταλιώδη οστίτη ιστό, κυρίως στα περιμυελικά συστήματα, σε συμφωνία με τις παρατηρήσεις προηγούμενων μελετών [45,64,97,98]. Σε περιοχές του έξω φλοιού εντοπίστηκε μη αγγειώδης οστίτης ιστός με διάσπαρτους οστεώνες και εκτεταμένα διάμεσα συστήματα, όπως έχει αναφερθεί σε σχετική μελέτη [45].

Το μέγεθος των δευτερογενών οστεώνων και των Αβέρσειων σωλήνων που παρατηρήθηκαν στον οστίτη ιστό πλευρών γατών συμφωνεί με τα ευρήματα προηγούμενων μελετών, καθώς οι οστεώνες είχαν μικρό [97,98] και μεσαίο μέγεθος [3] και οι σωλήνες από πολύ μικρό [64,97] έως μεγάλο μέγεθος [97] και κυκλικό σχήμα. Επιπλέον, σε συμφωνία με τις παρατηρήσεις άλλων ερευνητών, τα διάμεσα

συστήματα ήταν εκτεταμένα [3] και παρατηρήθηκαν σωλήνες του Volkmann στον ιστό [45,64].

Τα εξωτερικά στρώματα του φλοιού της πλειοψηφίας των οστών σκύλων και γάτων παρουσίαζαν σημεία ιστικής φθοράς, τα οποία ενδεχομένως οφειλόταν στις συνθήκες του ταφικού περιβάλλοντος και ιδιαίτερα στην οξύτητα [71] ή/και στις εναλλαγές των περιόδων υγρασίας/ξηρασίας του εδάφους [2] και δεν αξιολογούνται στην παρούσα μελέτη.

Στον έσω φλοιό της ανθρώπινης πλευράς παρατηρήθηκε δευτερογενής οστίτης ιστός με οστεώνες, οι οποίοι είχαν πυκνή και ακανόνιστη οργάνωση με περιορισμένα διάμεσα συστήματα, σε συμφωνία με τις αναφορές προηγούμενων μελετών [3,97,98]. Στον έξω φλοιό οι δευτερογενείς οστεώνες εμφανίζονταν διάσπαρτοι με εκτεταμένα διάμεσα συστήματα, ευρήματα που παρατηρήθηκαν από ερευνητές σε οστίτη ιστό ενήλικων ατόμων [64].

Οι ανθρώπινοι δευτερογενείς οστεώνες είχαν μικρό, μεσαίο και μεγάλο μέγεθος, κυκλικό και ελλειψοειδές σχήμα, ενώ δεν εντοπίστηκαν κατακερματισμένοι ή αλληλοκαλυπτόμενοι οστεώνες σε ασυμφωνία με βιβλιογραφικές αναφορές [64,66]. Οι γραμμές οστεοποίησης ήταν ευδιάκριτες, όπως παρατηρήθηκε σε προηγούμενη συγκριτική μελέτη αφαλατωμένων τομών οστίτη ιστού [3]. Οι Αβέρσειοι σωλήνες είχαν μικρό έως μεγάλο μέγεθος, κυκλικό και ελλειψοειδές σχήμα και εμφάνιζαν επιμήκη, καθώς και λοξή κατεύθυνση στον ιστό. Το εύρημα αυτό δεν έρχεται σε συμφωνία με την παρατήρηση των ερευνητών ότι οι Αβέρσειοι σωλήνες των ανθρώπινων οστών φέρονται παράλληλα με τον επιμήκη άξονα του οστού [3]. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μία συστάδα δευτερογενών οστεώνων στα μεσαία στρώματα του έξω φλοιού, εύρημα που επιβεβαιώνει ότι οι ύπαρξη συστάδων οστεώνων δεν είναι αποκλειστικά ζωικό χαρακτηριστικό [90,96].

6.5. Σύγκριση ποιοτικών ιστολογικών χαρακτηριστικών τμημάτων πλευρών οικόσιτων ζώων και εφαρμογή στην αναγνώριση μικροτεμαχίων οστών δικαστικού ενδιαφέροντος

Τα ιστολογικά παρασκευάσματα των τμημάτων πλευρών ζώων και ανθρώπου παρουσίασαν ομοιότητες και διαφορές αναφορικά με τα ποιοτικά τους ιστολογικά χαρακτηριστικά. Αυτές αφορούσαν τόσο στους ιστολογικούς τύπους που παρατηρήθηκαν στους ιστούς των φλοιών και των χειλέων, όσο και στη μορφολογία των οστεώνων, των αγγειακών σωλήνων, στην παρουσία ή την απουσία διαφόρων ιστολογικών δομών και στην έκταση των διάμεσων συστημάτων. Τα ευρήματα παρατίθενται λεπτομερώς στους παρακάτω πίνακες (Πίνακες 8,9,10):

Πίνακας 8. Συγκριτικός πίνακας ιστολογικών τύπων που παρατηρήθηκαν στον οστίτη ιστό των πλευρών των εξεταζόμενων ειδών. Δ.δ.: Δεν διασώζεται, Δ.α.: Δεν αξιολογείται

Ιστολογικός Είδος	Δικτυωτός οστίτης ιστός	Πεταλιώδης οστίτης ιστός	Δοκιδώδες οστό	Μη αγγειώδης οστίτης ιστός	Θέση
Βοοειδή	✓	✓	-	✓ έσω στρώματα/ νησίδες οστίτη ιστού	Έξω φλοιός
	✓	✓	✓ έξω 1/3-1/2 του ιστού	-	Έσω φλοιός
	✓	✓	✓ έξω 1/2 του ιστού	-	Χείλη πλευράς
Αιγοπρόβατα	1. ✓ 2. -	1. ✓ στις δοκίδες 2. ✓	1. ✓ 2. --	1.- 2. ✓ περιμυελικά	Έξω φλοιός
	1. Δ.δ. 2. -	1. Δ.δ. 2. ✓	1. Δ.δ. 2. -	1.Δ.δ. 2. ✓ περιφερικά, περιμυελικά	Έσω φλοιός
	1. ✓ 2. -	1. ✓ στις δοκίδες 2. ✓	1. ✓ 2. -	1. ✓ 2. ✓ εκτεταμένος	Χείλη πλευράς
Χοίροι	✓	✓	✓	✓ επικρατεί σε περιοχές	Έξω φλοιός
	✓	✓ έσω στρώματα	✓	-	Έσω φλοιός
	✓	✓ πρόσθιο χείλος	✓ οπίσθιο χείλος	-	Χείλη πλευράς
Σκύλοι	-	✓	-	✓ εκτεταμένος	Έξω φλοιός
	-	✓	-	✓ περιφερικά	Έσω φλοιός
	-	✓	-	✓ σε ένα άτομο	Χείλη πλευράς
Γάτες	-	✓	-	✓ περιοχές	Έξω φλοιός
	-	✓	-	✓ περιμυελικά	Έσω φλοιός
	-	✓	-	✓ περιοχές	Χείλη πλευράς
Άνθρωπος	-	✓	-	✓ περιοχές, περιμυελικά	Έξω φλοιός
	✓ υπό το περίστρεο (Δ.α.)	✓	-	✓ περιμυελικά	Έσω φλοιός
	-	✓	-	✓ περιμυελικά	Χείλη πλευράς

Πίνακας 9. Συγκριτικός πίνακας των ιστολογικών δομών των οστέων που παρατηρήθηκαν στον οστίτη ιστό των πλευρών των εξεταζόμενων ειδών. Δ.δ.: Δεν διασώζεται

Οστεόνης Είδος	Πρωτογενείς οστεόνες	Δευτερογενείς οστεόνες	Συστάδες οστεώνων	Αβέρσειοι σωλήνες	Θέση
Βοοειδή	✓	✓ διάσπαρτοι	-	μεσαίοι, κυκλικοί, ελλειπτικοί, επιμήκεις	Έξω φλοιός
	✓	✓ πυκνοί, διάσπαρτοι	✓ πρωτογενείς 4,6 δευτερογενείς 7	μικροί, κυκλικοί, επιμήκεις	Έσω φλοιός
	✓	-	-	-	Χείλη πλευράς
Αιγοπρόβατα	1. ✓ 2. ✓	1. - 2. ✓ πυκνοί	1. - 2. ✓ πρωτογενείς 5, δευτερογενείς 4	1. - 2. μικροί, μεσαίοι, κυκλικοί, επιμήκεις	Έξω φλοιός
	1. Δ.δ. 2. ✓	1. Δ.δ. 2. ✓ πυκνοί	1. Δ.δ. 2. -	1. Δ.δ. 2. μικροί, μεσαίοι, κυκλικοί, επιμήκεις	Έσω φλοιός
	1. - 2. ✓ σε σειρά	1. - 2. ✓ διάσπαρτοι	1. - 2. -	1. - 2. μικροί, μεσαίοι, κυκλικοί, επιμήκεις	Χείλη πλευράς
Χοίροι	✓	-	-	-	Έξω φλοιός
	✓ έσω στρώματα	✓ περιμυελικά, διάσπαρτοι	-	μεσαίοι, κυκλικοί, επιμήκεις	Έσω φλοιός
	✓ πρόσθιο χείλος, έξω στρώματα σε σειρά	✓ πρόσθιο χείλος, έσω στρώματα	-	μικροί, κυκλικοί, επιμήκεις	Χείλη πλευράς
Σκύλοι	✓ μεμονωμένοι	✓ ολίγοι, διάσπαρτοι	-	μικροί, μεσαίοι, μεγάλοι, κυκλικοί, επιμήκεις	Έξω φλοιός
	✓	✓ διάσπαρτοι	-	μικροί, μεσαίοι, μεγάλοι, κυκλικοί, επιμήκεις	Έσω φλοιός
	✓	✓ σε σειρά	✓ δευτερογενείς 6	μικροί, μεσαίοι, κυκλικοί, ελλειψοειδείς, επιμήκεις	Χείλη πλευράς
Γάτες	✓	✓ πυκνοί, ακανόνιστοι	-	μικροί, μεσαίοι, μεγάλοι, κυκλικοί, επιμήκεις	Έξω φλοιός
	✓	✓ πυκνοί, ακανόνιστοι	✓ δευτερογενείς 3	μικροί, μεσαίοι, μεγάλοι, κυκλικοί, επιμήκεις	Έσω φλοιός
	✓	✓ ακανόνιστοι	✓ δευτερογενείς 3	μικροί, μεσαίοι κυκλικοί, επιμήκεις	Χείλη πλευράς
Ανθρώπος	✓	✓ διάσπαρτοι	✓ δευτερογενείς 3	μεσαίοι, μεγάλοι, κυκλικοί, ελλειψοειδείς, επιμήκεις, λοξοί	Έξω φλοιός
	-	✓ πυκνοί, ακανόνιστοι, τύπου I, II, III	-	μικροί, μεσαίοι, μεγάλοι, κυκλικοί, ελλειψοειδείς, επιμήκεις	Έσω φλοιός
	-	✓ ακανόνιστοι	-	μικροί, μεσαίοι, κυκλικοί, ελλειψοειδείς, επιμήκεις	Χείλη πλευράς

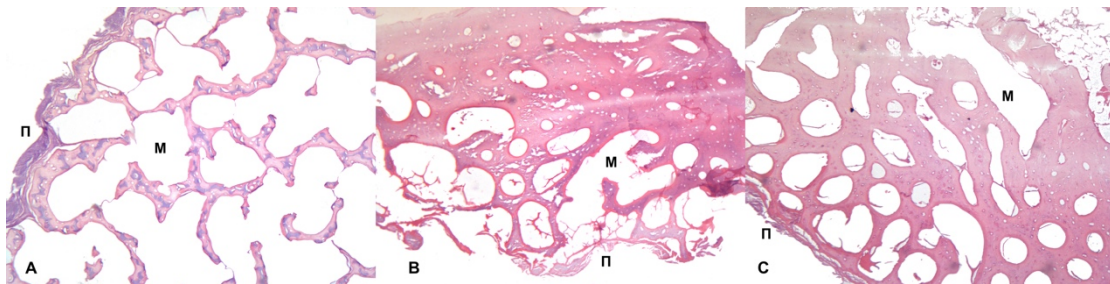
Πίνακας 10. Συγκριτικός πίνακας των λοιπών ιστολογικών δομών που παρατηρήθηκαν στον οστίτη ιστό των πλευρών των εξεταζόμενων ειδών. Δ.δ.: Δεν διασώζεται

Ιστολογικές δομές Είδος	Σωλήνες του Volkman	Αγγειακοί σωλήνες	Σημεία οστικής απορρόφησης	Διάμεσα συστήματα	Θέση
Βοοειδή	✓	✓ μικροί, μεσαίοι, ακτινωτοί	-	εκτεταμένα	Έξω φλοιός
	✓	✓ μεσαίοι, κυκλικοί, ελλειπτικοί, λοξοί	-	περιορισμένα, εκτεταμένα	Έσω φλοιός
	✓	✓ μεσαίοι, λοξοί, ακανόνιστοι	-	εκτεταμένα	Χείλη πλευράς
Αιγοπρόβατα	1. - 2. ✓	1. ✓ μικροί, επιμήκεις 2. -	-	1. - 2. περιορισμένα	Έξω φλοιός
	1. Δ.δ. 2. ✓	1. Δ.δ. 2. -	-	1. Δ.δ. 2. περιορισμένα	Έσω φλοιός
	1. - 2. -	1. - 2. -	-	1. - 2. εκτεταμένα	Χείλη πλευράς
Χοίροι	-	✓ ευμεγέθεις, επιμήκεις	-	-	Έξω φλοιός
	-	✓ ευμεγέθεις, ακανόνιστοι, λοξοί	-	εκτεταμένα	Έσω φλοιός
	-	κυκλικοί, ελλειψοειδείς, επιμήκεις	-	εκτεταμένα	Χείλη πλευράς
Σκύλοι	✓	κυκλικοί, ευμεγέθεις, επιμήκεις, λοξοί	-	εκτεταμένα	Έξω φλοιός
	✓	ελλειπτικοί, ωοειδείς, λοξοί	-	εκτεταμένα	Έσω φλοιός
	-	ελλειπτικοί, επιμήκεις	-	εκτεταμένα	Χείλη πλευράς
Γάτες	✓	ευμεγέθεις, ακανόνιστοι, λοξοί (1 άτομο)	-	εκτεταμένα	Έξω φλοιός
	-	μεμονωμένοι, ευμεγέθεις, λοξοί	-	εκτεταμένα	Έσω φλοιός
	-	-	-	εκτεταμένα	Χείλη πλευράς
Άνθρωπος	✓	-	-	εκτεταμένα	Έξω φλοιός
	-	-	-	περιορισμένα	Έσω φλοιός
	-	μεσαίου μεγέθους, ωοειδείς, λοξοί	✓	εκτεταμένα, περιορισμένα	Χείλη πλευράς

6.5.1. Δοκιδώδες οστό

Η διάκριση του είδους των θηλαστικών εκ των οποίων τα ιστοτεμάχια πλευρών παρουσίασαν δοκιδώδες οστό δεν υπήρξε ιδιαίτερα προβληματική. Η συναξιολόγηση ορισμένων ποιοτικών ιστολογικών χαρακτηριστικών, όπως η έκταση που καταλαμβάνει ο δοκιδώδης οστίτης ιστός, η παρουσία δευτερογενούς οστίτη ιστού και η πυκνότητα των οστεώνων, το σχήμα και η κατεύθυνση των αγγειακών σωλήνων στον ιστό ήταν αρκετή για την επιτυχή ταυτοποίηση των ιστοτεμαχίων των ανήλικων αιγοπροβάτων, των βοοειδών και των χοίρων που εξετάστηκαν.

Συμπερασματικά, τα ιστοτεμάχια των αιγοπροβάτων παρουσίασαν εκτεταμένη και σχεδόν αποκλειστική εναπόθεση δοκιδώδους οστού στο σύνολο της επιφάνειας του ιστού, ενώ εκείνα των βοοειδών και των χοίρων διέθεταν επιπλέον εκτεταμένα στρώματα συμπαγούς οστού. Τα ιστοτεμάχια των βοοειδών διέθεταν περιοχές δευτερογενούς οστίτη ιστού στα μεσαία και εσωτερικά στρώματα του ιστού με διάσπαρτους και ανά περιοχές πυκνότερους δευτερογενείς οστεώνες, καθώς και ευμεγέθεις και ακανόνιστους αγγειακούς σωλήνες στα εξωτερικά στρώματα. Αντιθέτως, τα ιστοτεμάχια των χοίρων εμφάνισαν ολιγάριθμους μεμονωμένους δευτερογενείς οστεώνες στα εσωτερικά στρώματα και πολυάριθμους ευμεγέθεις, κυκλικούς, ακανόνιστους, επιμήκεις και λοξής κατεύθυνσης αγγειακούς σωλήνες σε όλη σχεδόν την έκταση του ιστού (Εικόνα 112).



Εικόνα 112. Ιστολογικά παρασκευάσματα αφυδατωμένου οστίτη ιστού πλευρών προερχόμενες από σφάγια: Α: αιγοπροβάτου, Β: βοοειδούς, C: χοίρου. Παρατηρούνται οι διαφορές στην έκταση της εναπόθεσης δοκιδώδους οστού και δευτερογενούς οστίτη ιστού στις περιοχές της συμπαγούς μούρας για κάθε είδος θηλαστικού. Π: περιοχή περιόστεου, Μ: μυελοχώροι, x50, χρώση H&E.

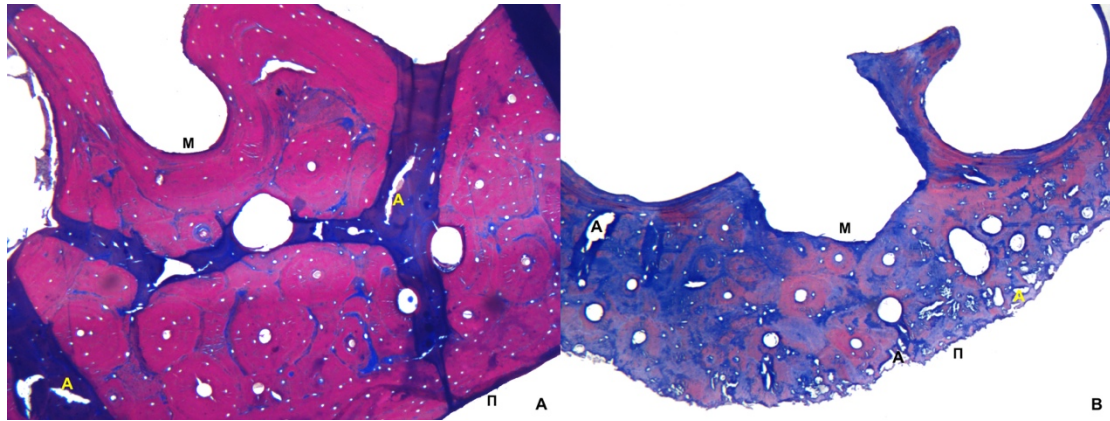
6.5.2. Δευτερογενής οστίτης ιστός

Η ιστολογική διάκριση του είδους των θηλαστικών εκ των οποίων τα οστικά ιστοτεμάχια παρουσίασαν αποκλειστικά δευτερογενή οστίτη ιστό εμφάνισε υψηλότερη δυσκολία. Απαραίτητη ήταν η προσεκτική συναξιολόγηση των ποιοτικών ιστολογικών χαρακτηριστικών και των διαφορών τους τόσο μεταξύ των ειδών όσο και μεταξύ των φλοιών των ιστοτεμαχίων των πλευρών των σκύλων, των γατών και του ενήλικου αιγοπροβάτου που εξετάστηκαν.

Από τον οστίτη ιστό των πλευρών των παραπάνω θηλαστικών, εκείνος που προερχόταν από σκύλο ήταν ο μόνος που εμφάνισε εκτεταμένο μη αγγειώδη οστίτη ιστό με μεμονωμένους διάσπαρτους οστεώνες στην περιοχή του έξω φλοιού. Αντιθέτως, στον έξω φλοιό των γατών και του αιγοπροβάτου εντοπίστηκαν δευτερογενείς οστεώνες πυκνής οργάνωσης.

Η ποιοτική ιστολογική διαφοροποίηση μεταξύ των ιστοτεμαχίων προερχόμενα από αιγοπρόβατο και γάτες μπόρεσε να στηριχθεί στην οργάνωση και στα χαρακτηριστικά των δευτερογενών οστεώνων. Συμπερασματικά, ο οστίτης ιστός του αιγοπροβάτου που εξετάστηκε διέθετε πυκνότερη οργάνωση οστεώνων και περιορισμένα διάμεσα συστήματα, ενώ εκείνος των γατών εμφάνιζε πολυάριθμους οστεώνες στον ιστό με ακανόνιστη οργάνωση και εκτεταμένα διάμεσα συστήματα. Ακόμη, στα ιστοτεμάχια προερχόμενα από γάτες οι οστεώνες εκτείνονταν ως τα εξωτερικά στρώματα του ιστού, ενώ στον ιστό του αιγοπροβάτου εντοπίστηκαν περιφερικά συστήματα μη αγγειώδους πεταλιώδους οστίτη ιστού.

Οι δευτερογενείς οστεώνες του αιγοπροβάτου εμφάνιζαν σχετικά σταθερό μέγεθος και πάντα εμφανή τη γραμμή οστεοποίησης στην περιφέρειά τους, ενώ εκείνοι των γατών εμφάνιζαν διαφορετικά μεγέθη και δεν ήταν πάντα εμφανής η γραμμή οστεοποίησης. Το μέγεθος των Αβέρσειων σωλήνων των οστεώνων των αιγοπροβάτων κυμαίνονταν από μικρό έως μεσαίο, ενώ οι Αβέρσειοι σωλήνες των οστεώνων των γατών εμφανίζονταν από πολύ μικροί έως μεγάλοι (Εικόνα 113).



Εικόνα 113. Ιστολογικά παρασκευάσματα αφυδατωμένου οστίτη ιστού πλευρών A: ενήλικου αιγοπροβάτου, B: γάτας. Παρατηρούνται οι διαφορές στο μέγεθος των οστεώνων και των Αβέρσειων σωλήνων, καθώς και η ευκρίνεια των γραμμών οστεοποίησης. Ακόμη, παρατηρείται περιφερικός μη αγγειώδης οστίτης ιστός έσω του περίστευου στον οστίτη ιστό του αιγοπρόβατου. Π: περιοχή περίστευου, Μ: μυελοχώροι Α: artifact, x50, χρώση: Masson's trichrome.

Υψηλή δυσκολία στην ιστολογική διάκριση μεταξύ των οστών σκύλου και γάτας θα προέκυπτε αν διασωζόταν αποκλειστικά ο έσω φλοιός των ιστοτεμαχίων, καθώς παρατηρήθηκαν περιοχές με κοινά ιστολογικά χαρακτηριστικά: Το πάχος του ιστού ήταν παρόμοιο και στα δύο είδη, τα διάμεσα συστήματα ήταν εκτεταμένα, οι οστεώνες εμφάνιζαν κοινές διαστάσεις, μη ευδιάκριτες γραμμές οστεοποίησης και επιμήκεις Αβέρσειους σωλήνες των οποίων το μέγεθος κυμαίνονταν από μικρό έως μεγάλο. Τα ιστολογικά σημεία διαφοροποίησης που παρατηρήθηκαν, ήταν η εντόπιση ενός λεπτού στρώματος μη αγγειώδους πεταλιώδους οστίτη ιστού στα περιμυελικά συστήματα του ιστοτεμαχίου της γάτας και η απουσία αυτού σε εκείνα του σκύλου, και ενός λεπτού στρώματος μη αγγειώδους πεταλιώδους οστίτη ιστού στα περιφερικά συστήματα του ιστοτεμαχίου του σκύλου και η απουσία αυτού σε εκείνα της γάτας. (Εικόνα 114).



Εικόνα 114. Ιστολογικά παρασκευάσματα αφαλατωμένου οστίτη ιστού έσω φλοιού γατών και σκύλων. A: γάτα: παρατηρείται το περιμελικό σύστημα μη αγγειώδους πεταλιώδους οστίτη ιστού, x100. B: σκύλος: παρατηρείται το περιφερικό σύστημα μη αγγειώδους πεταλιώδους οστίτη ιστού, x100. C: γάτα: Παρατηρείται η έντονη καμπυλότητα του φλοιού, x50. D: σκύλος: Παρατηρείται η έλλειψη καμπυλότητας του φλοιού, x50. Π: περιοχή περιόστεου, Μ: μυελοχώροι, χρώση Η&Ε.

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι οι εγκάρσιες ιστολογικές τομές των πλευρών προερχόμενες από γάτες διαφοροποιούνται μακροσκοπικά από τα υπόλοιπα είδη, εξαιτίας του μικρού τους μεγέθους, καθώς και του απόλυτα κυκλικού σχήματος που διέθεταν. Επομένως, αν διασώζεται οστέινο μικροτεμάχιο πλευράς, μεγέθους ικανού για να αποκαλύψει την υψηλή της καμπυλότητα, το εύρημα αυτό μπορεί να συναξιολογηθεί για την αναγνώριση της προέλευσής του από γάτα.

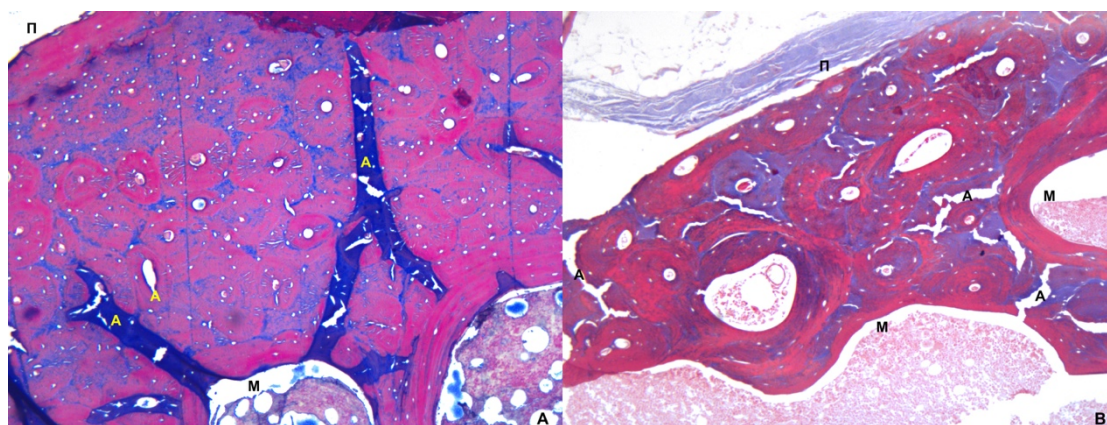
6.5.3. Αναγνώριση ανθρώπινης προέλευσης

Για την αναγνώριση της ανθρώπινης προέλευσης του δευτερογενούς οστίτη ιστού έχει προταθεί από ερευνητές ότι οι δευτερογενείς οστεάνες του οστίτη ιστού των ανθρώπων εμφανίζουν περισσότερο κυκλικό σχήμα, μεγαλύτερο μέγεθος και περισσότερο ακανόνιστη οργάνωση σε σχέση με εκείνους που εντοπίζονται στον οστίτη ιστό άλλων

θηλαστικών [8,66]. Ακόμη, έχει παρατηρηθεί ότι οι Αβέρσειοι σωλήνες των ανθρώπινων οστεώνων φέρονται επιμήκως στον ιστό, ενώ εκείνοι που εντοπίζονται στους οστεώνες των ζώων συχνά εμφανίζουν λοξή πορεία [3].

Στον οστίτη ιστό της ανθρώπινης πλευράς που συμπεριλήφθηκε στη μελέτη παρατηρήθηκαν δευτερογενείς οστεώνες οι οποίοι, σε συμφωνία με τις παραπάνω αναφορές, διέθεταν περισσότερο ακανόνιστη οργάνωση στον ιστό σε σχέση με τους οστεώνες που παρατηρήθηκαν στον οστίτη ιστό του ενήλικου αιγοπροβάτου, των σκύλων και των γατών. Οι περισσότεροι δευτερογενείς οστεώνες εμφάνιζαν κοινά μεγέθη με εκείνους των λοιπών θηλαστικών, αλλά εντοπίστηκαν ορισμένοι οι οποίοι διέθεταν σαφώς μεγαλύτερο μέγεθος. Αναφορικά με το σχήμα των οστεώνων και της κατεύθυνσης των Αβέρσειων σωλήνων, τα ευρήματα της μελέτης δεν συμφωνούν με τα ευρήματα των μελετών που έχουν προηγηθεί [3,8,66]. Συγκεκριμένα, ενώ παρατηρήθηκαν δευτερογενείς οστεώνες κυκλικού σχήματος και Αβέρσειοι σωλήνες επιμήκως κατεύθυνσης, η εντόπιση εκείνων που διέθεταν ελλειπτικό ή ωοειδές σχήμα και Αβέρσειους σωλήνες λοξής πορείας στον ιστό ήταν συχνότερη συγκριτικά με τα υπόλοιπα θηλαστικά.

Η ακανόνιστη οργάνωση των δευτερογενών οστεώνων, τα εκτεταμένα διάμεσα συστήματα, καθώς και το μεγαλύτερο μέγεθος των Αβέρσειων σωλήνων που παρατηρήθηκαν στον οστίτη ιστό της ανθρώπινης πλευράς, ήταν ικανά ιστολογικά χαρακτηριστικά για τη διαφοροποίηση του ανθρώπινου οστίτη ιστού από τον υψηλότερης οργάνωσης οστίτη ιστό πλευράς προερχόμενης από ενήλικο αιγοπρόβατο (Εικόνα 115).



Εικόνα 115. Ιστολογικά παρασκευάσματα αφαιρωμένου οστίτη ιστού πλευρών Α: ενήλικου αιγοπροβάτου, Β: ανθρώπου. Παρατηρούνται οι διαφορές στην οργάνωση των δευτερογενών οστεώνων, στο μέγεθος των Αβέρσειων σωλήνων και στην έκταση των διάμεσων συστημάτων. Π: περιοχή περιόστεου, Μ: μυελοχώροι Α: artifact, x50, χρώση Masson's trichrome.

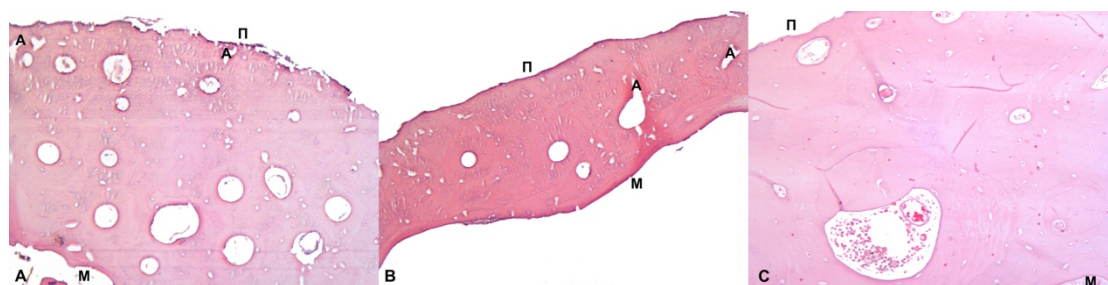
Η μεγάλη πιθανότητα λανθασμένης ταυτοποίησης των οστών σκύλων και γατών ως ανθρώπινα, βάση της μικροαρχιτεκτονικής του ιστού τους έχει αναφερθεί από συγγραφείς [4]. Πράγματι, ο οστίτης ιστός των σκύλων, των γατών και του ανθρώπου παρουσίασε αρκετά κοινά χαρακτηριστικά όπως, διάσπαρτους και ακανόνιστους οστεώνες, εκτεταμένα διάμεσα συστήματα και Αβέρσειους σωλήνες μικρού ως μεγάλου μεγέθους. Επιπλέον, ο έξω φλοιός της ανθρώπινης πλευράς και της πλευράς των σκύλων διέθετε περιοχές μη αγγειώδους οστίτη ιστού. Ακόμη ένα κοινό χαρακτηριστικό του ανθρώπινου οστίτη ιστού με εκείνον που προερχόταν από γάτες ήταν η ύπαρξη εκτεταμένων περιμυελικών συστημάτων μη αγγειώδους πεταλιώδους οστίτη ιστού.

Ωστόσο, εντοπίστηκαν ιστολογικά χαρακτηριστικά ικανά για να οδηγήσουν στην επιτυχή διαφοροποίηση του οστίτη ιστού του ανθρώπου από εκείνον των σκύλων. Συγκεκριμένα, ο αριθμός των δευτερογενών οστεώνων ανά πεδίο ιστού ήταν υψηλότερος, ειδικά στον έξω φλοιό της ανθρώπινης πλευράς και οι ανθρώπινοι οστεώνες διέθεταν μεγαλύτερο μέγεθος και ευκρινέστερες γραμμές οστεοποίησης από τους οστεώνες που εντοπίστηκαν στον οστίτη ιστό των σκύλων (Εικόνα 116). Επίσης, ο οστίτης ιστός του ανθρώπου, σε αντίθεση με εκείνον των σκύλων διέθετε εκτεταμένα περιμυελικά συστήματα μη αγγειώδους πεταλιώδους οστίτη ιστού. Αναφορικά με τις εκτεταμένες περιοχές μη αγγειώδους οστίτη ιστού που εντοπίστηκαν στον έξω φλοιό του ανθρώπου και των σκύλων, το μόνο χαρακτηριστικό που θα μπορούσε να βοηθήσει στη διάκριση μεταξύ των ειδών ήταν το ελαφρώς μεγαλύτερο πάχος του ιστού της ανθρώπινης πλευράς. Ωστόσο, για την ασφαλή ταυτοποίηση του είδους δεν αρκεί μόνο το μέγεθος της διαμέτρου του οστικού φλοιού [110].

Τα ιστολογικά χαρακτηριστικά που διέφεραν μεταξύ της ανθρώπινης πλευράς και των πλευρών των γατών ήταν η ύπαρξη εκτεταμένων περιοχών μη αγγειώδους οστίτη ιστού και περιοχών διάσπαρτων και ακανόνιστων δευτερογενών οστεώνων στον έξω φλοιό των ανθρώπων, σε αντίθεση με τον πυκνό και ακανόνιστο δευτερογενή οστίτη ιστό με δευτερογενείς οστεώνες που παρατηρήθηκε στον έξω φλοιό των γατών.

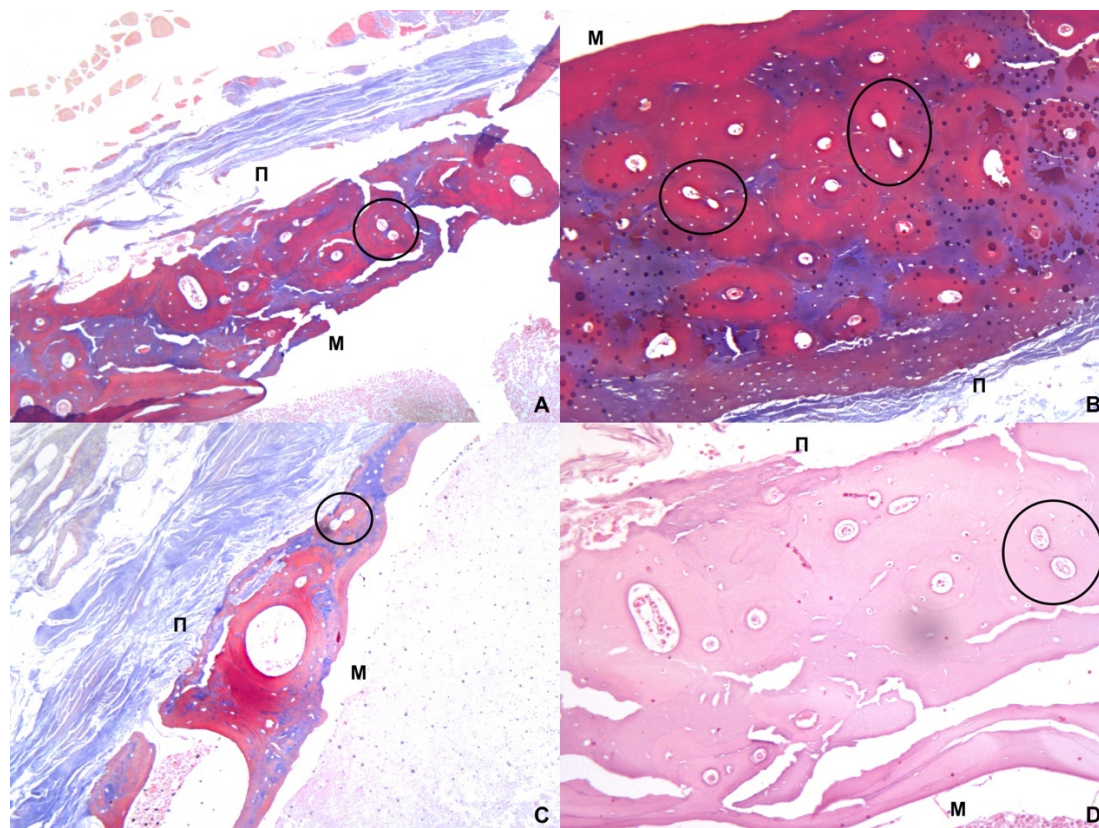
Ο οστίτης ιστός των σκύλων και των γατών διέθετε αρκετούς ευμεγέθεις κυκλικούς και ελλειπτικούς αγγειακούς σωλήνες οι οποίοι φέρονταν επιμήκως και λοξά στον ιστό. Αντιθέτως, οι σωληνωτές δομές του ανθρώπινου οστίτη ιστού που φέρονταν λοξά στον ιστό αποτελούσαν Αβέρσειους σωλήνες με εμφανή τα οστέινα πετάλια και τις γραμμές οστεοποίησης στην περιφέρεια των οστεώνων (Εικόνα 116). Τα οστέινα πετάλια και οι γραμμές οστεοποίησης των οστεώνων ήταν σαφώς πιο ευδιάκριτα στον οστίτη ιστό

προερχόμενο από ανθρώπινη πλευρά. Ωστόσο, εντοπίστηκαν θέσεις δευτερογενούς οστίτη ιστού σε ιστολογικές τομές πλευρών γάτας, όπου οι γραμμές οστεοποίησης διακρίνονταν με υψηλή ευκρίνεια. Στο σύνολό τους, οι δευτερογενείς οστεώνες του ανθρώπινου οστίτη ιστού είχαν μεγαλύτερο μέγεθος από τους δευτερογενείς οστεώνες των άλλων δύο θηλαστικών και ο ιστός, στις περισσότερες θέσεις, εμφάνιζε μεγαλύτερη διάμετρο.



Εικόνα 116. Ιστολογικά παρασκευάσματα αφαλατωμένου οστίτη ιστού έξω φλοιού πλευρών Α: γάτας, Β: σκύλου, C: ανθρώπου. Παρατηρούνται οι διαφορές στην πυκνότητα των οστεώνων στον ιστό, στο μέγεθος των οστεώνων και στην ευκρίνεια των γραμμών οστεοποίησης στην περιφέρειά τους. Στον ανθρώπινο οστίτη ιστό παρατηρείται επιπλέον ένας ευμεγέθους Αβέρσειος σωλήνας ακανόνιστου σχήματος, ο οποίος φέρει ευδιάκριτα οστέινα πετάλια στην περιφέρειά του. Π: περιοχή περιόστεου, Μ: μυελοχώροι Α: artifact, x100, χρώση H&E

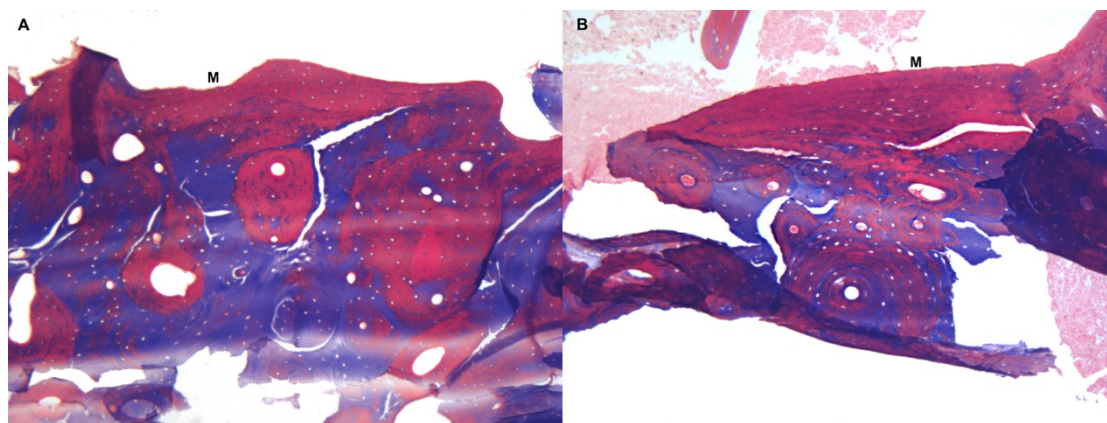
Τέλος, χαρακτηριστικό εύρημα που αφορούσε στον ιστό των ανθρώπινων πλευρών ήταν η παρουσία ενός τύπου ΙΙ-ένθετου οστεώνα και δύο τύπου ΙΙΙ-οστεώνων διπλής ζώνης, καθώς και οστεώνων που γειτνιάζαν στενά σε δυάδες. Το τελευταίο εύρημα ήταν πιο ευδιάκριτο στις κεχρωσμένες με τρίχρωμη Masson ιστολογικές τομές εξαιτίας της υψηλής χρωματικής αντίθεσης, αλλά η εντόπισή του ήταν δυνατή και σε ιστολογικές τομές κεχρωσμένες με αιματοξυλίνη/ηωσίνη έπειτα από προσεκτική παρατήρηση (Εικόνα 117).



Εικόνα 117. Ιστολογικά παρασκευάσματα αφαλατωμένου οστίτη ιστού ανθρώπινων πλευρών. Παρατηρούνται οι οστεώνες στενής γειτνίασης σε δυάδες (κύκλοι). Α, Β, C: x50, χρώση Masson's trichrome. D: x100, χρώση H&E. Π: περιοχή περιόστεου, Μ: μυελοχώροι

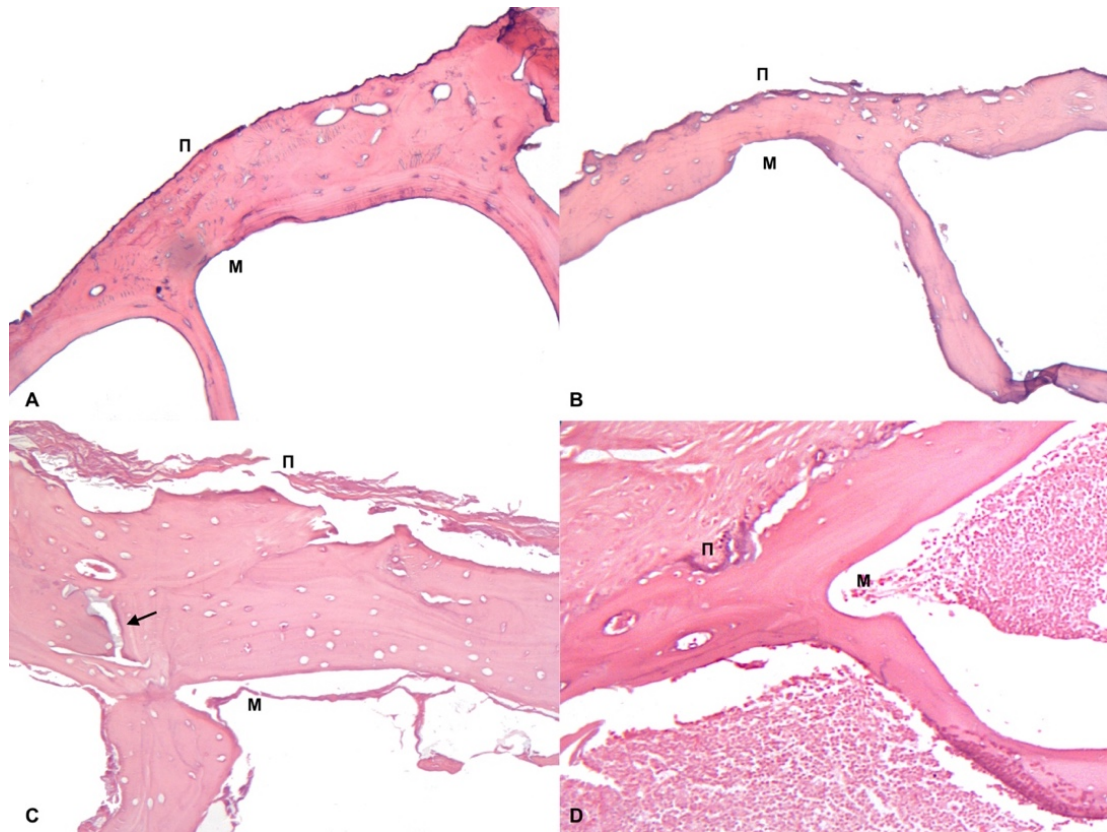
Έχει γίνει ήδη αναφορά στις ομοιότητες των ιστολογικών δομών που παρουσιάζει ο δευτερογενής οστίτης ιστός των ανθρώπων και των βοοειδών, όπως η πυκνή παρουσία των δευτερογενών οστεώνων, η ακανόνιστη οργάνωσή τους και η επιμήκης κατεύθυνση των Αβέρσειων σωλήνων στον ιστό [68]. Ακόμη, ερευνητές έχουν επιστήσει την προσοχή για τυχόν λανθασμένη ιστολογική ταυτοποίηση των οστών των βοοειδών, αλλά και των χοίρων ως ανθρώπινα σε περίπτωση απόσπασης του εξωτερικού στρώματος πλεγματοειδούς οστίτη ιστού του φλοιού εξαιτίας των ταφονομικών αλλοιώσεων [5,13].

Πράγματι, στα εσωτερικά στρώματα του ιστού των βόειων πλευρών εντοπίστηκαν περιοχές δευτερογενούς οστίτη ιστού με δευτερογενείς οστεώνες ακανόνιστης οργάνωσης και Αβέρσειους σωλήνες επιμήκους και λοξής κατεύθυνσης. Τα μεγέθη των δευτερογενών οστεώνων και των Αβέρσειων σωλήνων που παρατηρήθηκαν στις συγκεκριμένες θέσεις των ιστολογικών τομών ήταν κοινά για τα βοοειδή και τον άνθρωπο. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ένα εκτεταμένο στρώμα περιμυελικού μη αγγειώδους πεταλιώδους οστίτη ιστού και στα δύο είδη. Οι βασικές ιστολογικές διαφορές μεταξύ των ειδών ήταν η εντόπιση πρωτογενών οστεώνων και περισσότερο εκτεταμένων διάμεσων συστημάτων στο βόειο οστίτη ιστό και η ευκρινέστερη απεικόνιση των οστέινων πεταλιών και των γραμμών οστεοποίησης, σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη [3] στον ανθρώπινο οστίτη ιστό (Εικόνα 118).



Εικόνα 118. Ιστολογικά παρασκευάσματα τμημάτων αφαλατωμένου οστίτη ιστού προερχόμενα από A: πλευρά βοοειδούς, B: ανθρώπινη πλευρά. Παρατηρούνται οι ομοιότητες όπως, η εντόπιση δευτερογενούς οστίτη ιστού με δευτερογενείς οστεώνες και μη αγγειώδους πεταλιώδους οστίτη ιστού στα περιμυελικά συστήματα. Επίσης, εντοπίζονται οι διαφορές στις ιστολογικές δομές, όπως η ύπαρξη πρωτογενών οστεώνων στον οστίτη ιστό βοοειδούς και η ευκρινέστερη απεικόνιση των οστέινων πεταλιών και των γραμμών οστεοποίησης στον ανθρώπινο οστίτη ιστό. M: μυελοχώροι, x50, χρώση Masson's trichrome.

Αντιθέτως, τα ιστοτεμάχια πλευρών που ανήκαν σε χοίρους δεν παρουσίασαν περιοχές εκτεταμένου δευτερογενούς οστίτη ιστού που θα μπορούσαν να οδηγήσουν στη λανθασμένα ανθρώπινη ταυτοποίησή τους. Ωστόσο, εντοπίστηκαν περιοχές μη αγγειώδους οστίτη ιστού τόσο στο φλοιό της πλευράς χοίρου, όσο και της ανθρώπινης πλευράς όπου η διαφοροποίηση των ειδών υπήρξε προβληματική. Εκτός από το μεγαλύτερο πάχος του οστικού φλοιού του χοίρου, οι ιστολογικές δομές που παρατηρήθηκαν και οδήγησαν στον αποκλεισμό της ανθρώπινης προέλευσης της πλευράς ήταν οι κενοτοπιώδεις περιοχές ασβεστοποιημένου χόνδρου. Ελλείπει αυτού του χαρακτηριστικού, η διάμετρος του οστικού φλοιού δεν είναι αρκεί για την ασφαλή ταυτοποίηση του είδους [110] (Εικόνα 119).



Εικόνα 119. Ιστολογικά παρασκευάσματα τμημάτων αφαιρωμένου οστίτη ιστού προερχόμενα από Α: πλευρά γάτας, Β: πλευρά σκύλου, C: πλευρά χοίρου, D: ανθρώπινη πλευρά. Το μόνο ιστολογικό χαρακτηριστικό που θα μπορούσε να αποκλείσει την ανθρώπινη προέλευση στον οστίτη ιστό του νεαρού σφάγιου χοίρου (C) είναι η περιοχή του ασβεστοποιημένου χόνδρου (βέλος). Επίσης παρατηρείται ότι ο ανθρώπινος οστίτης ιστός της περιοχής διαθέτει λιγότερα οστικά βοθρία. Ελλείπει, όμως των ιστολογικών δομών δεν είναι δυνατή η ιστολογική διαφοροποίηση των ειδών. Π: περιοχή περιώστεου, Μ: μυελοχώροι x100, χρώση H&E.

7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Για την αφαλάτωση των ιστοτεμαχίων που προέρχονταν από πλευρές χοίρων, αιγοπροβάτων, σκύλων και γατών η βέλτιστη συγκέντρωση του υδατικού διαλύματος νιτρικού οξέος ήταν 5%, ενώ για εκείνα που προέρχονταν από πλευρές βοοειδών ήταν 10%. Ο χρόνος που μεσολάβησε ως το τελικό σημείο αφαλάτωσης ήταν διαφορετικό για κάθε είδος θηλαστικού και διέφερε επιπλέον μεταξύ των ατόμων του ίδιου είδους.
2. Για τη συγκριτική μελέτη των ποιοτικών ιστολογικών χαρακτηριστικών του οστίτη ιστού θηλαστικών η αιματοξυλίνη-ηωσίνη αποτελεί μια χρώση που αποδίδει ιστολογικές εικόνες ικανοποιητικής/υψηλής διαγνωστικής αξίας. Η τρίχρωμη χρώση Masson μπορεί να εφαρμόζεται επικουρικά για την ευκρινέστερη αποτύπωση των οστέινων πεταλίων και των ορίων των δευτερογενών οστεώνων.
3. Η πλειονότητα των ιστολογικών τομών πλευρών βοοειδών, αιγοπροβάτων και χοίρων προέρχονταν από νεαρά σφάγια και εμφάνισαν δοκιδώδες οστό. Οι διαφορές που αφορούσαν στην έκταση που καταλάμβανε το δοκιδώδες οστό στον ιστό, το σχήμα και το μέγεθος των μυελοχώρων και των αγγειακών σωλήνων, η εναπόθεση και η έκταση του δευτερογενούς οστίτη ιστού στον ιστό ήταν ικανές για την ποιοτική ιστολογική διαφοροποίηση των ειδών των θηλαστικών στα ιστολογικά παρασκευάσματα που εξετάστηκαν.
4. Υψηλότερη δυσκολία εμφάνισε η ποιοτική ιστολογική διαφοροποίηση μεταξύ των ιστολογικών τομών των πλευρών ενήλικου αιγοπροβάτου, σκύλων και γατών καθώς εμφάνιζαν δευτερογενή οστίτη ιστό με Αβέρσεια συστήματα. Η συναξιολόγηση των ιστολογικών χαρακτηριστικών που εμφάνιζε ο έξω και ο έσω φλοιός κάθε είδους, όπως η εντόπιση μη αγγειώδους πεταλιώδους οστίτη ιστού, η οργάνωση των δευτερογενών οστεώνων στον ιστό, η έκταση των διάμεσων συστημάτων, το μέγεθος των οστεώνων και των Αβέρσειων σωλήνων, καθώς και της καμπυλότητας των πλευρών οδήγησε στην ποιοτική ιστολογική διαφοροποίηση των ειδών των θηλαστικών στα ιστολογικά παρασκευάσματα που εξετάστηκαν.
5. Τα ιστολογικά παρασκευάσματα της ανθρώπινης πλευράς εμφάνισαν αρκετά κοινά ιστολογικά χαρακτηριστικά με εκείνα των θηλαστικών που διέθεταν δευτερογενή οστίτη ιστό. Η συναξιολόγηση των ιστολογικών χαρακτηριστικών που εμφάνιζε ο έξω και ο έσω φλοιός, όπως η εντόπιση μη αγγειώδους πεταλιώδους οστίτη ιστού,

η οργάνωση των δευτερογενών οστεώνων στον ιστό, η έκταση των διαμέσων συστημάτων, το μέγεθος των οστεώνων και των Αβέρσειων σωλήνων και επιπλέον ο εντοπισμός οστεώνων τύπου II, τύπου III, οστεώνων στενής γειτνίασης σε δυάδες και η ευκρινέστερη απεικόνιση των οστέινων πεταλίων και των γραμμών οστεοποίησης στους ανθρώπινους οστεώνες μπόρεσαν να οδηγήσουν στην ποιοτική ιστολογική διαφοροποίηση της ανθρώπινης πλευράς από εκείνες των ζώων στα ιστολογικά παρασκευάσματα που εξετάστηκαν.

6. Σε περίπτωση ανεύρεσης οστικού μικροτεμάχιου που εμφανίζει αποκλειστικά μη αγγειώδη οστίτη ιστό, το είδος του θηλαστικού εκ του οποίου προήλθε δεν είναι δυνατόν να ταυτοποιηθεί επιτυχώς με ιστολογικές μεθόδους.
7. Τα αποτελέσματα της αρχικής αυτής μελέτης παρόλο που είναι ενθαρρυντικά, προέκυψαν έπειτα από την παρατήρηση μικρού αριθμού δειγμάτων οστίτη ιστού πλευρών. Θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως οδηγός για την ποιοτική ιστολογική διερεύνηση αφαλατωμένων μικροτεμαχίων οστών άγνωστης προέλευσης με σκοπό την ταυτοποίηση του είδους, αλλά είναι απαραίτητη η ιστολογική ανάλυση μεγαλύτερου μεγέθους δείγματος για την ασφαλέστερη εξαγωγή συμπερασμάτων. Το μεγαλύτερο μέγεθος δείγματος θα επέτρεπε επιπλέον την εφαρμογή ιστομορφομετρικής ανάλυσης των ιστολογικών δομών σε περίπτωση επισφαλών συμπερασμάτων από την ποιοτική σύγκριση των ιστολογικών χαρακτηριστικών μεταξύ των ειδών. Τέλος, σε μελλοντικές συγκριτικές ιστολογικές μελέτες μεταξύ ανθρώπινων και ζωικών οστών θα ήταν σκόπιμο να συμπεριληφθούν τεμάχια από διαφορετικά οστά του σκελετού, καθώς και από ανήλικους ανθρώπους, όπου υπάρχει αυτή η δυνατότητα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] S. N. Byers, «Εισαγωγή στη Δικαστική Ανθρωπολογία (3^η Έκδ.)», Κ. Μωραΐτης και Χ. Σπηλιοπούλου (Μτφρ./Επ.), Αθήνα, Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου, 2011.
- [2] J. J. Schultz, «Determining the Forensic Significance of Skeletal Remains» σε *A Companion to Forensic Anthropology*, D.C. Dirkmaat (Επ.), West Sussex, U.K., Blackwell Publishing Ltd., κεφ. 3, σελ. 66-84, 2012.
- [3] J. P. Morales, I. Roa H, D. Zavando και I. Suazo Galdames, «Determination of the species from skeletal remains through histomorphometric evaluation and discriminant analysis» σε *International Journal of Morphology*, τόμ. 30, σελ. 1035-1041, 2012.
- [4] S. Stout και C. Crowder, «Bone histology - An anthropological perspective (1^η Έκδ.)», Boca Raton, CRC Press, 2011.
- [5] M. Cummaudo, A. Cappella και F. Giacomini, «Histomorphometric analysis of osteocyte lacunae in human and pig: Exploring its potential for species discrimination» σε *International Journal of Legal Medicine*, τόμ. 133, σελ. 711-718, 2019.
- [6] D. C. Dirkmaat (Επ.), G. O. Olson, A. R. Klales και S. Getz «The role of forensic anthropology in the recovery and interpretation of the fatal-fire victim» σε *A Companion to Forensic Anthropology*, West Sussex, U.K., Blackwell Publishing Ltd., κεφ.6, σελ. 113-135, 2012.
- [7] A. A. Biewener, «Biomechanics of mammalian terrestrial locomotion» σε *Science*, τόμ. 250, σελ. 1097-1103, 1990 .
- [8] S. Pfeiffer, «Cortical bone histology in juveniles» σε *Microscopic Examinations of Bioarchaeological Remains, Keeping a Close Eye on Ancient Tissues*, Toronto, σελ. 15-28, 2006.
- [9] B. J. Adams και P. J. Crabtree, «Comparative skeletal anatomy: A Photographic Atlas for Medical Examiners, Forensic Anthropologists, and Archaeologists (1^η Έκδ.)», Totowa, N.J, Humana Press, 2008.
- [10] T. O. Connor, «The archaeology of animal bones», Great Britain, Sutton Publishing, 2000.
- [11] D. L. France, «Human and nonhuman bone identification: A color atlas (1^η Έκδ.)», U.S., CRC Press, 2009.

- [12] M. Cummaudo, A. Cappella, M. Biraghi, C. Raffone, N. Marquez-Grant και C. Cattaneo, «Histomorphological analysis of the variability of the human skeleton: Forensic implications» σε *International Journal of Legal Medicine*, τόμ. 132, σελ. 1493-1503, 2018.
- [13] G. Caccia, F. Magli, V. Tagi, D. Porta, M. Cummaudo, N. Márquez-Grant και C. Cattaneo, «Histological determination of the human origin from dry bone: A cautionary note for subadults» σε *International Journal of Legal Medicine*, τόμ. 130, σελ. 299-307, 2016.
- [14] C. Cattaneo, D. Porta, D. Gibelli και C. Gamba, «Histological determination of the human origin of bone fragments» σε *Journal of Forensic Science*, τόμ. 54, σελ. 531-533, 2009.
- [15] A. Crescimanno και S. D. Stout, «Differentiating fragmented human and nonhuman long bone using osteon circularity» σε *Journal of Forensic Sciences*, τόμ. 57, σελ. 287-294, 2012.
- [16] Ι. Ν. Μάγρα, «Εμβρυολογία των κατοικίδιων θηλαστικών», Θεσσαλονίκη, Εκδοτικός οίκος Αδελφών Κυριακίδη, 2004.
- [17] Α. Σμοκοβίτης, «Φυσιολογία (1^η Έκδ.)», Θεσσαλονίκη, Εκδοτικός οίκος Αδελφών Κυριακίδη, 2007.
- [18] Σ. Μιχαήλ, «Ιστολογία (2^η Έκδ.)», Θεσσαλονίκη, Εκδοτικός οίκος Αδελφών Κυριακίδη, 2004.
- [19] Μ. Ε. Miller και Η. Evans, «Anatomy of the dog», Philadelphia, W. B. Saunders Company, 1964.
- [20] Ε. Aughey και F. L. Frye, «Comparative veterinary histology with clinical correlates, (1^η Έκδ.)», London, Manson Pub Veterinary Press, 2001.
- [21] J. A. Eurell και Β. L. Frappier, «Dellmann's textbook of veterinary histology, (6^η Έκδ.)», Wiley-Blackwell, 2006.
- [22] Β. Young, G. O'Dowd και P. Woodford, «Wheater's functional histology: A text and colour atlas (6^η Έκδ.)», Philadelphia, Elsevier, Churchill Livingstone, 2013.
- [23] Η. Francillon-Vieillot, V. de Buffrénil, J. Castanet, J. Géraudie, F. Meunier, J. Sire, L. Zylberberg και Α. de Ricqlès, «Microstructure and mineralization of vertebrate skeletal tissues» σε *Skeletal Biomineralization: Patterns, Processes and Evolutionary Trends, Volume 5*, J.G. Carter (Επ.), σελ. 175-234,

- Washington, D.C., American Geophysical Union: Short Courses in Geology, 1989.
- [24] Γ. Κανακούδης, «Κινητικό και ενδοκρινικό σύστημα» σε *Ειδική παθολογική ανατομική των κατοικιδίων ζώων*, Τεύχος Γ', Θεσσαλονίκη, Σύγχρονη Παιδεία, 1998.
- [25] H. M. Frost, «From Wolff's Law to the Utah paradigm: Insights about bone physiology and its clinical applications» σε *The Anatomical Record*, τόμ. 262, σελ. 398-419, 2001.
- [26] R. B. Martin, D. B. Burr, N. A. Sharkey και David P. Fyhrie, «Skeletal Tissue Mechanics (6^η Έκδ.)», New York, Springer, 2015.
- [27] D. J. Hadjidakis και I. I. Androulakis, «Bone remodeling» σε *Annals New York Academy Of Sciences*, τόμ. 1092, σελ. 385-396, 2006.
- [28] G. Dhanjoo, S. Fan και K. Rama Krishna, «The Human lumbar vertebral body as an intrinsic, functionally optimal structure» σε *International Journal of Design and Nature*, τόμ. 1, σελ. 34-47, 2007.
- [29] A. L. Mescher, «Junqueira's basic histology text and atlas (14^η Έκδ.)», McGraw-Hill Education, Multiple Cities, 2016.
- [30] Σ. Μιχαήλ, «Συγκριτική ανατομική των κατοικιδίων θηλαστικών (2^η Έκδ.)», Θεσσαλονίκη, Εκδοτικός οίκος Αδελφών Κυριακίδη, 1985.
- [31] S. H. Patel και K. Murphy, «Fractures of the proximal femur: Correlates of radiological evidence of osteoporosis» σε *Skeletal Radiology*, τόμ. 35, σελ. 202-211, 2006.
- [32] Σ. Δ. Βαλάκος και Σ. Παπαβασιλείου, «Φυσική Ανθρωπολογία - Εργαστηριακός οδηγός», Αθήνα, ΕΚΠΑ, 2012.
- [33] J. G. Betts, K. A. Young, J. A. Wise, E. Johnson, B. Poe, D. H. Kruse, O. Korol, J. E. Johnson, M. Womble και P. DeSaix «Anatomy and Physiology», Houston, Texas, OpenStax, 2013.
- [34] S. W. Verbruggen, «Mechanobiological origins of osteoporosis», National University of Ireland, Galway, 2013.
- [35] E. Watson και R. H. Adams, «Biology of bone: The vasculature of the skeletal system» σε *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, τόμ. 8(7):a031559, 2018.

- [36] P. Takizawa, «Histology at Yale», Yale school of medicine, [Ηλεκτρονικό]. Available: http://medcell.med.yale.edu/histology/bone_lab.php. Προσπέλαση: 1/5/2020.
- [37] X. Feng και S. L. Teitelbaum, «Osteoclasts: New Insights» σε *Bone research*, τόμ. 1, pp. 11-26, 2013.
- [38] T. R. A. Dempster και W. David, «Perspectives protons and osteoclasts» σε *Journal Of Bone And Mineral Research*, τόμ. 5, σελ. 1099-1103, 1990.
- [39] N. Udagawa, N. Takahashi, H. Yasuda, A. Mizuno, K. Itoh, Y. Ueno, T. Shinki, M. Gillespie, T. Martin, K. Higashio και T. Suda, «Osteoprotegerin produced by osteoblasts Is an Important regulator in osteoclast development and function» σε *Endocrinology*, τόμ. 141, σελ. 3478-3484, 2000.
- [40] P. G. Robey, «Noncollagenous Bone Matrix Proteins» σε *Principles of Bone Biology* (3^η Έκδ.), J. P. Bilezikian, L. G. Raisz and T. J. Martin (Επ.), Cambridge, Massachusetts, Academic Press, κεφ. 17, σελ. 335-349, 2008.
- [41] Χ. Γιαννακόπουλος και Γ. Λυρίτης, «Η αγγείωση των μακρών οστών: Ανατομική περιγραφή και ρύθμιση της οστικής κυκλοφορίας» σε *Οστών: Έκδοση της Ελληνικής Εταιρείας Μελέτης Μεταβολισμού των Οστών*, τόμ. 16, σελ. 90-103, 2005.
- [42] S. Cowin και L. Cardoso, «Blood and interstitial flow in the hierarchical pore space architecture of bone tissue» σε *Journal of Biomechanics*, τόμ. 48, σελ. 842-854, 2014.
- [43] R. Swenson, «Histology & Pathology», Geisel School of Medicine at Dartmouth Department of Medical Education, [Ηλεκτρονικό]: https://www.dartmouth.edu/~anatomy/Histo/lab_2/bone/DMS068/popup.html. Προσπέλαση: 3/5/2020.
- [44] Y. Clermont, M. Lalli και Z. Bencsath-Makkai, «Light-microscopic histology atlas», 2013. [Ηλεκτρονικό]: http://audilab.bmed.mcgill.ca/HA/html/bc_21_E.html. Προσπέλαση: 3/5/2020.
- [45] D. Enlow και S. Brown, «A comparative histological study of fossil and reserent bone tissues» σε *Texas Journal of Science*, τόμ. 8, σελ. 405-443, 1956.
- [46] A. Gunin, «Atlas of histology images», Histology for medical students, [Ηλεκτρονικό]: <http://www.histol.ru/atlas-en/connective-01-en.htm>. Προσπέλαση: 3/5/2020.

- [47] M. Ericksen, «Histologic estimation of age at death using the anterior cortex of the femur» σε *American Journal Of Physical Anthropology*, τόμ. 84, σελ. 171-179, 1991.
- [48] P. Spitalnik, «Histology Lab Manual», Columbia University Irving Medical Center, [Ηλεκτρονικό]:
<https://histologylab.ctl.columbia.edu/lab04/endochondral-ossification/>.
 Προσπέλαση: 4/5/2020
- [49] MS. Shih, «Bone histomorphometry and undecalcified sections» σε *Bone Pathology (2^η Έκδ.)*, J. S. Khurana (Ed.), Totowa, New Jersey, Humana Press, κεφ. 8, σελ. 129-138, 2009.
- [50] A. G. Robling και S. D. Stout, «Morphology of the drifting osteon» σε *Cells Tissues Organs*, τόμ. 164, σελ. 192-204, 1999.
- [51] M. de Boef Miara και H. C. E. Larsson, «Bone microstructure: Quantifying bone vascular orientation» σε *Canadian Journal of Zoology*, τόμ. 85, σελ. 63-70, 2007.
- [52] C. A. Moreira, D. W. Dempster και R. Baron, «Anatomy and ultrastructure of bone – histogenesis, growth and remodeling [Updated 2019 Jun 5]» σε Endotext [Internet], KR. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce (Ed.), South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.2000-. [Ηλεκτρονικό]:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279149/>.
- [53] L. J. Raggatt και N. C. Partridge, «Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling» σε *The Journal Of Biological Chemistry*, τόμ. 285, σελ. 25103-25108, 2010.
- [54] H. Frost, «Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 4. Mechanical influences on intact fibrous tissues» σε *The Anatomical Record*, τόμ. 226, σελ. 433-439 1990.
- [55] D. G. King, «Welcome to Histology at SIU SOM», Dept. of Anatomy & Dept. of Zoology, Southern Illinois University Carbondale, 2018. [Ηλεκτρονικό]:
<http://www.siumed.edu/%7Edking2/index.htm>. Προσπέλαση 10/5/2020
- [56] R. F. v. Oers, R. Ruimerman, E. Tanck, P. A. Hilbers και R. Huiskes, «A unified theory for osteonal and hemi-osteonal remodeling» σε *Bone*, τόμ. 42, σελ. 250-259, 2008.
- [57] H. Zhou, S. S. Lu και D. W. Dempster, «Bone remodeling: Cellular activities in bone» σε *Osteoporosis in Men (2^η Έκδ.)*, E. S. Orwoll, J. P. Bilezikian and

- D. Vanderschueren (Επ.), Cambridge, Massachusetts, Academic Press, κεφ. 2, σελ. 15-24, 2010.
- [58] L. Bonewald και G. Mundy, «Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling» σε *Clinical Orthopaedics and Related Research*, τόμ. 250, σελ. 261-276, 1990.
- [59] J. van Dijk, E. Gruys και J. Mouwen, «Color atlas of veterinary pathologie», Utrecht, Saunders Elsevier, 2006.
- [60] M. B. Schaffler και D. B. Burr, «Primate cortical bone microstructure: Relationship to locomotion» σε *American Journal Of Physical Anthropology*, τόμ. 65, σελ. 191-197, 1984.
- [61] C. M. Crowder, J. M. Andronowski και V. M. Dominguez, «Bone histology as an integrated tool in the process of human identification» σε *New perspectives in forensic human skeletal identification*, K. E. Latham, E. J. Bartelink και M. Finnegan (Επ.), Cambridge, Massachusetts, Academic Press, κεφ. 18, σελ. 201-213, 2018.
- [62] E. Schmid, «Atlas of animal bones», Amsterdam και New York, Elsevier Publishing Company, 1972.
- [63] A. M. Beisaw, «Identifying and interpreting animal bones- A Manual» σε *Texas A&M University Anthropology series, Volume 18*, Texas, Texas A&M University Press, 2013.
- [64] M. L. Hillier και L. S. Bell, «Differentiating human bone from animal bone: A review of histological methods» σε *Journal of Forensic Sciences*, τόμ. 52, σελ. 249-263, 2007.
- [65] J. M. Andronowski, C. Crowder και M. S. Martinez, «Recent advancements in the analysis of bone microstructure: New dimensions in forensic anthropology» σε *Forensic Sciences Research*, τόμ. 3, σελ. 278-293, 2018.
- [66] M. Martiniaková, B. Grosskopf, R. Omelka, M. Vondráková και M. Bauerová, «Differences among species in compact bone tissue microstructure of mammalian skeleton: Use of a discriminant function analysis for species identification» σε *Journal of Forensic Science*, τόμ. 51, σελ. 1235-1239, 2006.
- [67] V. Johnson, S. Beckett και N. Márquez-Grant, «Differentiating human versus non-human bone by exploring the nutrient foramen: implications for forensic

- anthropology» σε *International Journal of Legal Medicine*, τόμ. 131, σελ. 1757-1763, 2017.
- [68] A. G. F. M. Cuijpers, «Histological identification of bone fragments in Archaeology: Telling humans apart from horses and cattle» σε *International Journal of Osteoarchaeology*, τόμ. 16, σελ. 465-480, 2006.
- [69] S. R. Goodyear και R. M. Aspden, «Raman microscopy of bone» σε *Bone Research Protocols, Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 816, M. Helfrich, S. Ralston (Επ.), Totowa, NJ, Humana Press, σελ.527-534, 2012.
- [70] P. Matousek και M. D. Morris, «Emerging Raman applications and techniques in biomedical and pharmaceutical fields (1^η Έκδ.)», Berlin, Heidelberg, Springer, 2010.
- [71] Χ. Παπαγεωργοπούλου, Κ. Μωραΐτης, Ε. Νικήτα, Κ. Ηλιόπουλος και Ε. Βήκα, «Ειδικά θέματα σκελετικής ανθρωπολογίας, ταφονομίας και βιοαρχαιολογίας», Αθήνα, Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, 2015.
- [72] Shapiro, F. και J.Y. Wu, «Woven bone overview: structural classification based on its integral role in developmental, repair and pathological bone formation throughout vertebrate groups» σε *European Cells and Materials*, τόμ. 38, σελ. 137-167, 2019.
- [73] J. Skedros, S. Mendenhall, C. Kiser και H. Winet, «Interpreting cortical bone adaptation and load history by quantifying osteon morphotypes in circularly polarized light images» σε *Bone*, τόμ. 44, σελ. 392-403, 2009.
- [74] R. Genthial, E. Beaurepaire και M. Schanne-Klein, «Label-free imaging of bone multiscale porosity and interfaces using third-harmonic generation microscopy» σε *Scientific Reports 7:3419*, 2017.
- [75] L. S. Bell, «Forensic Microscopy for skeletal tissues. Methods and Protocols (1^η Έκδ.)», Totowa, NJ, Humana Press, 2012.
- [76] S. J. Jones και A. Boyde, «Scanning electron microscopy of bone: Instrument, specimen, and issues» σε *Microscopy Research And Technique*, τόμ. 33, σελ. 92-120, 1996.
- [77] J. G. Skedros, S. M. Sorensonb και N. H. Jenson, «Are distributions of secondary osteon variants useful for interpreting load history in mammalian bones?» σε *Cells Tissues Organs*, τόμ. 185, σελ. 285-307, 2007.

- [78] G. J. Maat, R. P. Van Den Bos και M. Aarents, «Manual preparation of ground sections for the microscopy of natural bone tissue: Update and modification of Frost's "Rapid Manual Method"» σε *International Journal of Osteoarchaeology*, τόμ. 11, σελ. 366-374, 2001.
- [79] M. D. Rohrer και C. C. Schubert, «The cutting-grinding technique for histologic preparation of undecalcified bone and bone-anchored implants» σε *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology*, τόμ. 74, σελ. 73-78, 1992.
- [80] J. G. García-Donas, A. Dalton, I. Chaplin και E. F. Kranioti, «A revised method for the preparation of dry bone samples used in histological examination: five simple steps» σε *Journal of Comparative Human Biology*, τόμ. 68, σελ. 283-288, 2017.
- [81] P. Beauchesne και S. Saunders, «A test of the revised Frost's "Rapid Manual Method" for the preparation of bone thin sections» σε *International Journal of Osteoarchaeology*, τόμ. 16, σελ. 82-87, 2006.
- [82] H. A. Yuehuei και K. L. Martin, «Handbook of histology methods for bone and cartilage», Totowa, NJ, Humana Press, 2003.
- [83] H. H. De Boer, M. J. Aarents και G. J. R. Maat, «Staining ground sections of natural dry bone tissue for microscopy» σε *International Journal of Osteoarchaeology*, τόμ. 22, σελ. 379-386, 2010.
- [84] M. Locke, «Structure of long bones in mammals» σε *Journal Of Morphology*, τόμ. 262, σελ. 546-565, 2004.
- [85] D. Malhan, M. Muelke, S. Rosch, A. B. Schaefer, F. Merboth, D. Weisweiler, C. Heiss, I. Arganda-Carreras και T. El Khassawna, «An optimized approach to perform bone histomorphometry» σε *Frontiers in Endocrinology*, τόμ. 9/666. 21 Nov. 2018.
- [86] M. Hill, «Embryology histology stains», 2020. [Ηλεκτρονικό]: https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Histology_Stains. Προσπέλαση: 1/9/2020.
- [87] M. Mallouchou, L. Katikas, E. Stathopoulou, N. Papaioannou, N. Varagka και B. Nakos, «Mapping Cheshire Cats' Leg: A histological approach of cortical bone tissue through modern GIS technology» σε *Anatomical Science International*, τόμ. 95, σελ. 104-125, 2019.
- [88] J. S. Foote, «A contribution to the comparative histology of the femur», Washington, Smithsonian Institution, 1916.

- [89] T. Zoetis, M. Tassinari, C. Bagi, K. Walthall και M. Hurtt, «Species comparison of postnatal bone growth and development» σε *Birth Defects Research*, τόμ. 68, σελ. 86-110, 2003.
- [90] J. M. Andronowski, I. V. Pratt και D. M. L. Cooper, «Occurrence of osteon banding in adult human cortical bone» σε *American Journal of Physical Anthropology*, τόμ. 164, σελ. 635-642, 2017.
- [91] S. Pfeiffer, «Variability in osteon size in recent human populations» σε *American Journal Of Physical Anthropology*, τόμ. 106, σελ. 219-127, 1998.
- [92] S. A. Cuijpers, «Distinguishing between the bone fragments of medium- sized mammals and children. A histological identification method for archaeology» σε *Anthropologischer Anzeiger*, τόμ. 67, σελ. 181-203, 2009.
- [93] J. D. Currey, «Bones: structure and mechanics», Princeton, Oxfordshire, Princeton University Press, 2002.
- [94] E. R. Kerley, «The microscopic determination of age in human bone» σε *American Journal of Physical Anthropologists*, τόμ. 23, σελ. 149-163, 1965.
- [95] P. Burton, C. Nyssen-Behets και A. Dhem, «Haversian bone remodelling in human fetus» σε *Cells Tissues Organs*, τόμ. 135, σελ. 171-175, 1989.
- [96] D. M. Mulhern και D. H. Ubelaker, «Differences in osteon banding between human and nonhuman bone» σε *Journal of Forensic Sciences*, τόμ. 46, σελ. 220-222, 2001.
- [97] D. M. Brits, «Histomorphometrical and chemical analysis of human and non-human bones, Pretoria», South Africa, University of Pretoria, 2013.
- [98] D. Brits, M. Steyn και E. N. L'Abbé, «A histomorphological analysis of human and nonhuman femora» σε *International Journal of Legal Medicine*, τόμ. 128, σελ. 369-377, 2014.
- [99] V. M. Dominguez και A. M. Agnew, «Examination of factors potentially influencing osteon size in the human rib» σε *The Anatomical Record*, τόμ. 299, σελ. 313-324, 2016.
- [100] M. Streeter, «A four-stage method of age at death estimation for use in the subadult rib cortex» σε *Journal Of Forensic Sciences*, τόμ. 55, σελ. 1019-1024, 2010.

- [101] S. Cuijpers και R. C. G. M. Lauwerier, «Differentiating between bone fragments from horses and cattle: a histological identification method for archaeology» σε *Environmental Archaeology*, τόμ. 13, σελ. 165-179, 2008.
- [102] M. Martiniaková, B. Grosskopf, M. Vondráková, R. Omelka και M. Fabis, «Differences in femoral compact bone tissue microscopic structure between adult cows (*Bos taurus*) and pigs (*Sus scrofa domestica*)» σε *Anatomia, Histologia, Embryologia*, τόμ. 35, σελ. 167-170, 2006.
- [103] E. J. Whitman, «Differentiating between human and non-human secondary osteons in human, canine, and bovine rib tissue», Michigan State University, School of Criminal Justice, 2004.
- [104] R. Mori, T. Kodaka, S. Soeta, J. Sato, J. Kakino, S. Hamato, H. Takaki και Y. Naito, «Preliminary study of histological comparison on the growth patterns of long-bone cortex in young calf, pig, and sheep» σε *Anatomy*, τόμ. 67, σελ. 1223-1229, 2005.
- [105] A. I. Gudea και A. C. Stefan, «Histomorphometric, fractal and lacunarity comparative analysis of sheep (*Ovis aries*), goat (*Capra hircus*) and roe deer (*Capreolus capreolus*) compact bone samples» σε *Folia morphologica*, τόμ. 72, σελ. 239-248, 2013.
- [106] M. Pyszko, V. Paral και M. Kyllar, «Thickness of the substantia compacta of porcine long bones» σε *Veterinární medicína*, τόμ. 58, σελ. 543-552, 2013.
- [107] Z. H. Morris, «*Quantitative and spatial analysis of the microscopic bone structures of deer (*Odocoileus virginianus*), dog (*Canis familiaris*), and pig (*Sus scrofa domestica*)*», Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, 2007.
- [108] R. Georgia και I. Albu, «The Haversian canal network in the femoral compact bone in some vertebrates» σε *Morphologie et Embryologie*, τόμ. 34, σελ. 155-159, 1988.
- [109] L. C. Detenbeck και J. Jowsey, «Normal aging in the bone of the adult dog» σε *Clinical Orthopaedics and Related Research*, τόμ. 65, σελ. 76-80, 1969.
- [110] P. Urbanová και V. Novotný, «Distinguishing between human and non-human bones: Histometric method for forensic anthropology» σε *Anthropologie*, τόμ. 42, σελ. 175-183, 2004.

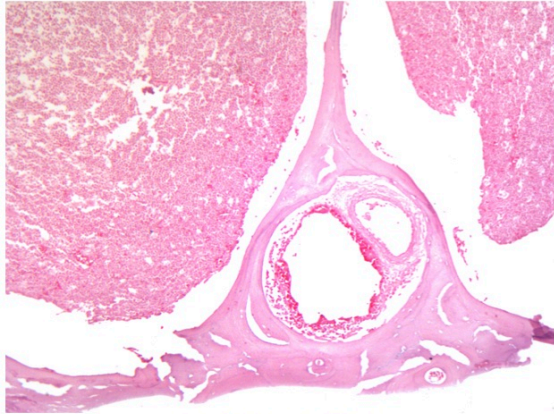
- [111] A. A. Felder, C. Phillips, H. Cornish, J. R. M. Hutchinson, M. Cooke και M. Doube, «Secondary osteons scale allometrically in mammalian humerus and femur» σε *The Royal Society open science*, τόμ. 4(11):170431, 2017.
- [112] A. C. Beresheim, S. K. Pfeiffer και A. Alblas, «The Influence of body size and bone mass on cortical bone histomorphometry in human ribs» σε *The Anatomical Record*, τόμ. 301, σελ. 1788-1796, 2018.
- [113] V. M. Dominguez και C. Crowder, «The utility of osteon shape and circularity for differentiating human and non-human haversian bone» σε *American Journal Of Physical Anthropology*, τόμ. 149, σελ. 84-91, 2012.
- [114] I. Kontopoulos, P. Nystrom και L. White, «Experimental taphonomy: post-mortem microstructural modifications in *Sus scrofa domesticus* bone,» *Forensic Science International*, τόμ. 266, σελ. 320-328, 2016.
- [115] F. Dedouit, D. Gainza, N. Franchitto, F. Joffre, H. Rousseau, D. Rougé και N. Telmon, «Radiological, Forensic, and Anthropological Studies of a Concrete Block Containing Bones» σε *Journal of Forensic Sciences*, τόμ. 56, σελ. 1328-1333, 2011.
- [116] B. Pansky και T. R. Gest, «Κεφάλαιο 1: Ο θώρακας» σε *Συνοπτική Έγχρωμη Ανατομία: Θώρακας, Κοιλία & Πύελος (Τόμος 2)*, Κωνσταντίνος Νάτσης (Επ.), Αθήνα, Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου, κεφ.1, σελ. 2-10, 2020.
- [117] S. S. Margulies, J. R. Rodarte και E. A. Hoffman, «Geometry and kinematics of dog ribs» σε *Journal of Applied Physiology*, τόμ. 67, σελ. 707-712, 1989.
- [118] E. Verna, M. Piercecchi-Marti, K. Chaumoitre, C. Bartoli, G. Leonetti και P. Adalian, «Discrete traits of the sternum and ribs: A useful contribution to identification in forensic anthropology and medicine» σε *Journal Of Forensic Sciences*, τόμ. 58, σελ. 571-577, 2013.
- [119] W. S. Silva, «Museum of Veterinary Anatomy FMVZ USP», 2015.
[Ηλεκτρονικό]: <http://mav.fmvz.usp.br>. Προσπέλαση: 8/9/2020.
- [120] D. M. Mulhern, «Rib remodeling dynamics in a skeletal population from Kulubnarti, Nubia» σε *American Journal Of Physical Anthropology*, τόμ. 111, σελ. 519-530, 2000.
- [121] J. G. Skedros, G. C. Clark, S. M. Sorenson, K. W. Taylor και S. Qiu, «Analysis of the effect of osteon diameter on the potential relationship of osteocyte lacuna density and osteon wall thickness» σε *The Anatomical Record*, τόμ. 294, σελ. 1472-1485, 2011.

- [122] L. Martrille, T. Irinopoulou, P. Bruneval, E. Baccino και P. Fornes, «Age at death estimation in adults by computer-assisted histomorphometry of decalcified femur cortex» σε *Journal of Forensic Science*, τόμ. 54, σελ. 1231-1237, 2009.
- [123] V. Caruso, M. Cummaudo, E. Maderna, A. Cappella, G. Caudullo, V. Scarpulla και C. Cattaneo, «A comparative analysis of microscopic alterations in modern and ancient undecalcified and decalcified dry bones» σε *American Journal of Physical Anthropology*, τόμ. 165, σελ. 363-369, 2018.
- [124] E. Cocariu, V. Mageriu, F. Stăniceanu, A. Bastian, C. Socoliuc και S. Zurac, «Correlations between the autolytic changes and postmortem interval in refrigerated cadavers» σε *Romanian Journal of Internal Medicine*, τόμ. 54, σελ. 105-112, 2016.
- [125] M. S. Micozzi, «Experimental study of postmortem change under field conditions: effects of freezing, thawing, and mechanical injury» σε *Journal of Forensic Sciences*, τόμ. 31, σελ. 953-961, 1986.
- [126] A. R. Hale και A. H. Ross, «The Impact of freezing on bone mineral density: Implications for forensic research» σε *Journal of Forensic Sciences*, τόμ. 62, σελ. 399-404, 2017.
- [127] M. A. Tersigni, «Frozen human bone: A microscopic investigation» σε *Journal of Forensic Sciences*, τόμ. 52, σελ. 16-20, 2007.
- [128] M. Locke και R. L. Dean, «Vascular Spaces in Compact Bone» σε *The American Biology Teacher*, τόμ. 65, σελ. 701-707, 2003.
- [129] E. J. Reitz και E. S. Wing, «Zooarchaeology (2^η Έκδ.)», New York, U.S., Cambridge University Press, 2008.
- [130] S. Rhine, «Bone Voyage: A journey in forensic anthropology», New Mexico, University of New Mexico Press, 1998.
- [131] D. W. Steadman, L. L. DiAntonio, J. J. Wilson, K E. Sheridan και S. P. Tammariello, «The effects of chemical and heat maceration techniques on the recovery of nuclear and mitochondrial DNA from bone» σε *Journal of Forensic Sciences*, τόμ. 51, σελ. 11-17, 2006.
- [132] Δ. Ψάλλα, «Η διαχείριση των ιστολογικών δειγμάτων» σε *Hellenic Journal of Companion Animal Medicine*, τόμ. 2, σελ. 47-58, 2013.

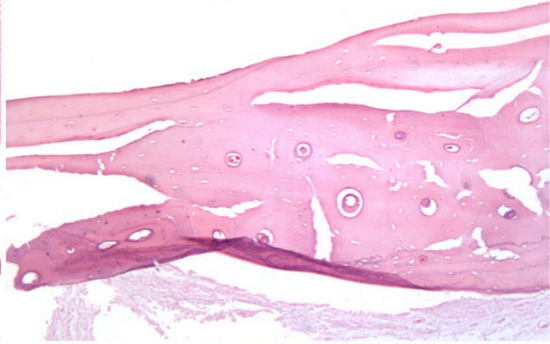
- [133] Μ. Χατζιωάννου, Χ. Αποστολογάμβρου και Δ. Βαφειδής, «Μέθοδοι και τεχνικές ιστολογίας» σε *Εργαστηριακές ασκήσεις ιστολογίας*, Αθήνα, Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, κεφ. 2, σελ. 22-34, 2015.
- [134] Μ. Lai και Β. Lü, «Tissue Preparation for Microscopy and Histology» σε *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, τόμ. 3, σελ. 53-93, 2012.
- [135] Κ. S. Suvarna, J. D. Bancroft και C. Layton, «Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques (8^η Έκδ.)», Amsterdam, Elsevier, 2019.
- [136] S. Sang-Heon, Y. Young-Pil, K. Hak-Jun, P. Kyeongsoon, K. Sung-Eun και S. Hae-Ryong, «Bone Formation in a Rat Tibial Defect Model Using Carboxymethyl Cellulose/BioC/Bone Morphogenic Protein-2 Hybrid Materials» σε *BioMed Research International*, τόμ. 2014:230152, 2014.
- [137] L. Aly, H. El-Menoufy, A. Hassan, A. Ragae, H. Mahmoud-atta, N. Roshdy, A. Rashed και D. Sabry, «Influence of Autologous Adipose Derived Stem Cells and PRP on Regeneration of Dehiscence-Type Defects in Alveolar Bone: A Comparative Histochemical and Histomorphometric Study in Dogs» σε *International journal of stem cells*, τόμ. 4, σελ. 61-69, 2011.
- [138] T. Sousa, M. Costa, R. Guilherme, W. Orcini, L. Holgado, E. Silveira, O. Tavano, A. Magdalena, S. Catanzaro-Guimarães και A. Kinoshita, «Polyurethane derived from Ricinus Communis as graft for bone defect treatments» σε *Polimeros*, τόμ. 28, σελ.246-255, 2018.
- [139] D. Chappard, «Chapter 11 - Technical aspects: how do we best prepare bone samples for proper histological analysis?» σε *Bone Cancer (2^η Έκδ.)*, Heymann D (Επ.), San Diego, Academic Press, κεφ.11, σελ. 111-120, 2015.
- [140] S. E. Mills, «Histology for pathologists (5^η Έκδ.)», Philadelphia, Wolters Kluwer, 2020.
- [141] L. M. Ernst, E. D. Ruchelli, C. K. Carreon και D. S. Huff, «Color Atlas of Human Fetal and Neonatal Histology (2^η Έκδ.)», Cham, Switzerland, Springer, 2019.
- [142] A. M. Baker, «Evaluation of Pediatric Fractures at Autopsy» σε *Forensic Pathology of Infancy and Childhood*, Collins K. και Byard R. (Επ.), New York, Springer, 2014.
- [143] W. J. Bacha και L. M. Bacha, «Color atlas of veterinary histology (2^η Έκδ.)», Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΜΙΚΡΟΦΩΤΟΓΡΑΦΙΩΝ

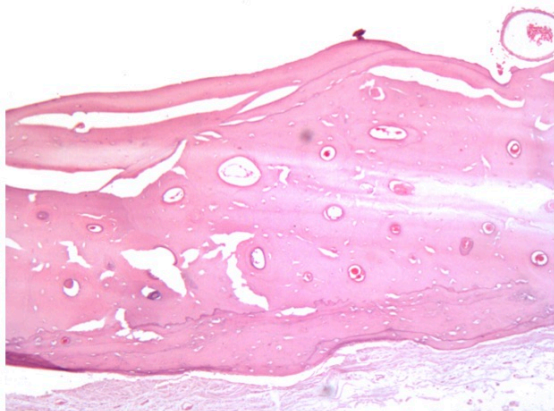
1. *Homo sapiens*



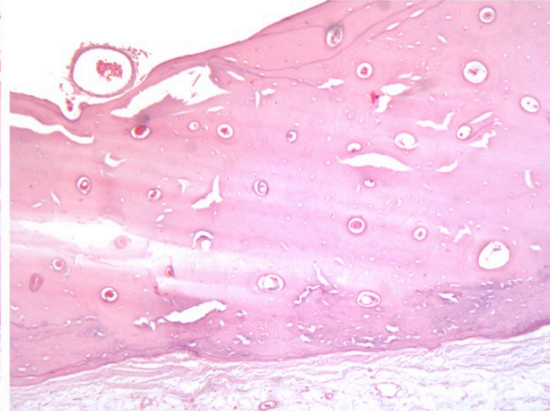
Εικόνα 1: HS 201_21 (x50, H&E)



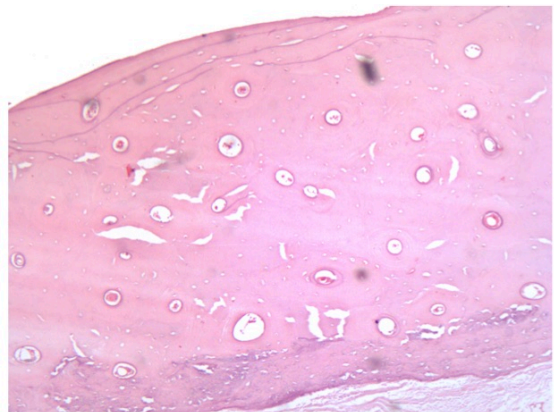
Εικόνα 2: HS 201_21 (x50, H&E)



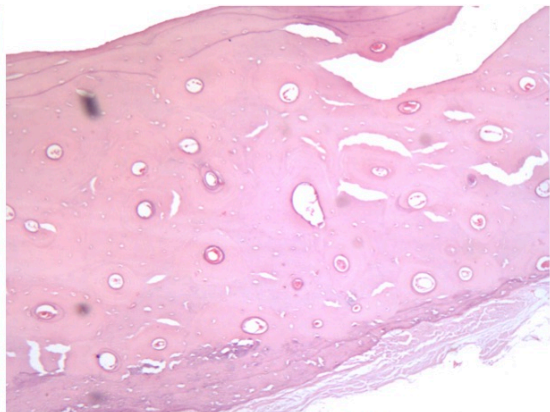
Εικόνα 3: HS 201_21 (x50, H&E)



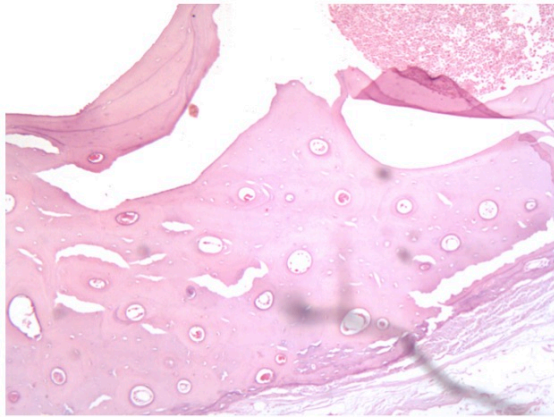
Εικόνα 4: HS 201_21 (x50, H&E)



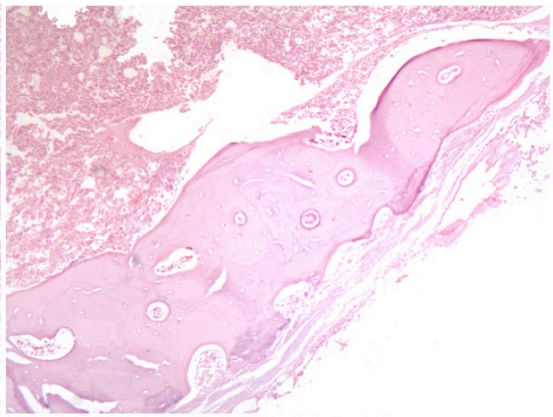
Εικόνα 5: HS 201_21 (x50, H&E)



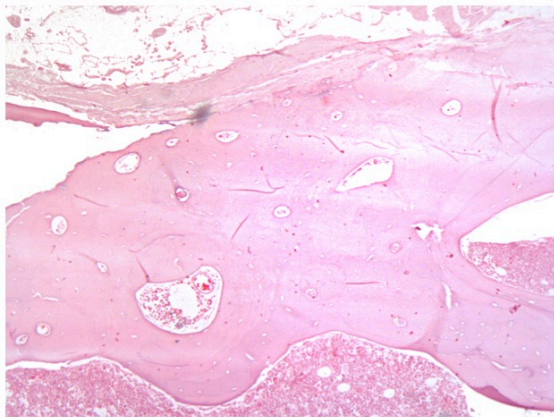
Εικόνα 6: HS 201_21 (x50, H&E)



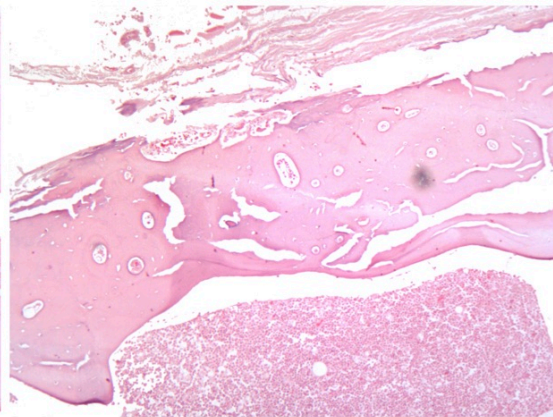
Εικόνα 7: HS 201_21 (x50, H&E)



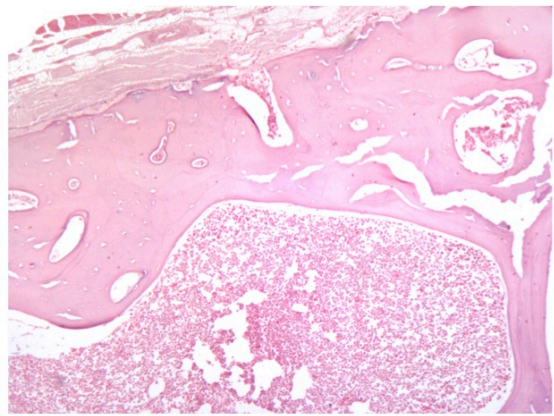
Εικόνα 8: HS 201_21 (x50, H&E)



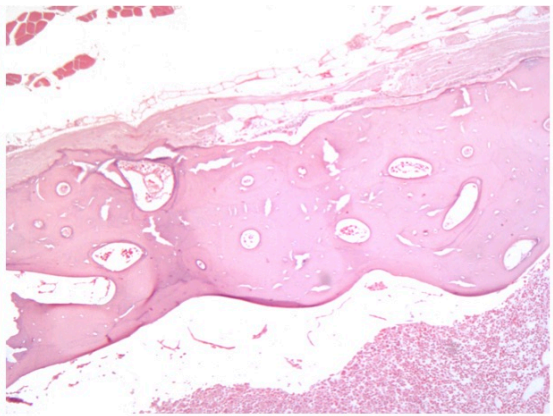
Εικόνα 9: HS 201_21 (x50, H&E)



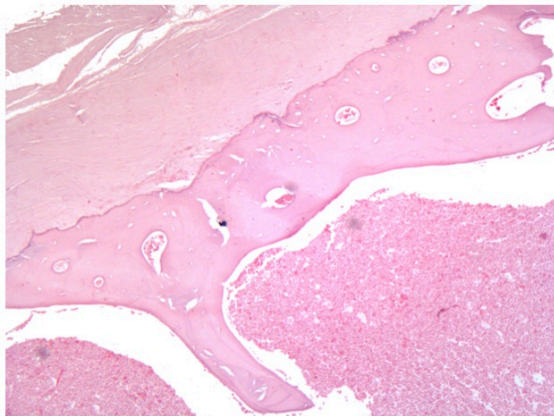
Εικόνα 10: HS 201_21 (x50, H&E)



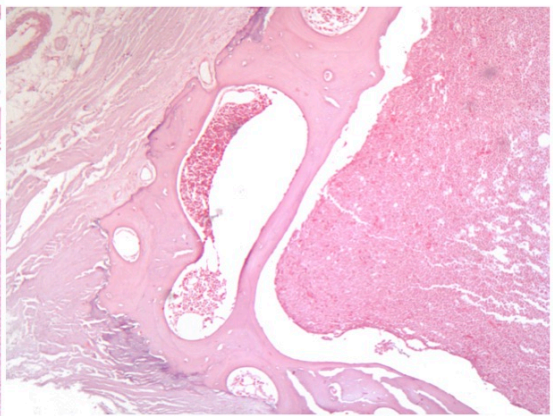
Εικόνα 11: HS 201_21 (x50, H&E)



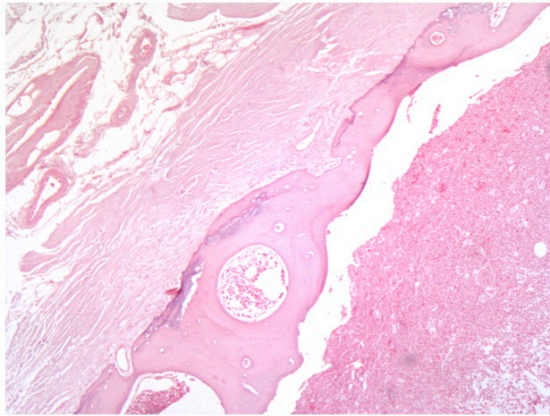
Εικόνα 12: HS 201_21 (x50, H&E)



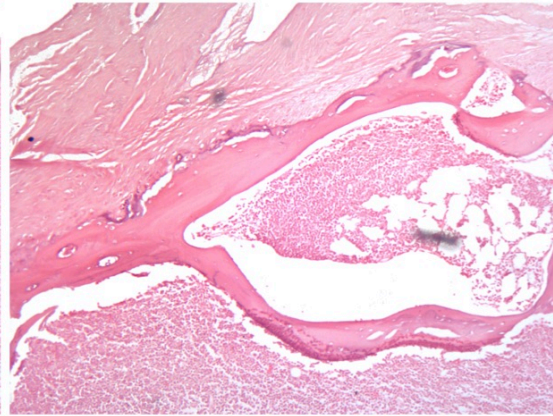
Εικόνα 13: HS 201_21 (x50, H&E)



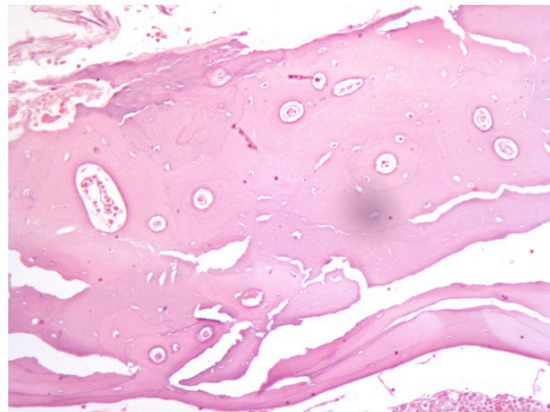
Εικόνα 14: HS 201_21 (x50, H&E)



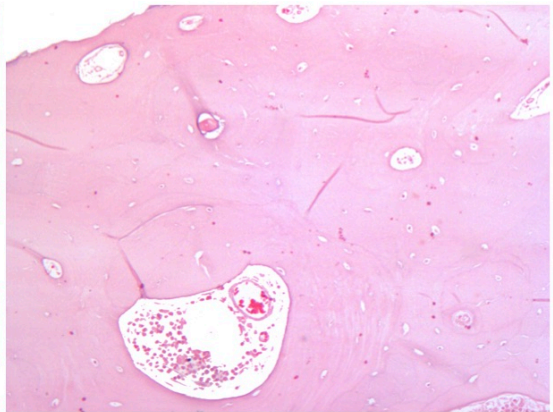
Εικόνα 15: HS 201_21 (x50, H&E)



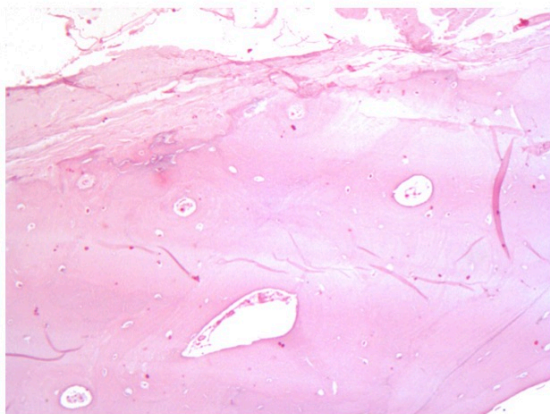
Εικόνα 16: HS 201_21 (x50, H&E)



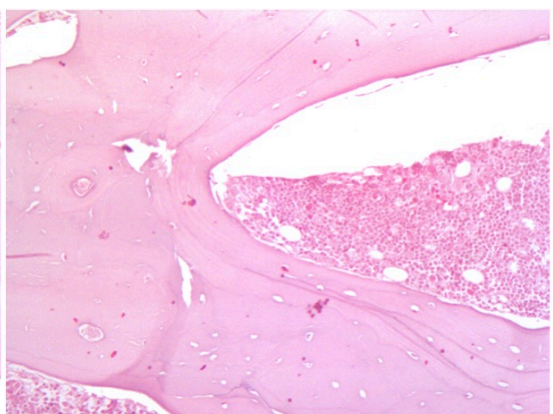
Εικόνα 17: HS 201_21 (x100, H&E)



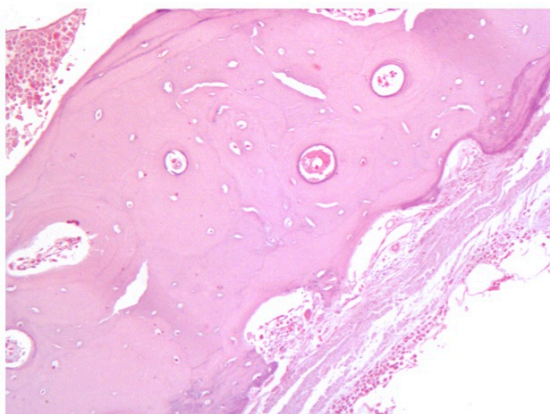
Εικόνα 18: HS 201_21 (x100, H&E)



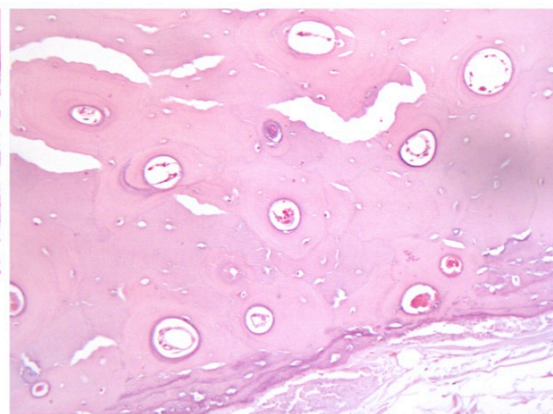
Εικόνα 19: HS 201_21 (x100, H&E)



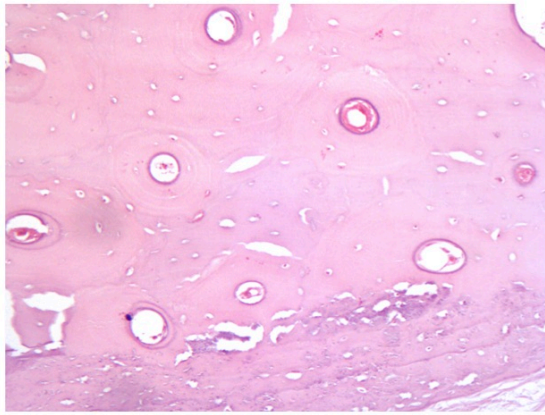
Εικόνα 20: HS 201_21 (x100, H&E)



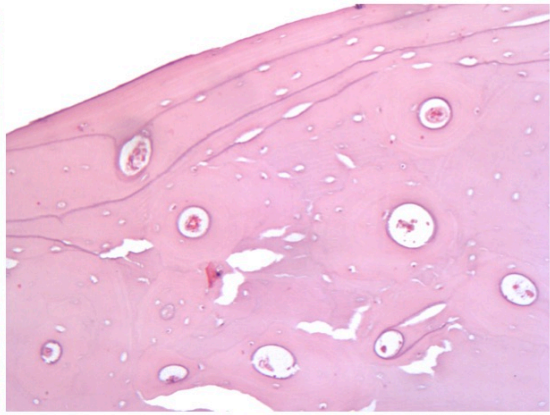
Εικόνα 21: HS 201_21 (x100, H&E)



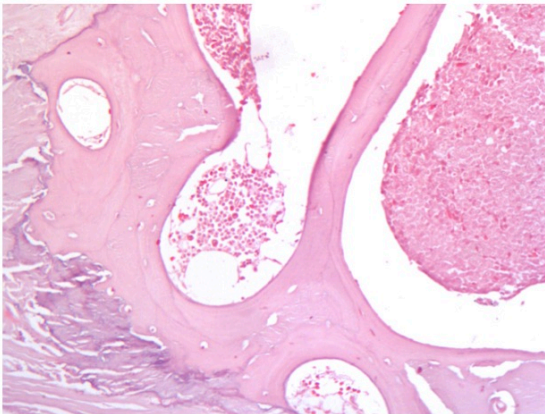
Εικόνα 22: HS 201_21 (100, H&E)



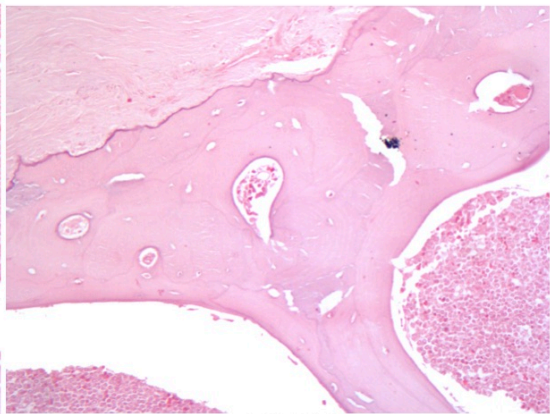
Εικόνα 23: HS 201_21 (x100, H&E)



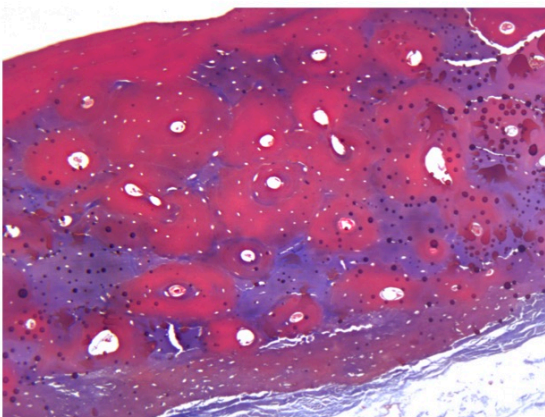
Εικόνα 24: HS 201_21(x100, H&E)



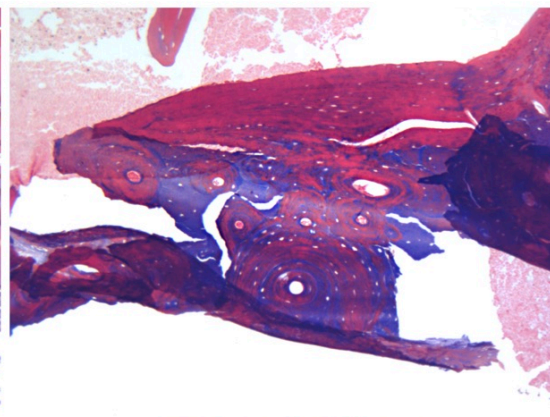
Εικόνα 25: HS 201_21 (x100, H&E)



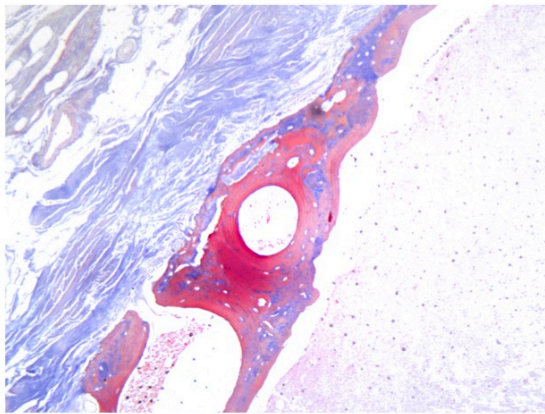
Εικόνα 26: HS 201_21 (x100, H&E)



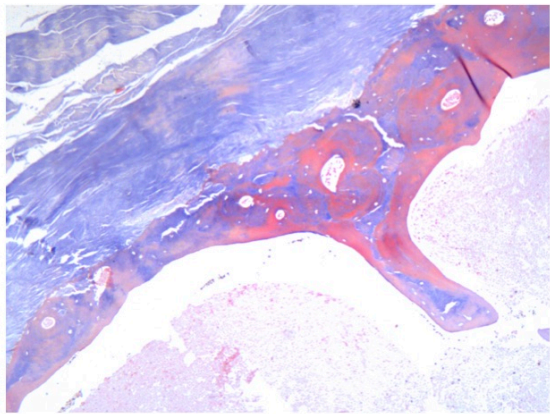
Εικόνα 27: HS 201_21 (x50, Tr. Masson's)



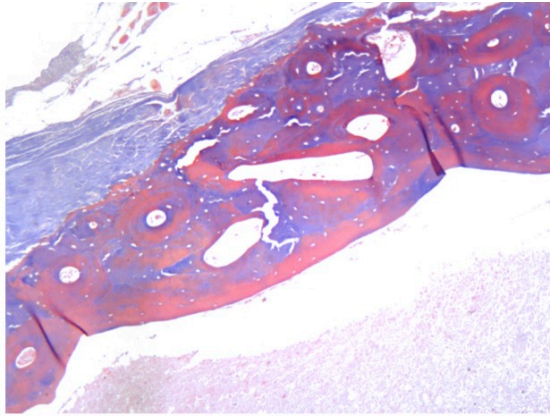
Εικόνα 28: HS 201_21(x50, Tr. Masson's)



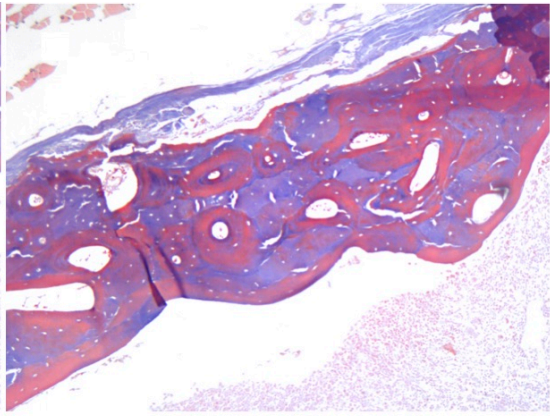
Εικόνα 29: HS 201_21 (x50, Tr. Masson's)



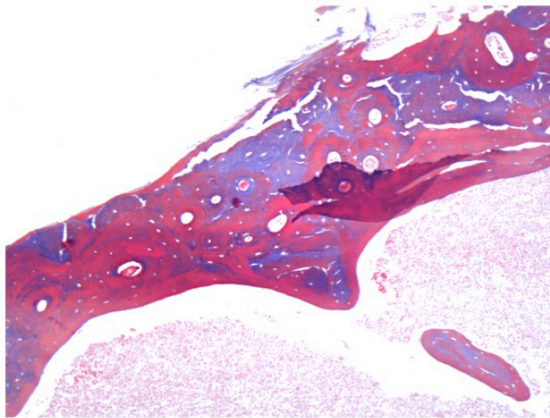
Εικόνα 30: HS 201_21 (x50, Tr. Masson's)



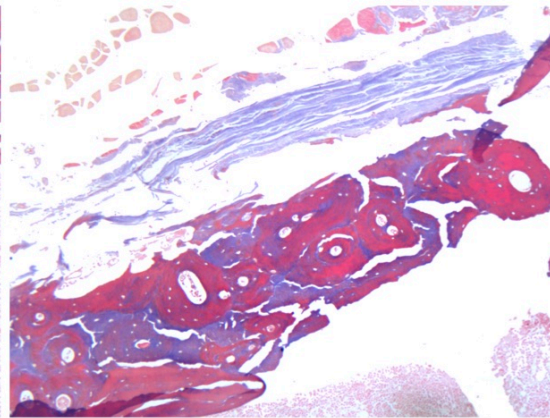
Εικόνα 31: HS 201_21 (x50, Tr. Masson's)



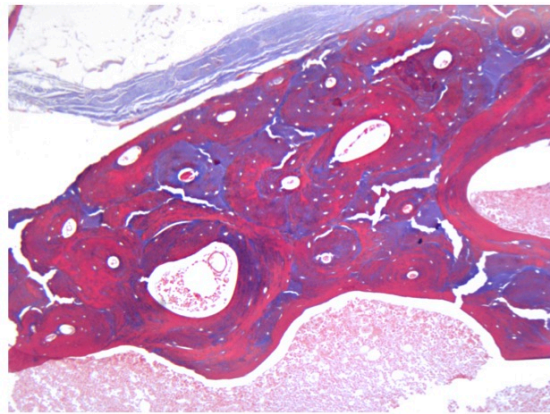
Εικόνα 32: HS 201_21 (x50, Tr. Masson's)



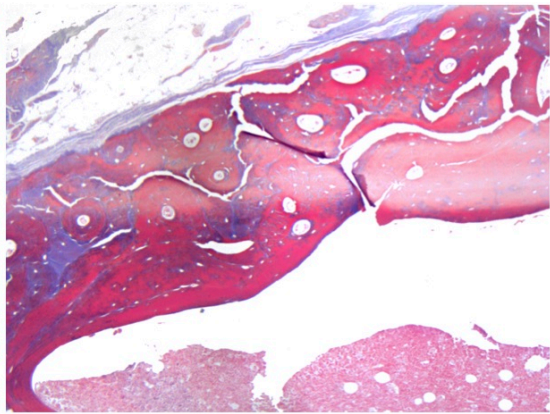
Εικόνα 33: HS 201_21 (x50, Tr. Masson's)



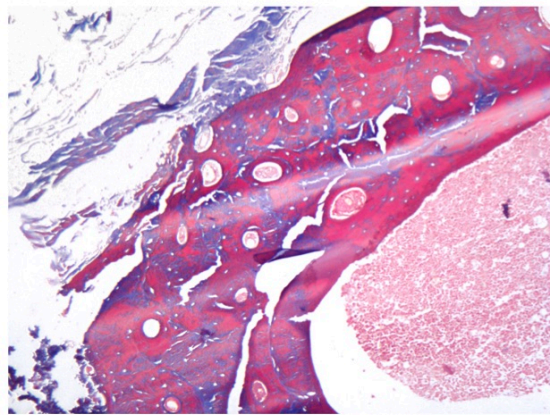
Εικόνα 34: HS 201_21 (x50, Tr. Masson's)



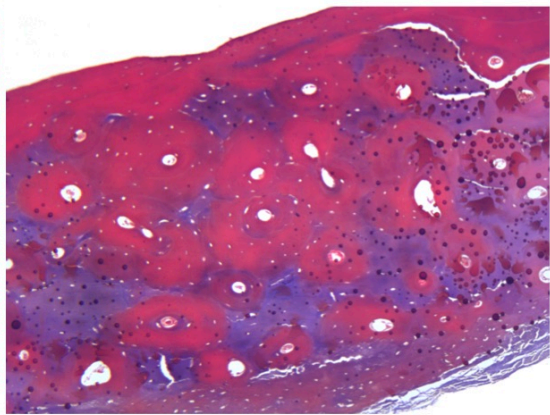
Εικόνα 35: HS 201_21 (x50, Tr. Masson's)



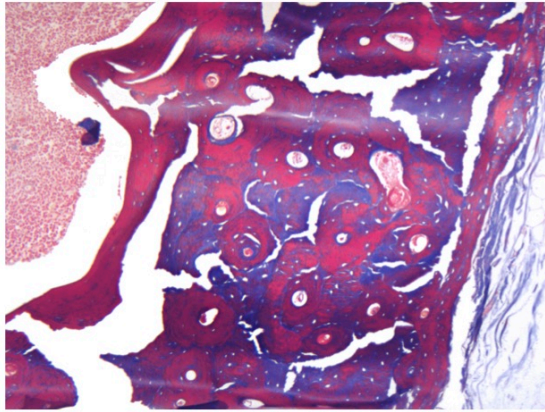
Εικόνα 36: HS 201_21 (x50, Tr. Masson's)



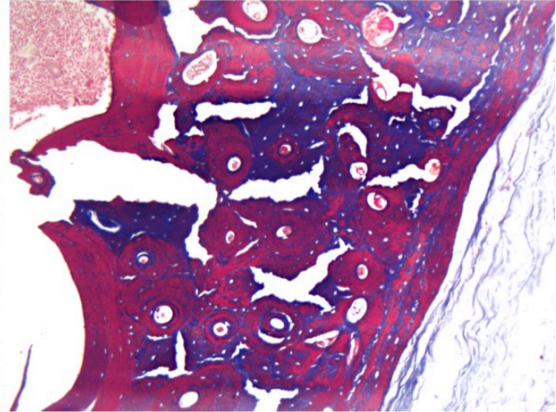
Εικόνα 37: HS 201_21 (x50, Tr. Masson's)



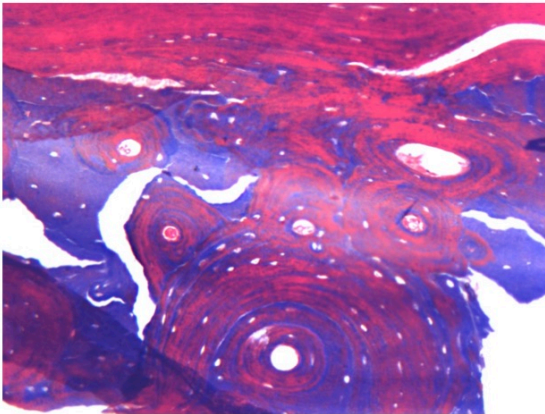
Εικόνα 38: HS 201_21 (x50, Tr. Masson's)



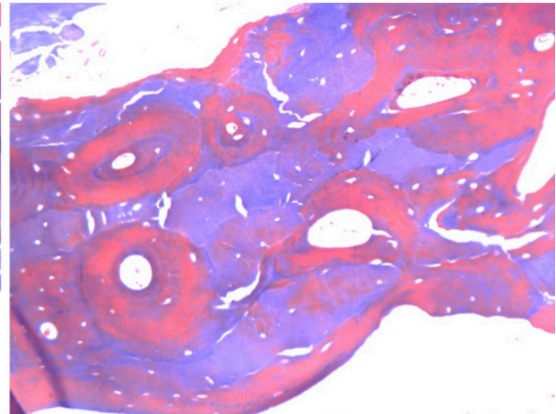
Εικόνα 39: HS 201_21 (x50, Tr. Masson's)



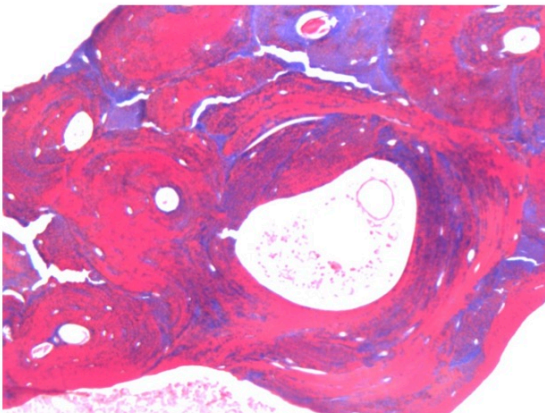
Εικόνα 40: HS 201_21 (x50, Tr. Masson's)



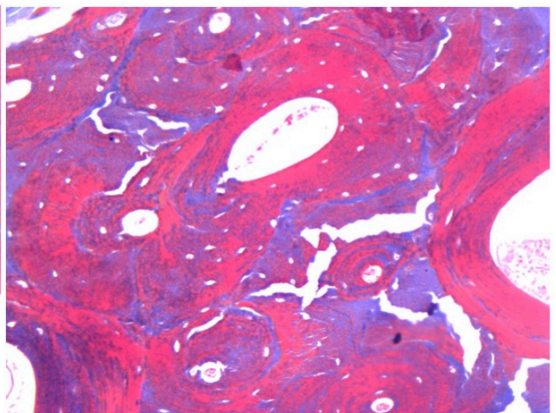
Εικόνα 41: HS 201_21 (x100, Tr. Masson's)



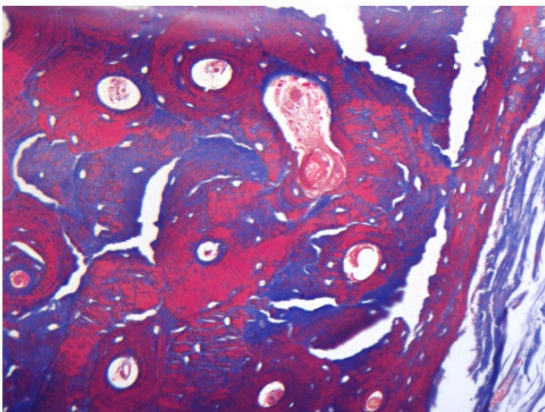
Εικόνα 42: HS 201_21 (x100, Tr. Masson's)



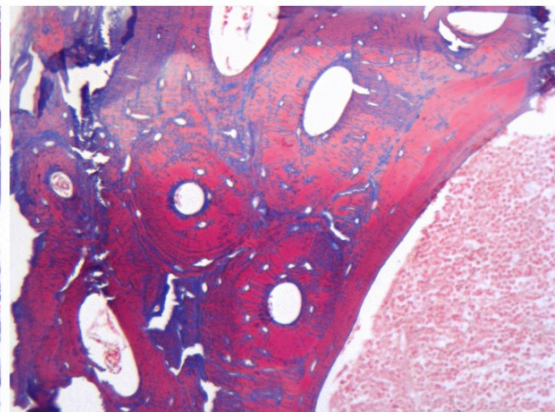
Εικόνα 43: HS 201_21 (x100, Tr. Masson's)



Εικόνα 44: HS 201_21 (x100, Tr. Masson's)

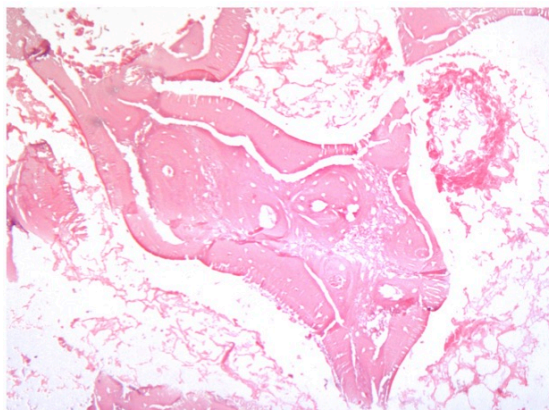


Εικόνα 45: HS 201_21 (x100, Tr. Masson's)

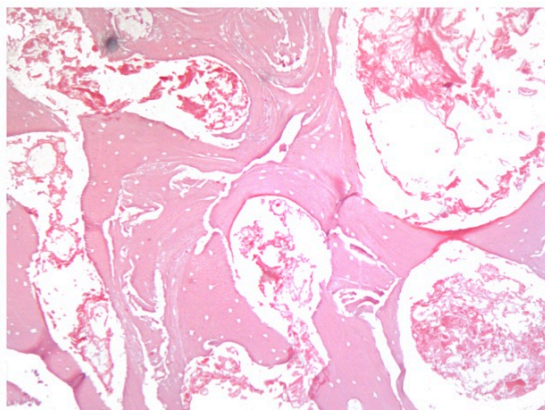


Εικόνα 46: HS 201_21 (x100, Tr. Masson's)

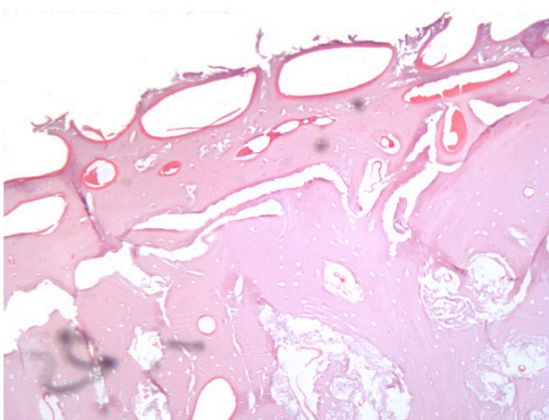
2. *Bos taurus*



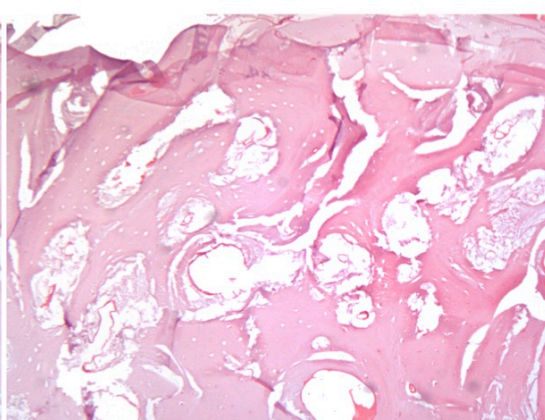
Εικόνα 1: BE1A (x50, H&E)



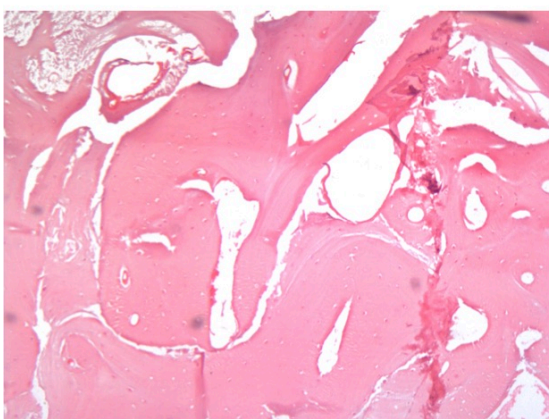
Εικόνα 2: BE1A(x50, H&E)



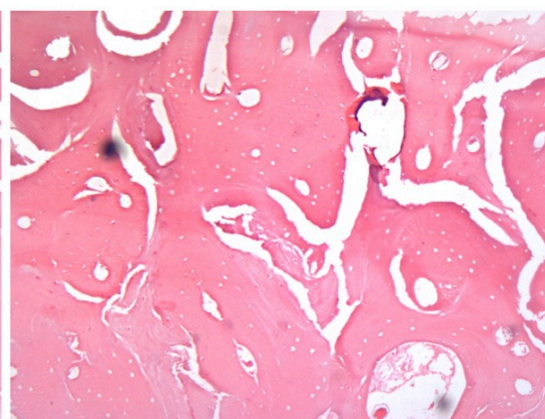
Εικόνα 3: BE1A (x50, H&E)



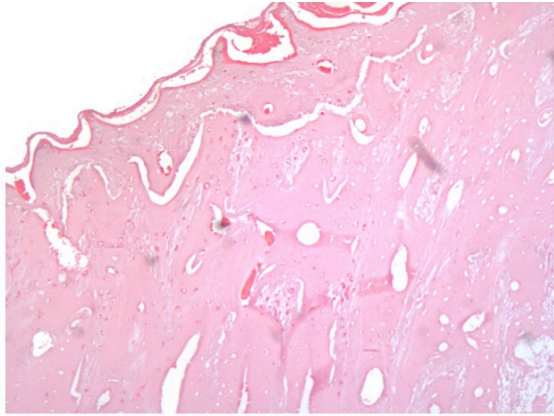
Εικόνα 4: BE1A (x50, H&E)



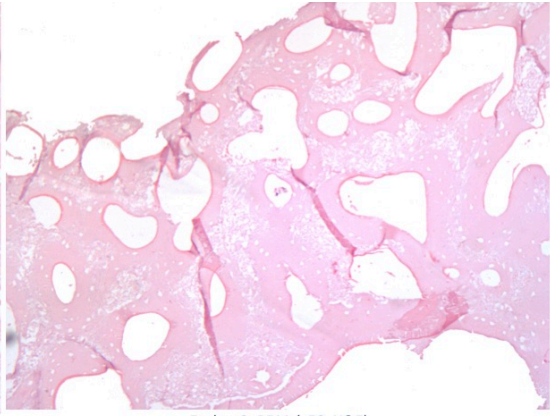
Εικόνα 5: BE1A (x50, H&E)



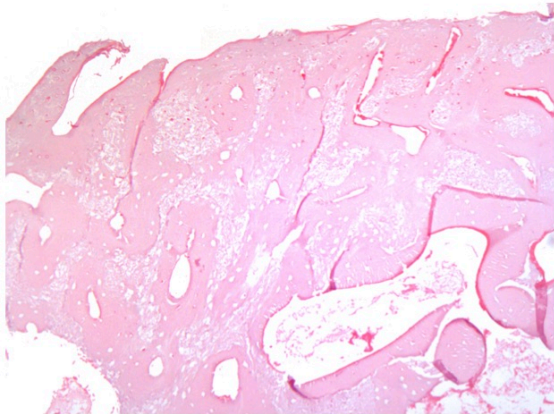
Εικόνα 6: BE1A (x50, H&E)



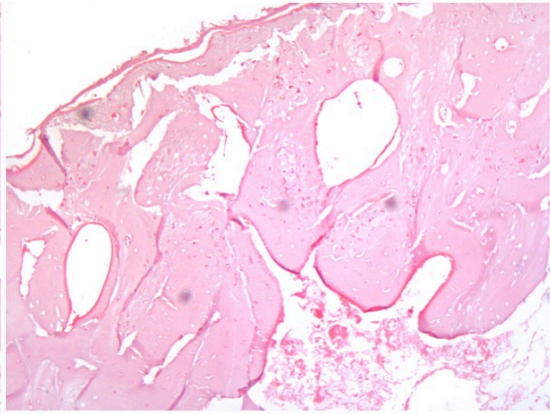
Εικόνα 7: BE1A (x50, H&E)



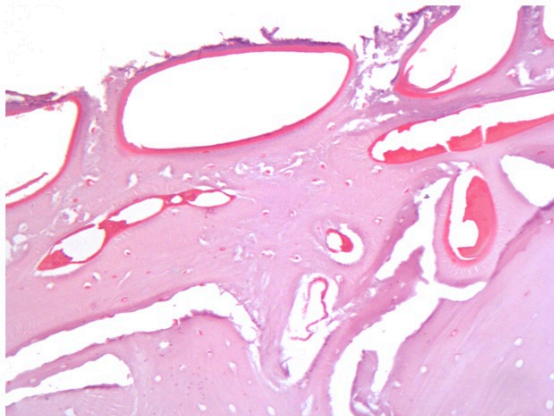
Εικόνα 8: BE1A (x50, H&E)



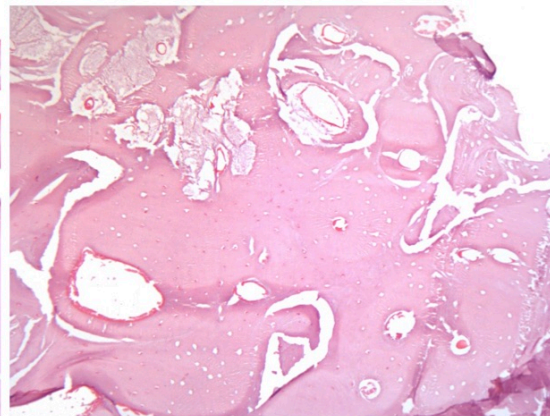
Εικόνα 9: BE1A (x50, H&E)



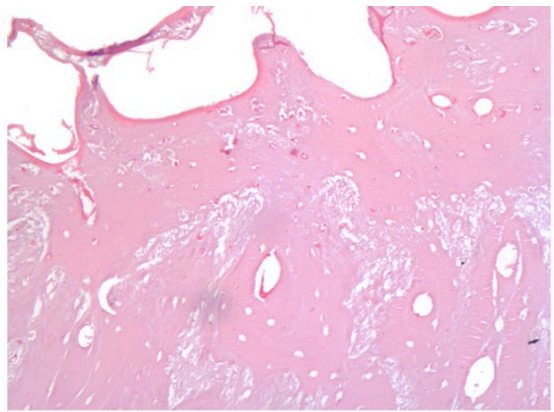
Εικόνα 10: BE1A (x50, H&E)



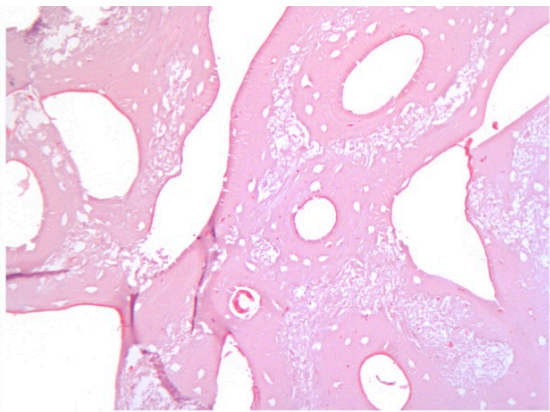
Εικόνα 11: BE1A1 (100, H&E)



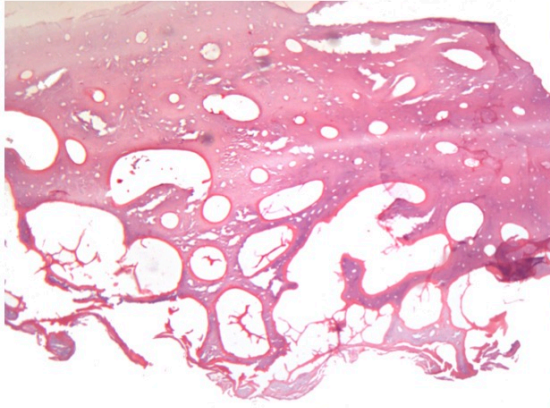
Εικόνα 12: BE1A1 (x100, H&E)



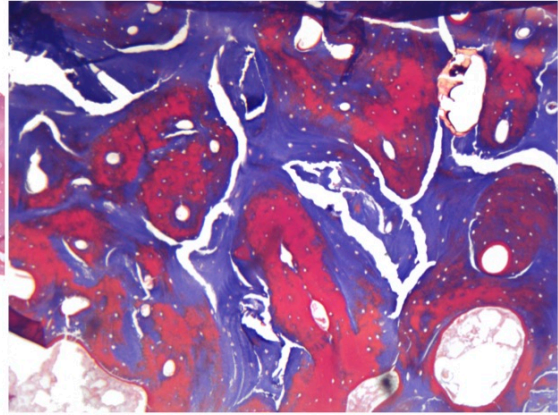
Εικόνα 13: BE1A1 (100, H&E)



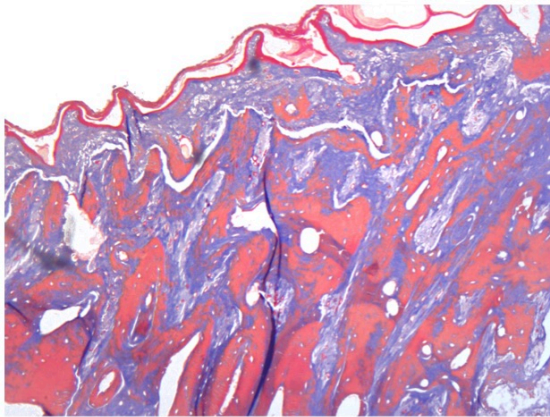
Εικόνα 14: BE1A1 (x100, H&E)



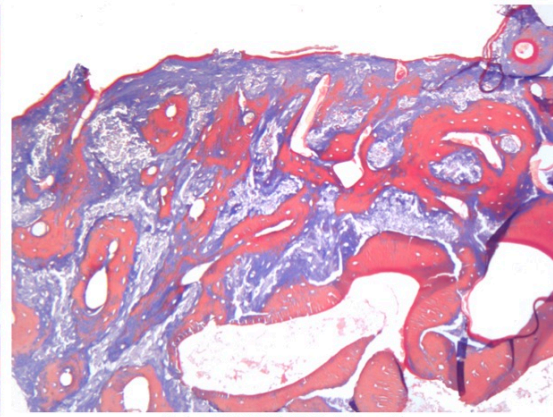
Εικόνα 15: BE3A_1 (x50, H&E)



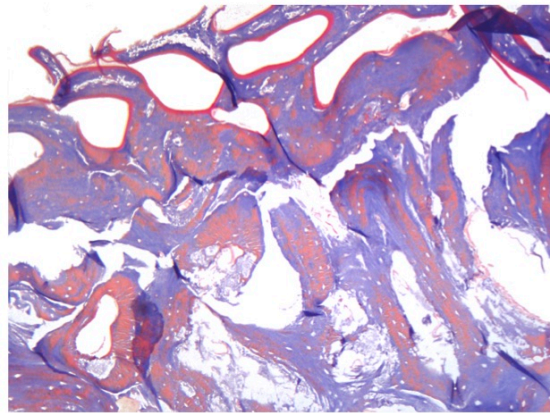
Εικόνα 16: BE1A (x50, Tr. Masson's)



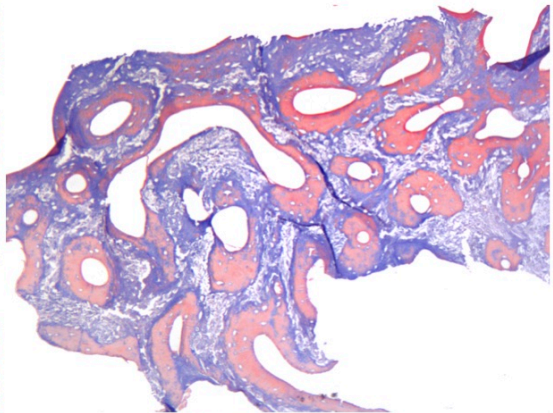
Εικόνα 17: BE1A (x50, Tr. Masson's)



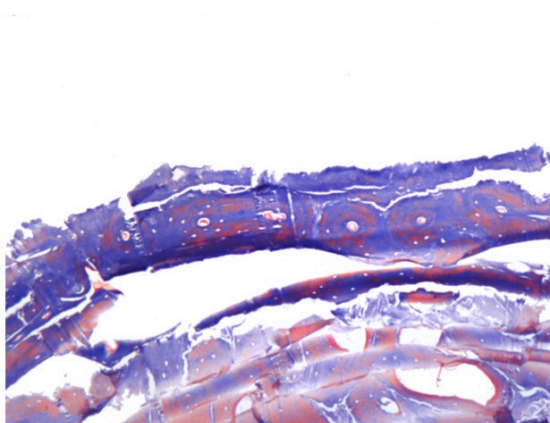
Εικόνα 18: BE1A (x50, Tr. Masson's)



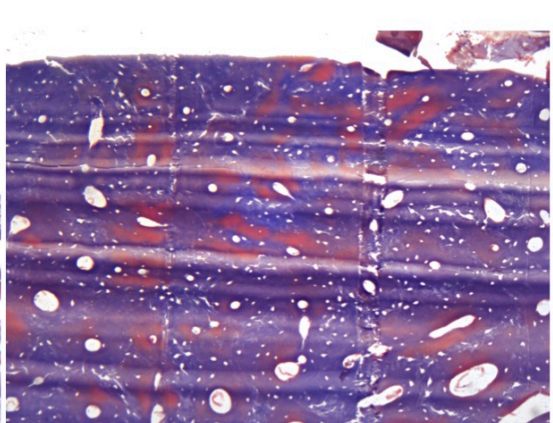
Εικόνα 19: BE1A (x50, Tr. Masson's)



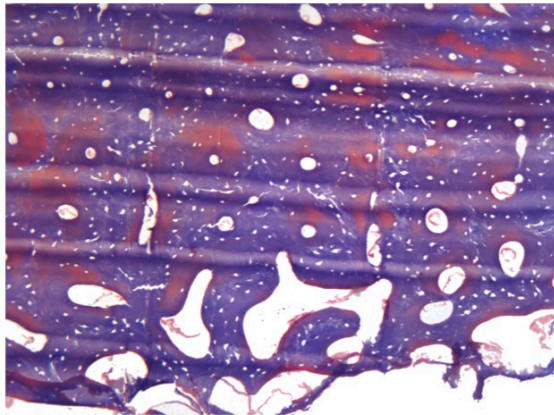
Εικόνα 20: BE1A (x50, Tr. Masson's)



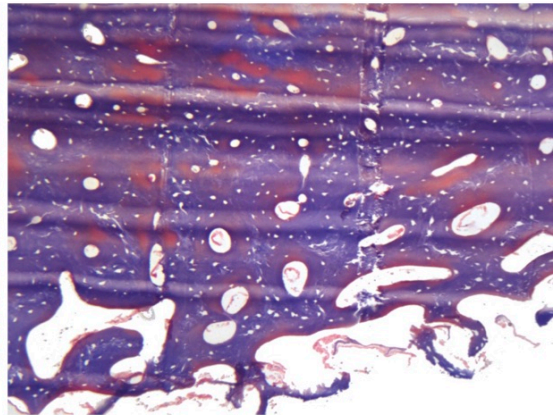
Εικόνα 21: BE1A (x50, Tr. Masson's)



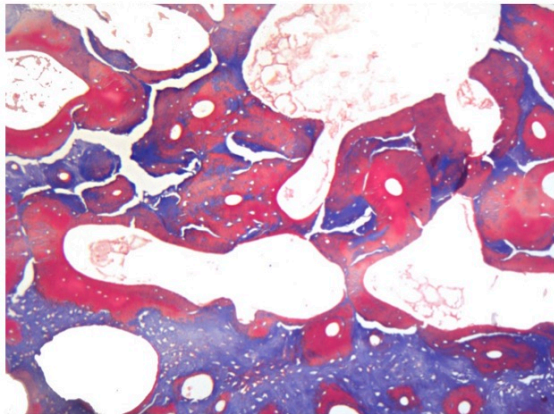
Εικόνα 22: BE1A1 (x50, Tr. Masson's)



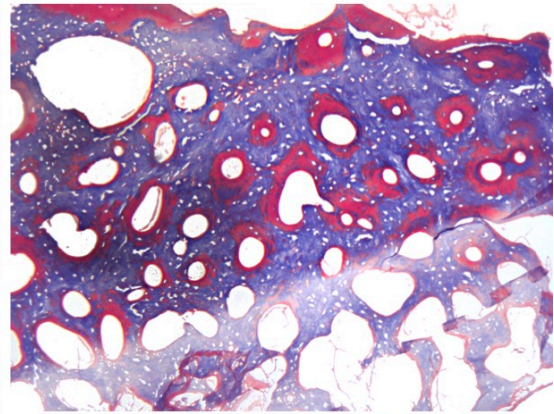
Εικόνα 23: BE1A1 (x50, Tr. Masson's)



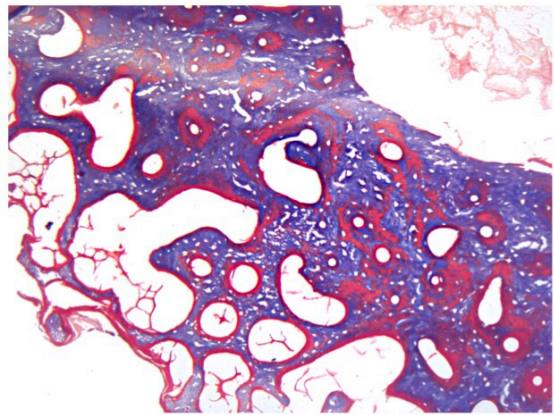
Εικόνα 24: BE1A1 (x50, Tr. Masson's)



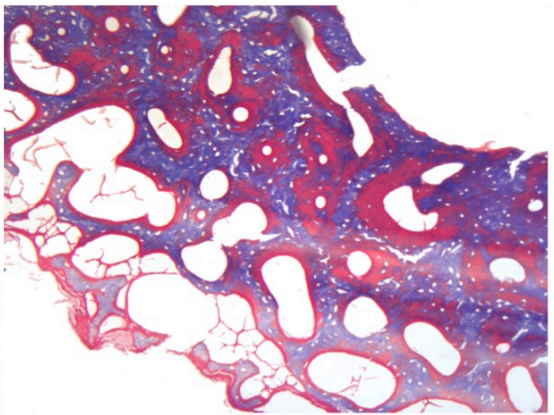
Εικόνα 25: B31A (X50, Tr. Masson's)



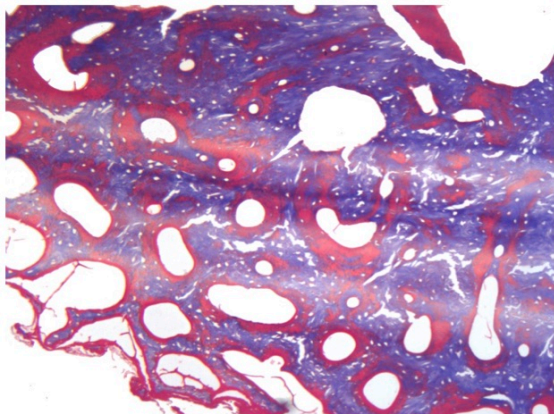
Εικόνα 26: BE3A (x50, Tr. Masson's)



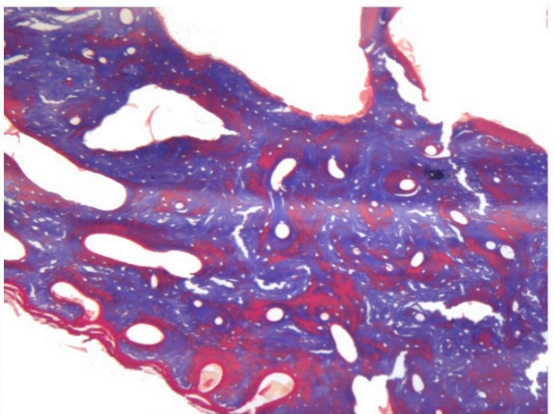
Εικόνα 27: BE3A (x50, Tr. Masson's)



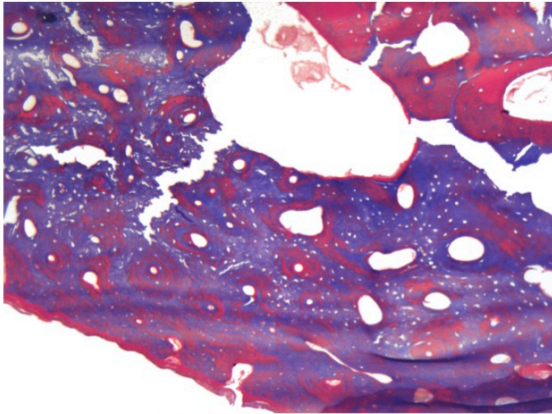
Εικόνα 28: BE3A (x50, Tr. Masson's)



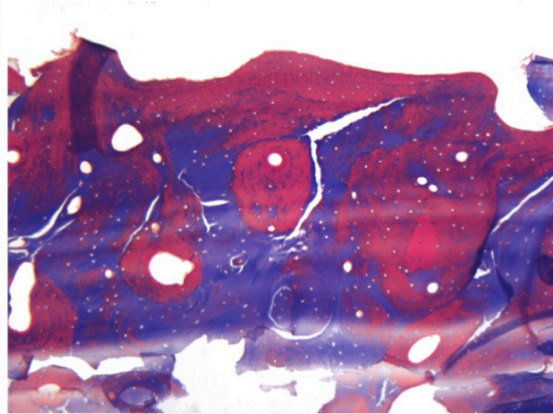
Εικόνα 29: BE3A (x50, Tr. Masson's)



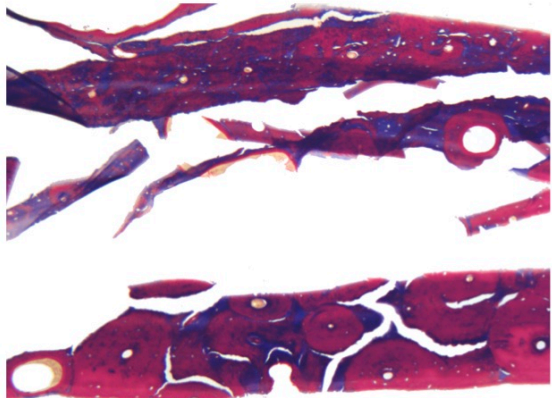
Εικόνα 30: BE3A (x50, Tr. Masson's)



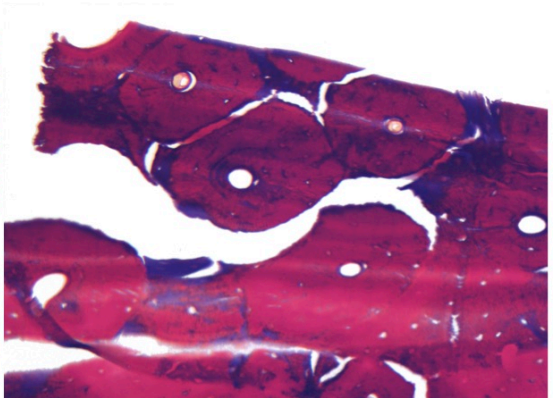
Εικόνα 31: BE3A (x50, Tr. Masson's)



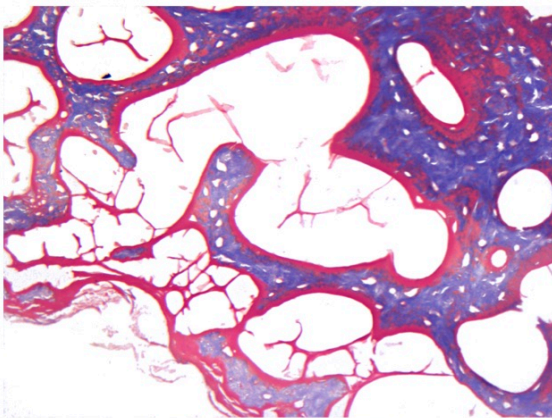
Εικόνα 32: BE3A (x50, Tr. Masson's)



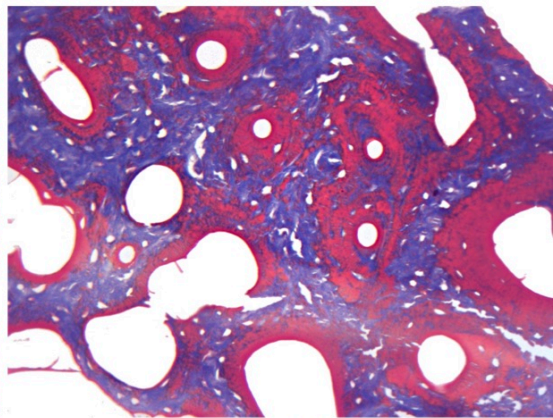
Εικόνα 33: BE3A (x50, Tr. Masson's)



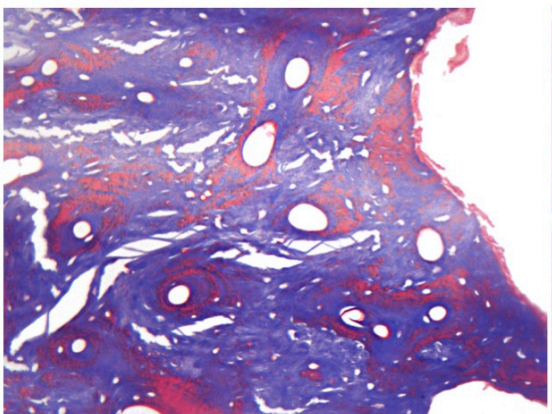
Εικόνα 34: BE3A (x100, Tr. Masson's)



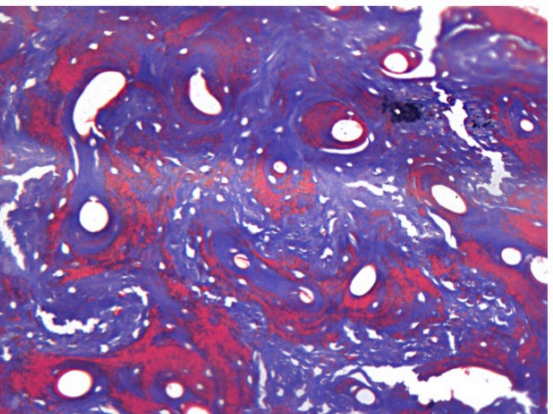
Εικόνα 35: BE3A (x100, Tr. Masson's)



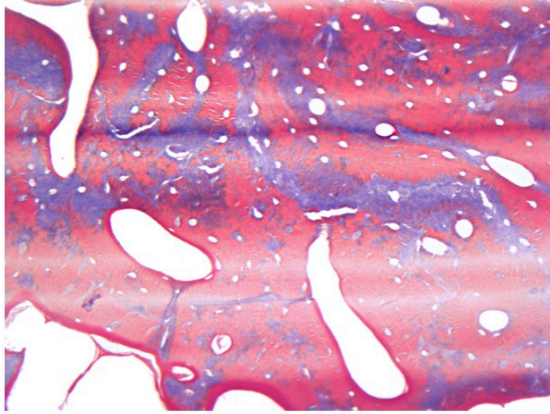
Εικόνα 36: BE3A (x100, Tr. Masson's)



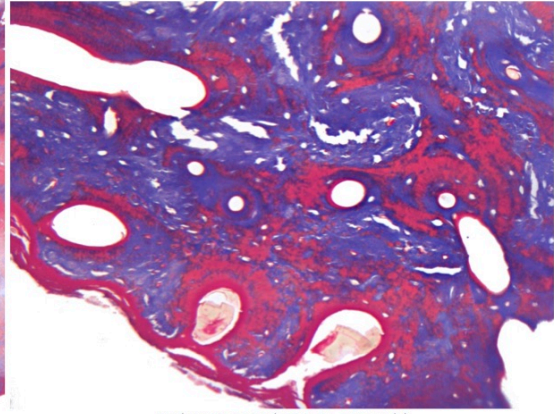
Εικόνα 37: BE3A (x100, Tr. Masson's)



Εικόνα 38: BE3A (x100, Tr. Masson's)

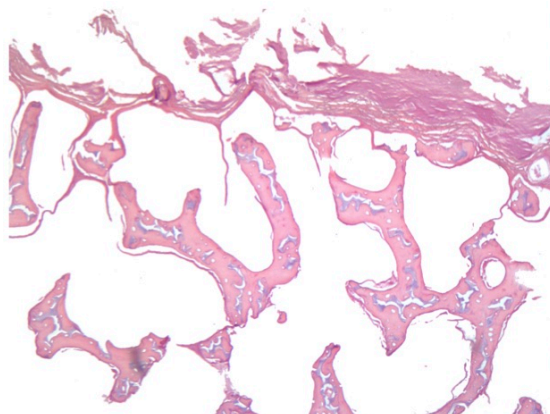


Εικόνα 39: BE3A (x100, Tr. Masson's)

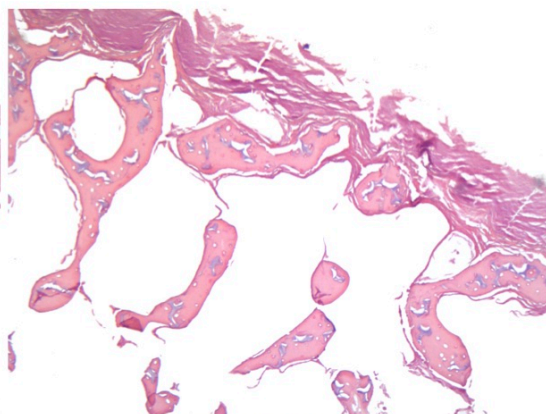


Εικόνα 40: BE3A (x100, Tr. Masson's)

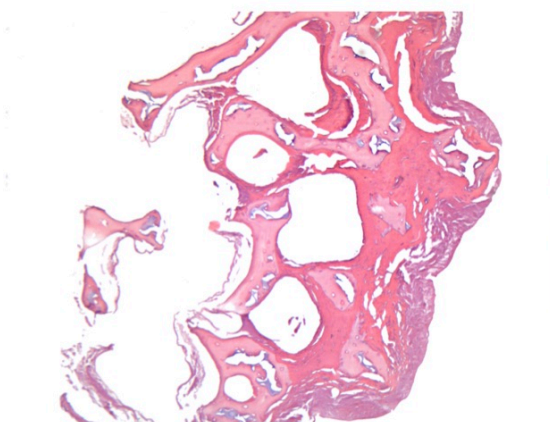
3. Ovis & Capra



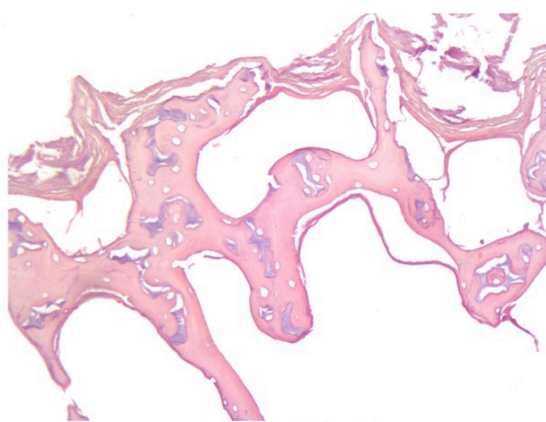
Εικόνα 1: OD 1.1 (x50, H&E)



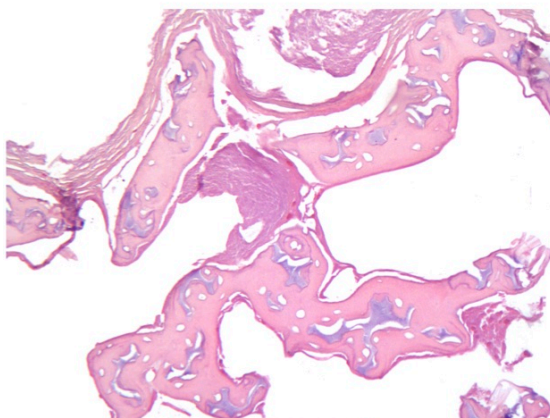
Εικόνα 2: OD 1.1 (x50, H&E)



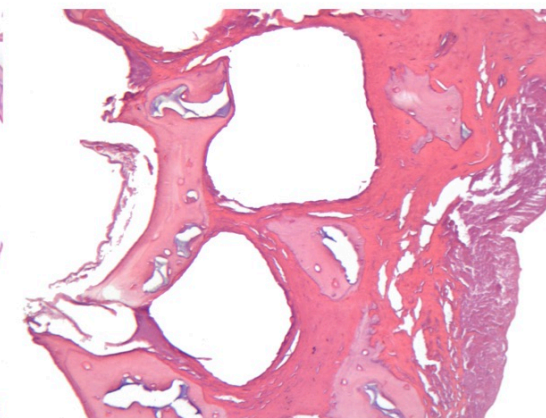
Εικόνα 3: OD 1.1 (x50, H&E)



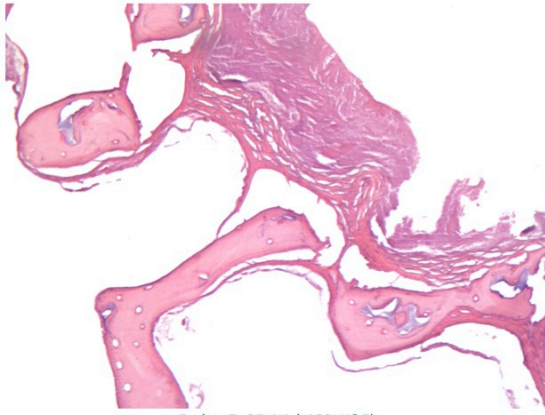
Εικόνα 4: OD 1.1 (x100, H&E)



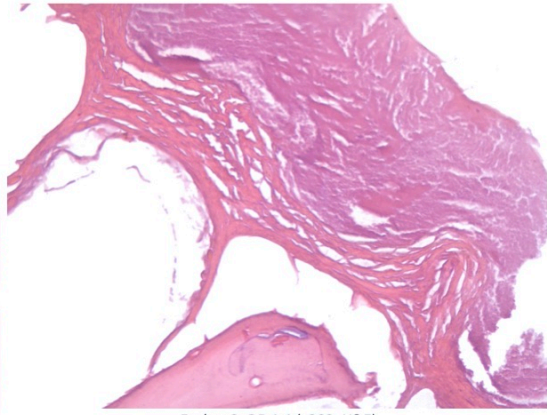
Εικόνα 5: OD 1.1 (x100, H&E)



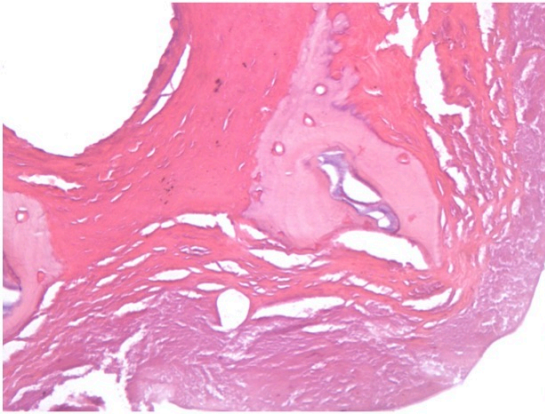
Εικόνα 6: OD 1.1 (x100, H&E)



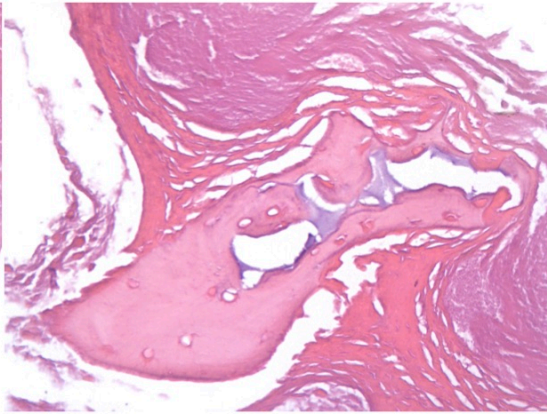
Εικόνα 7: OD 1.1 (x100, H&E)



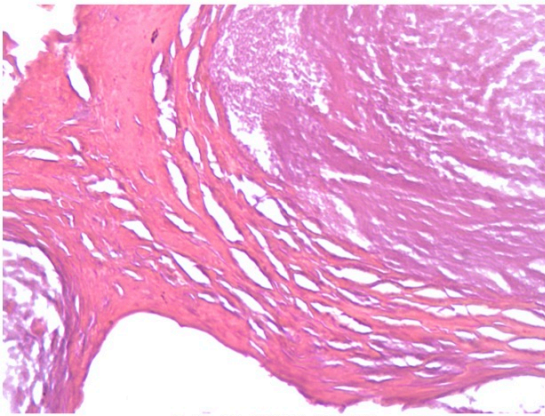
Εικόνα 8: OD 1.1 (x200, H&E)



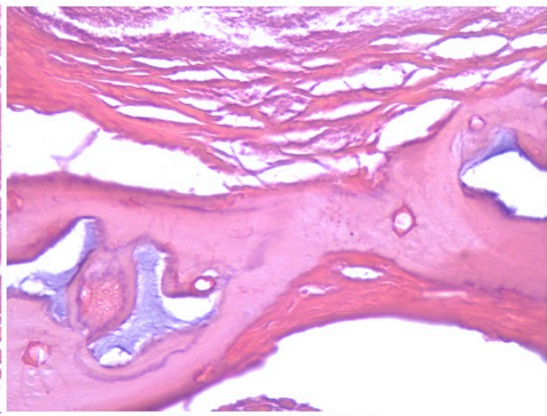
Εικόνα 9: OD 1.1 (x200, H&E)



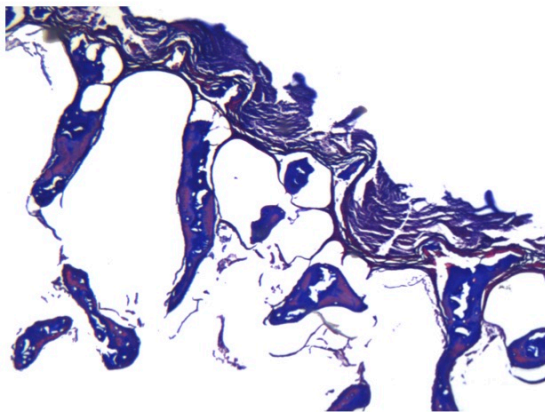
Εικόνα 10: OD 1.1 (x200, H&E)



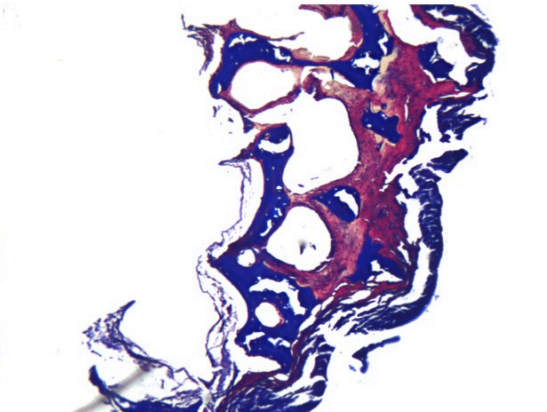
Εικόνα 11: OD 1.1 (x400, H&E)



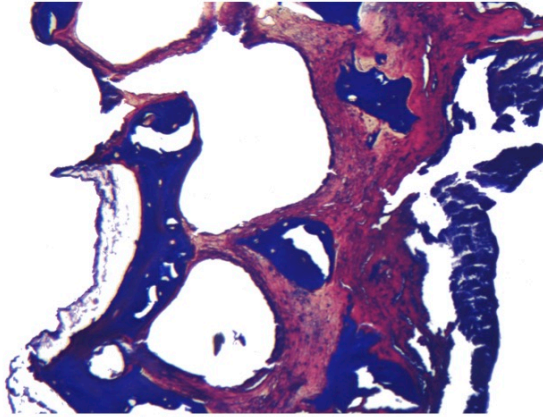
Εικόνα 12: OD 1.1 (x400, H&E)



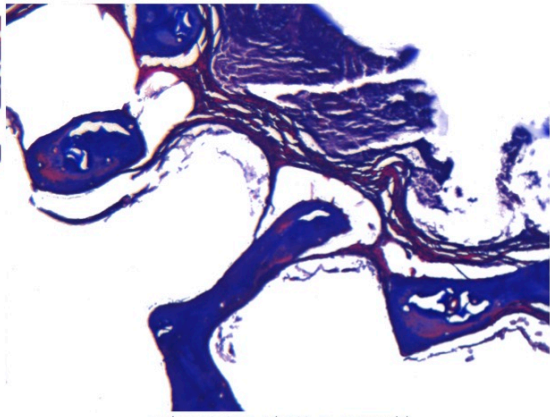
Εικόνα 13: OD 1.1 (x50, Tr. Masson's's)



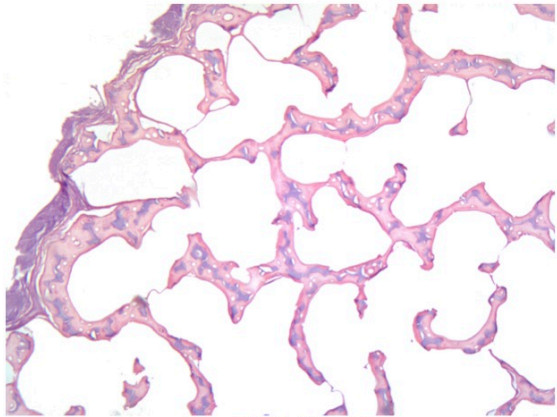
Εικόνα 14: OD 1.1 (x50, Tr. Masson's's)



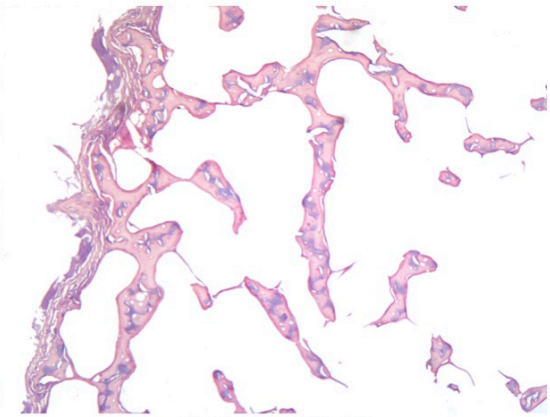
Εικόνα 15: OD 1.1 (x100, Tr. Masson's)



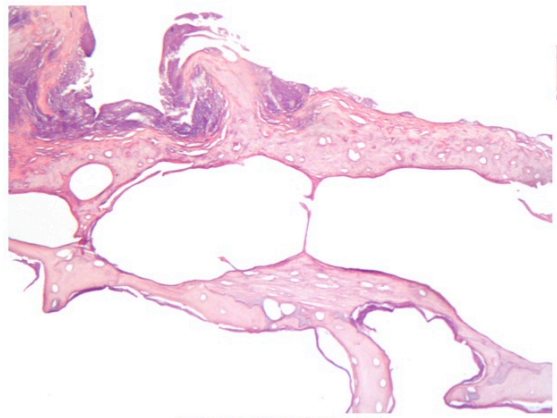
Εικόνα 16: OD 1.1 (x100, Tr. Masson's)



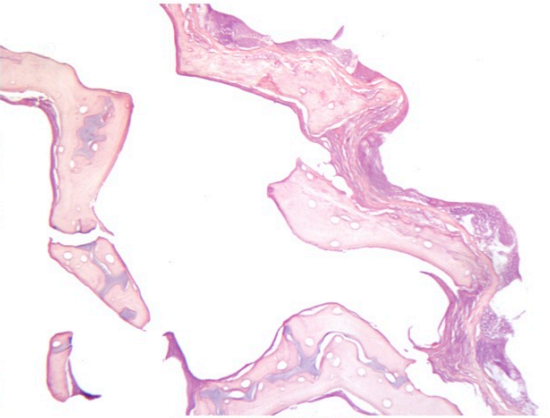
Εικόνα 17: OD 2.1 (x50, H&E)



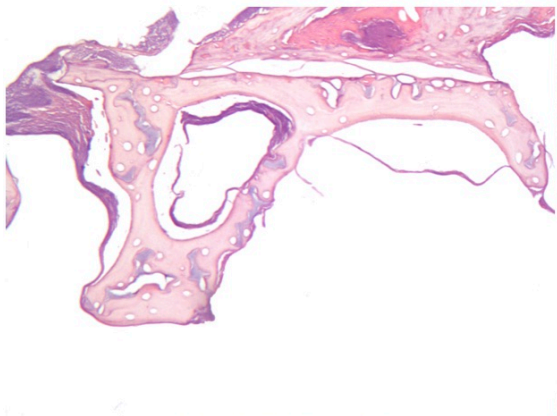
Εικόνα 18: OD 2.1 (x50, H&E)



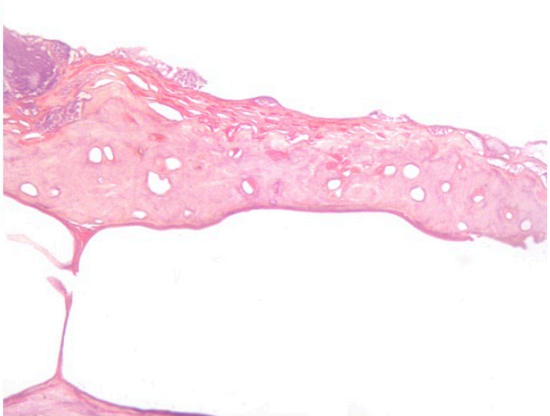
Εικόνα 19: OD 2.1 (x100, H&E)



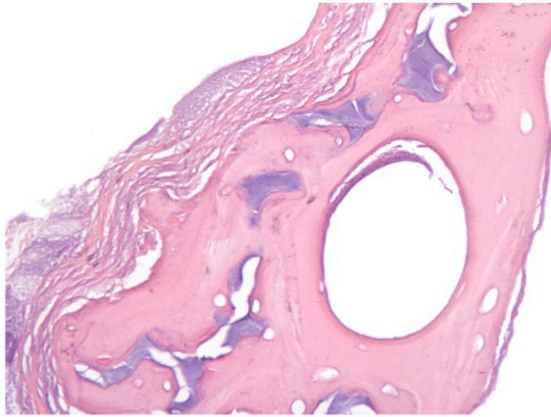
Εικόνα 20: OD 2.1 (x100, H&E)



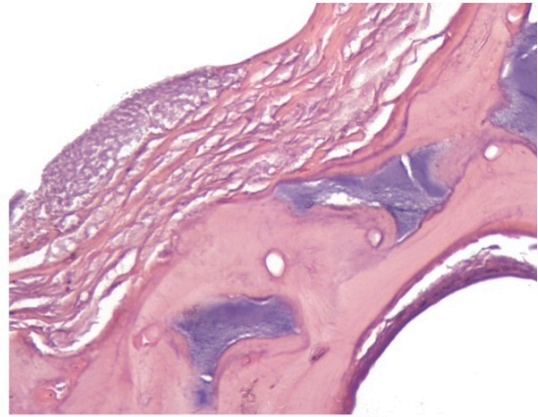
Εικόνα 21: OD 2.1 (x100, H&E)



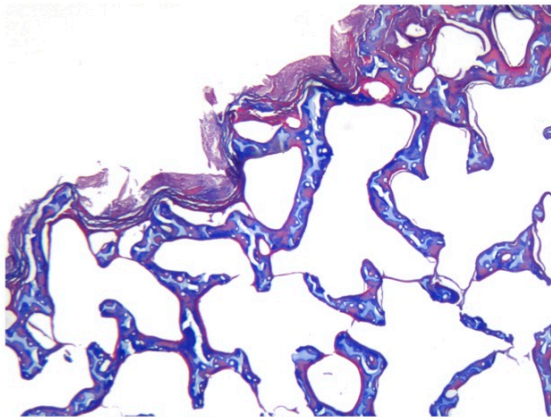
Εικόνα 22: OD 2.1 (x200, H&E)



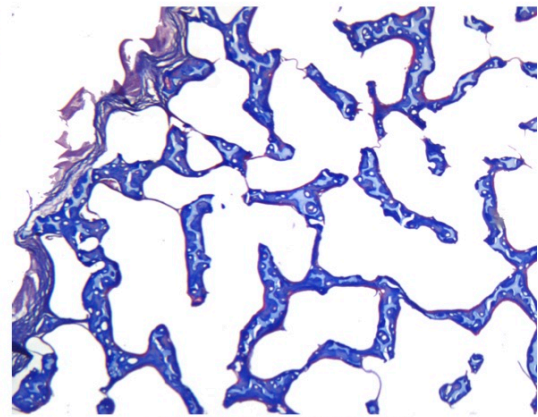
Εικόνα 23: OD 2.2 (x200, H&E)



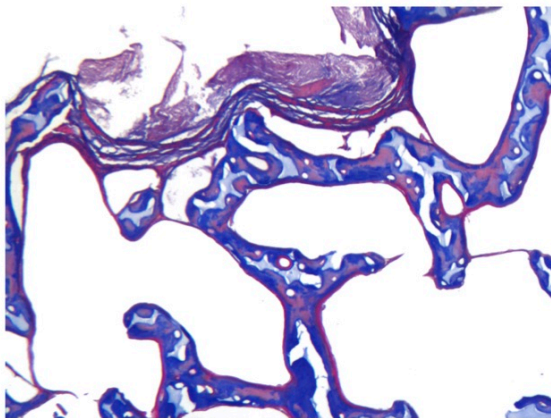
Εικόνα 24: OD 2.2 (x400, H&E)



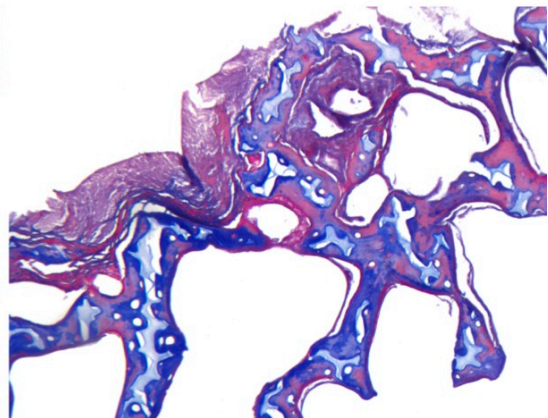
Εικόνα 25: OD 2.1 (x50, Tr. Masson's)



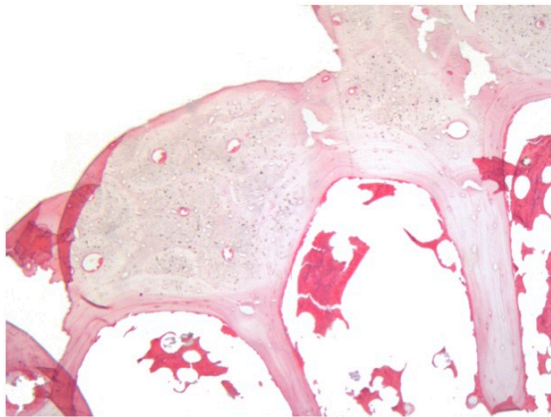
Εικόνα 26: OD 2.1 (x50, Tr. Masson's)



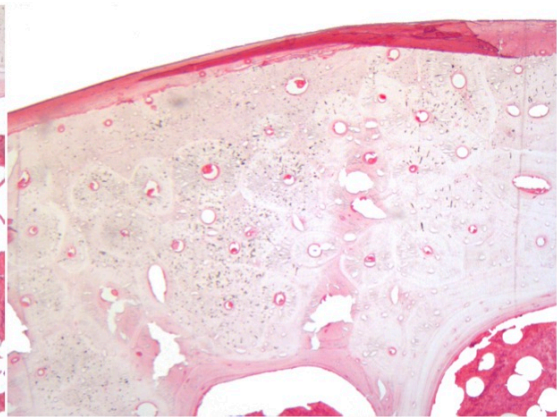
Εικόνα 27: OD 2.1 (x100, Tr. Masson's)



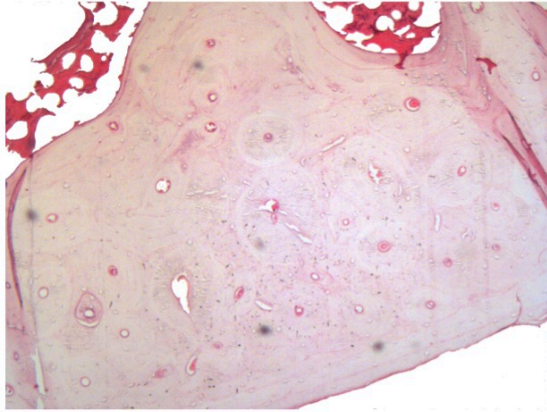
Εικόνα 28: OD 2.1 (x100, Tr. Masson's)



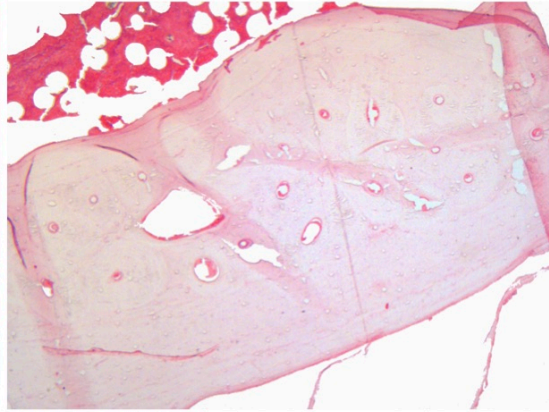
Εικόνα 29: OD 3.2 (x50, H&E)



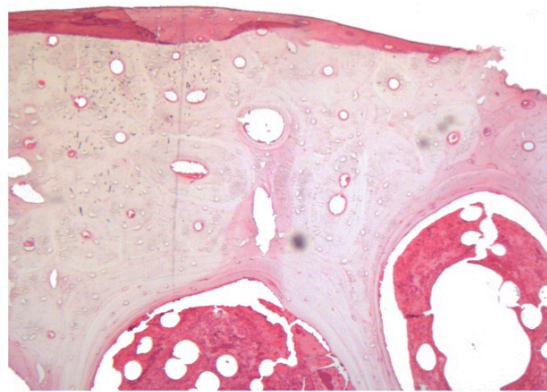
Εικόνα 30: OD 3.2 (x50, H&E)



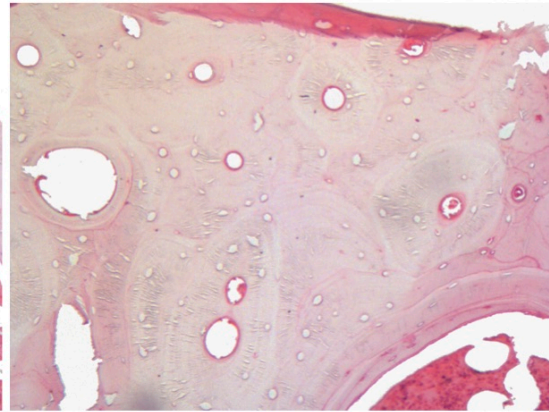
Εικόνα 31: OD 3.2 (x50, H&E)



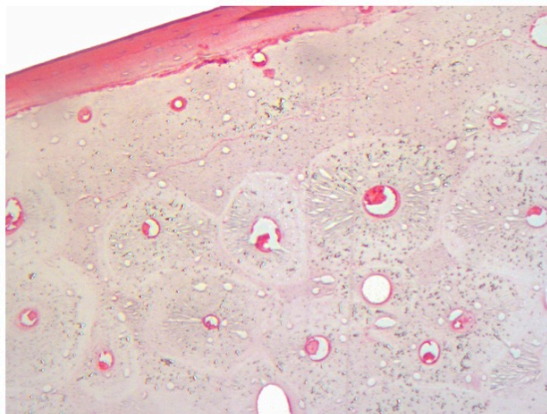
Εικόνα 32: OD 3.2 (x50, H&E)



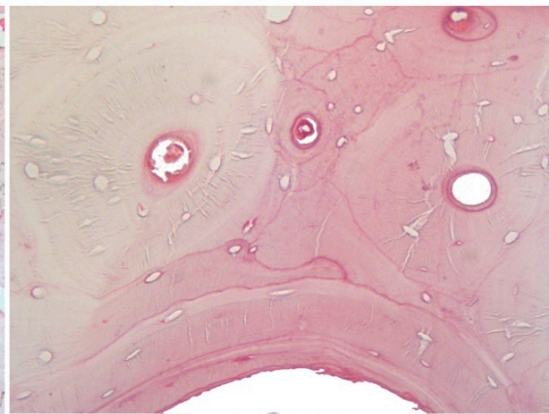
Εικόνα 33: OD 3.2 (x50, H&E)



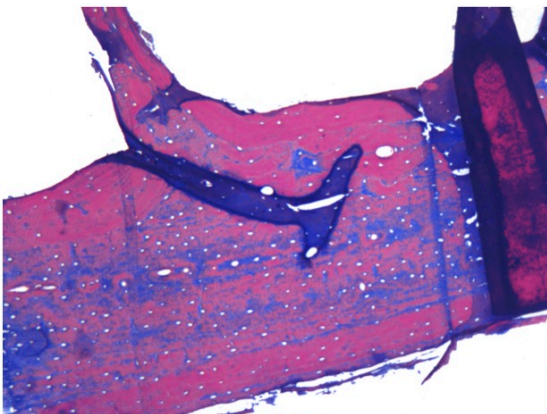
Εικόνα 34: OD 3.2 (x100, H&E)



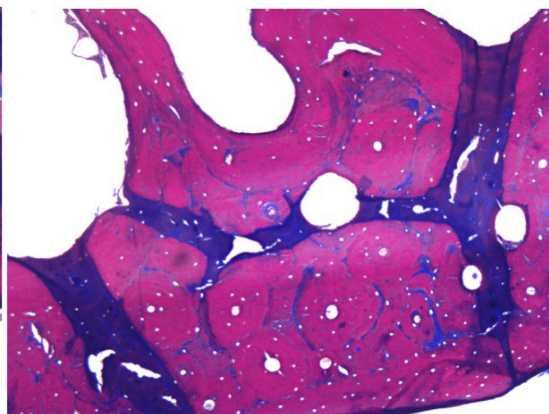
Εικόνα 35: OD 3.2 (x100, H&E)



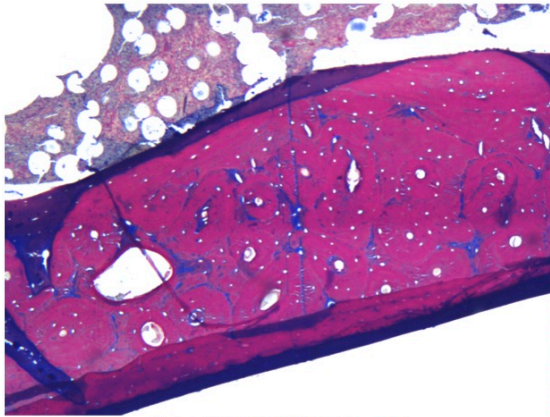
Εικόνα 36: OD 3.2 (x200, H&E)



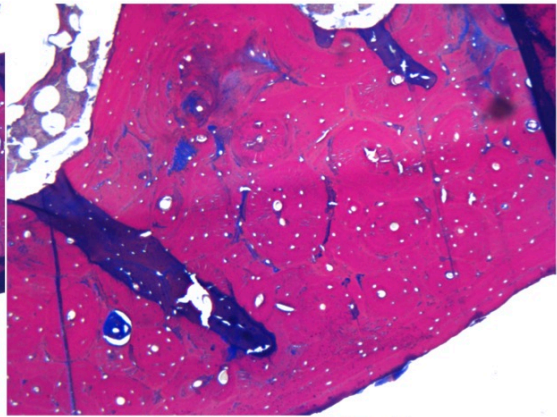
Εικόνα 37: OD 3.2 (x50, Tr. Masson's)



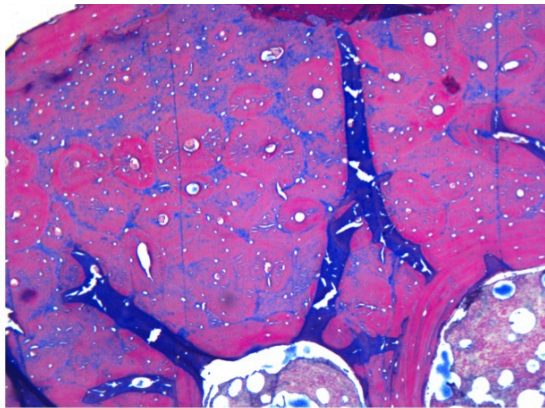
Εικόνα 38: OD 3.2 (x50, Tr. Masson's)



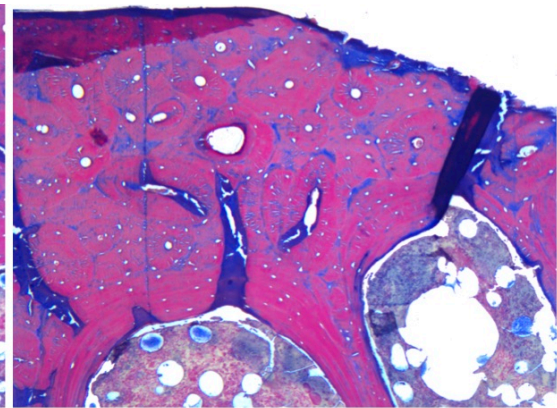
Εικόνα 39: OD 3.2 (x50, Tr. Masson's)



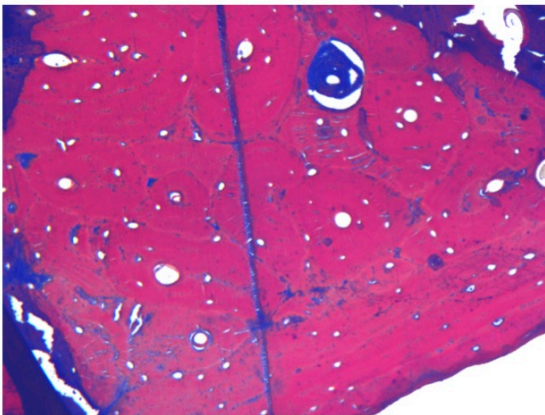
Εικόνα 40: OD 3.2 (x50, Tr. Masson's)



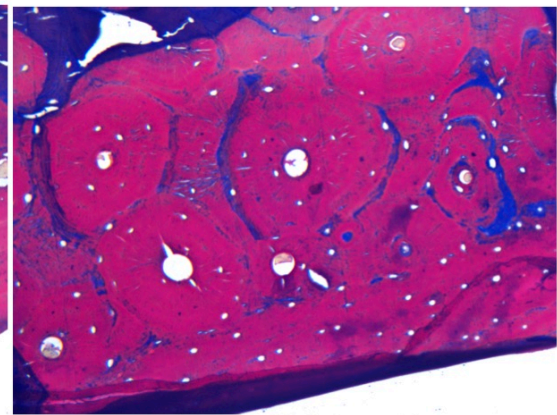
Εικόνα 41: OD 3.2 (x50, Tr. Masson's)



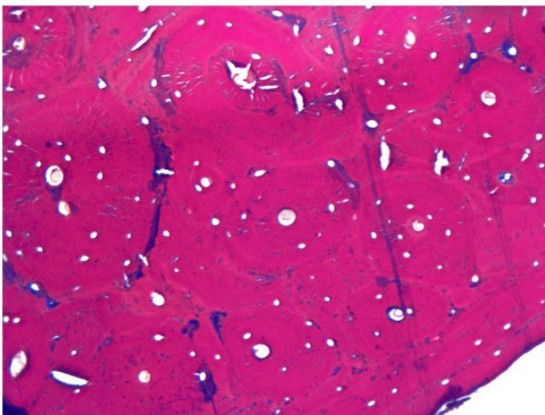
Εικόνα 42: OD 3.2 (x50, Tr. Masson's)



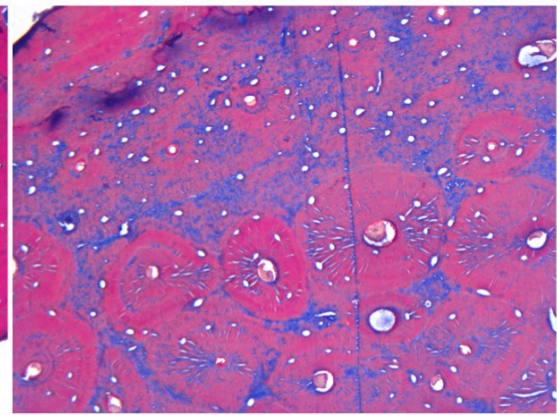
Εικόνα 43: OD 3.2 (x100, Tr. Masson's)



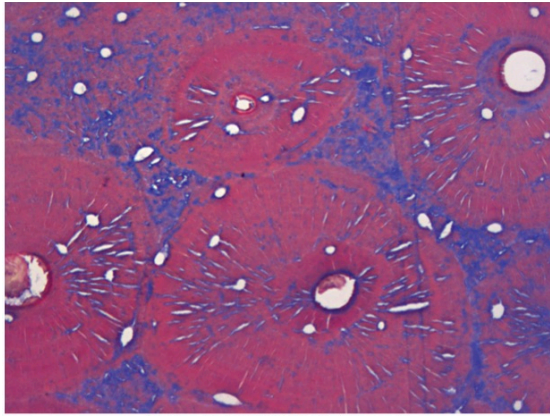
Εικόνα 44: OD 3.2 (x100, Tr. Masson's)



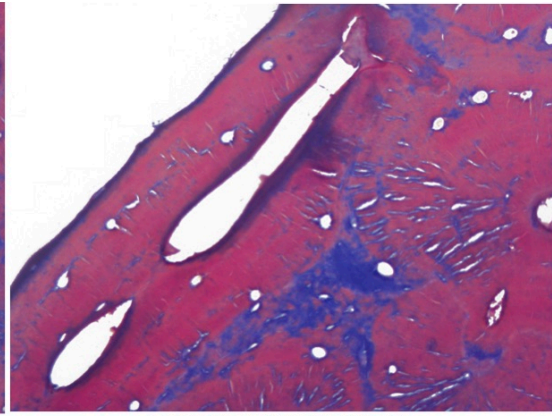
Εικόνα 45: OD 3.2 (x100, Tr. Masson's)



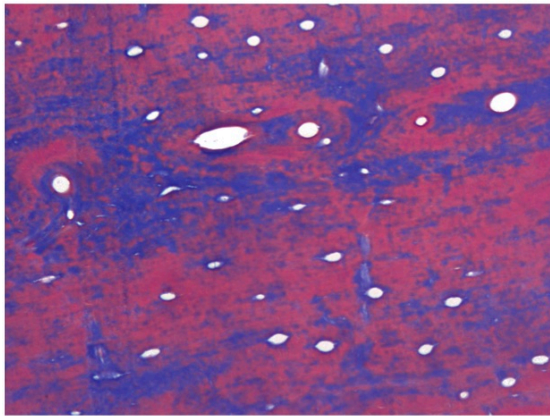
Εικόνα 46: OD 3.2 (x100, Tr. Masson's)



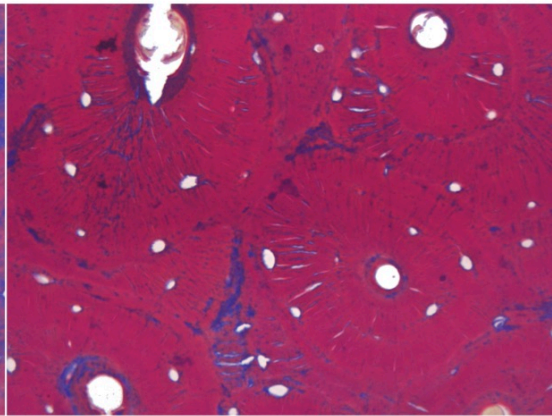
Εικόνα 47: OD 3.2 (x200, Tr. Masson's)



Εικόνα 48: OD 3.2 (x200, Tr. Masson's)

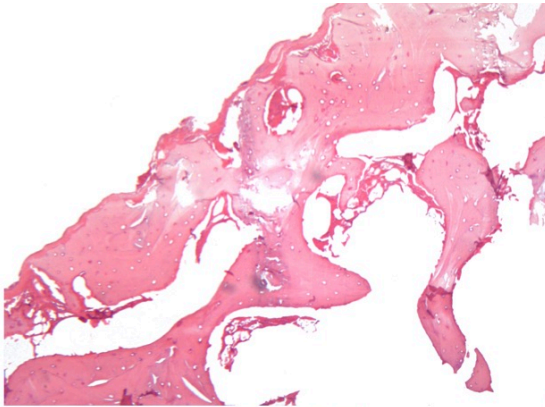


Εικόνα 49: OD 3.2 (x200, Tr. Masson's)

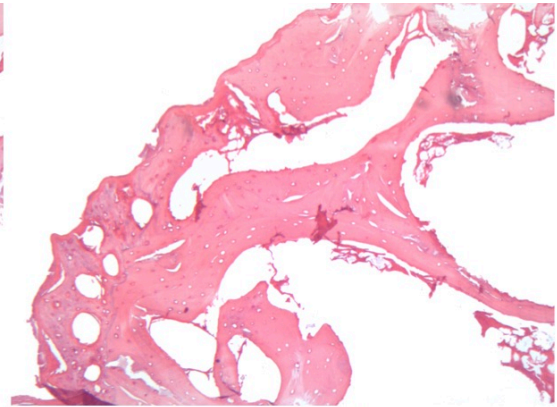


Εικόνα 50: OD 3.2 (x200, Tr. Masson's)

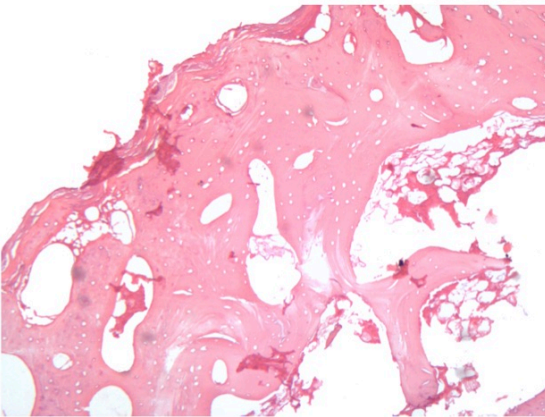
4. *Sus scrofa domestica*



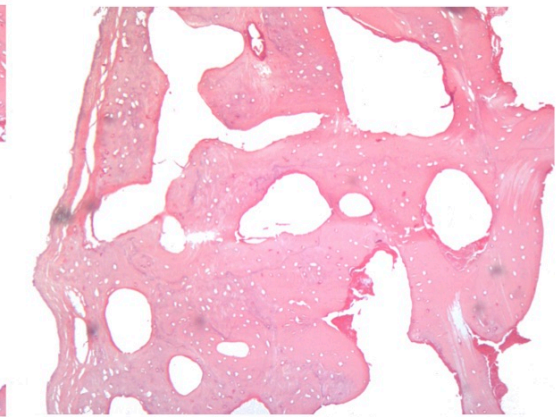
Εικόνα 1: SC 1.1 (x50, H&E)



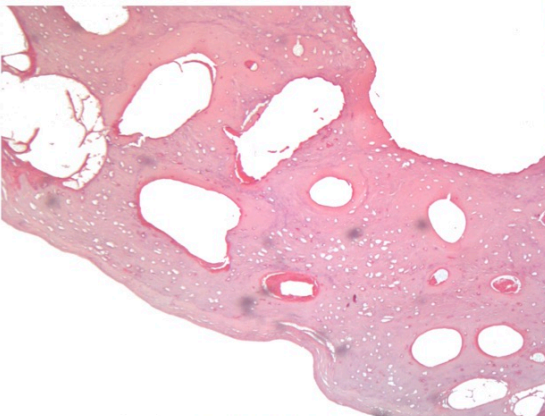
Εικόνα 2: SC 1.1 (x50, H&E)



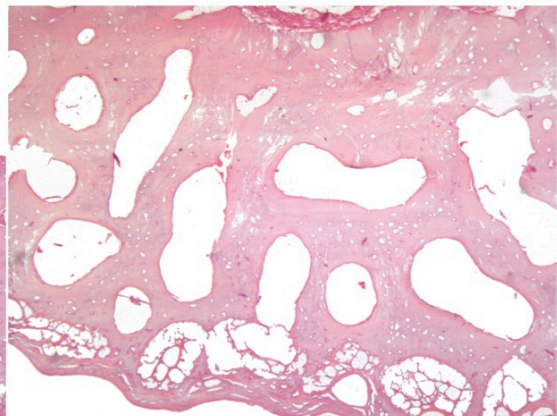
Εικόνα 3: SC 1.1 (x50, H&E)



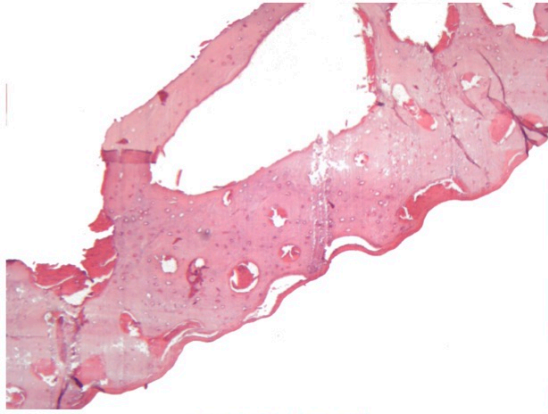
Εικόνα 4: SC 1.1 (x50, H&E)



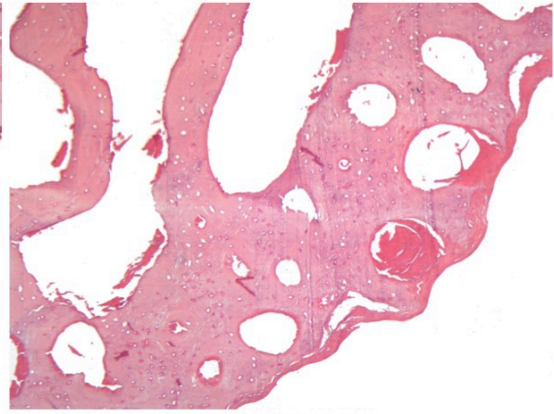
Εικόνα 5: SC 1.1 (x50, H&E)



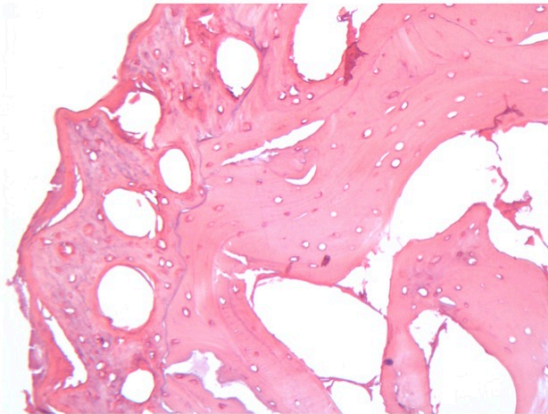
Εικόνα 6: SC 1.1 (x50, H&E)



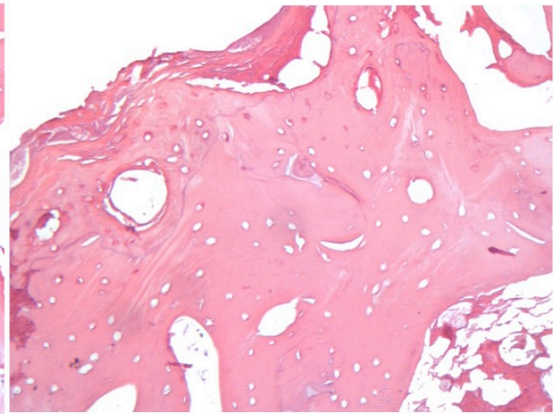
Εικόνα 7: SC 1.1 (x50, H&E)



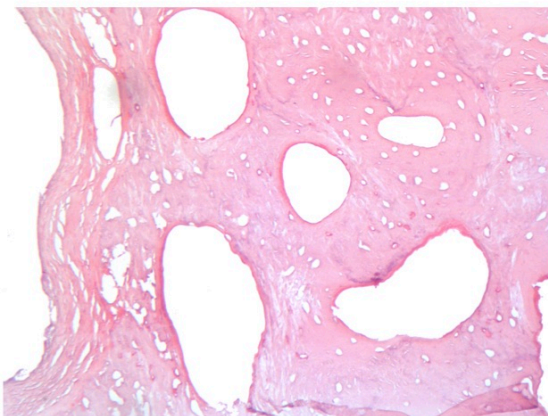
Εικόνα 8: SC 1.1 (x50, H&E)



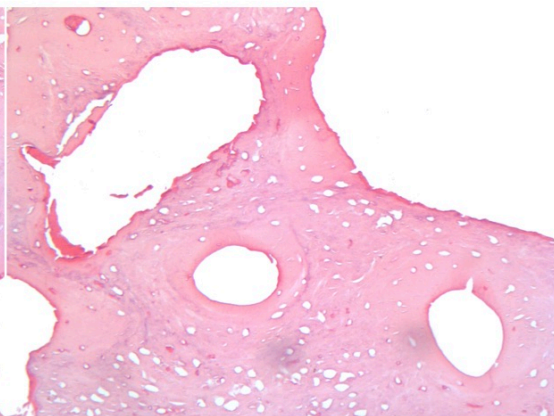
Εικόνα 9: SC 1.1 (x100, H&E)



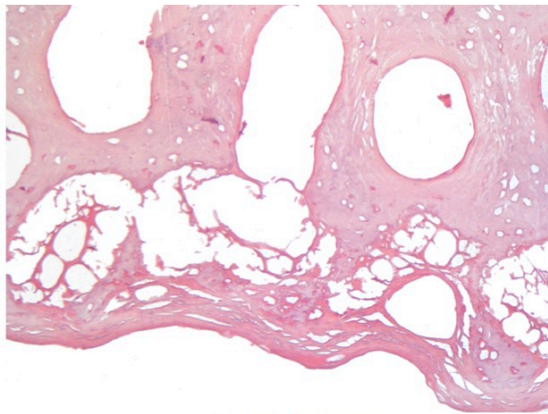
Εικόνα 10: SC 1.1 (x100, H&E)



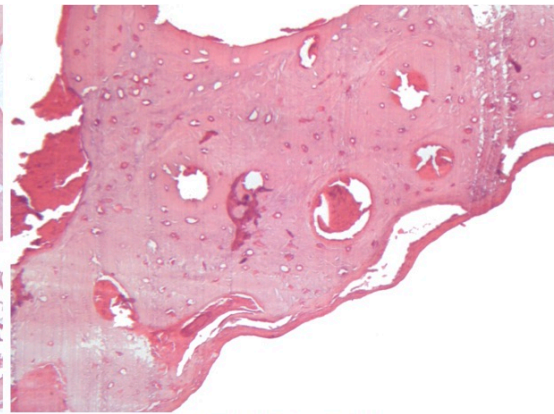
Εικόνα 11: SC 1.1 (x100, H&E)



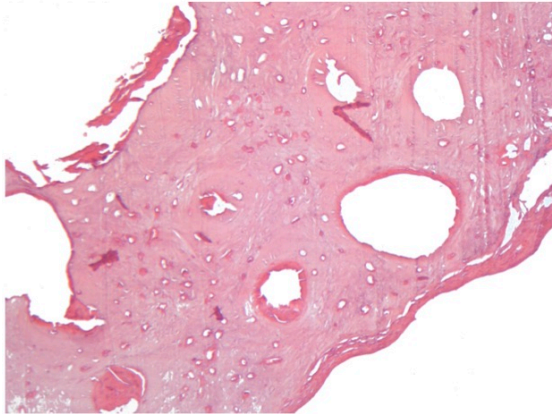
Εικόνα 12: SC 1.1 (x100, H&E)



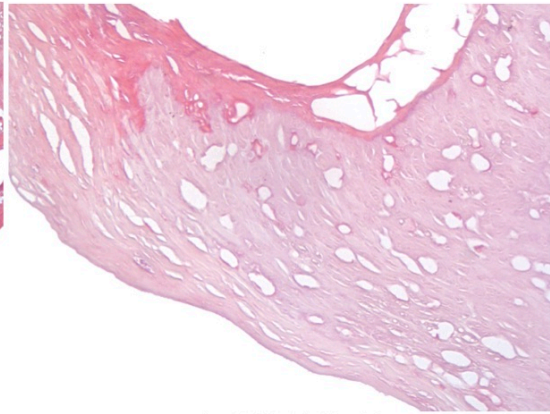
Εικόνα 13: SC 1.1 (x100, H&E)



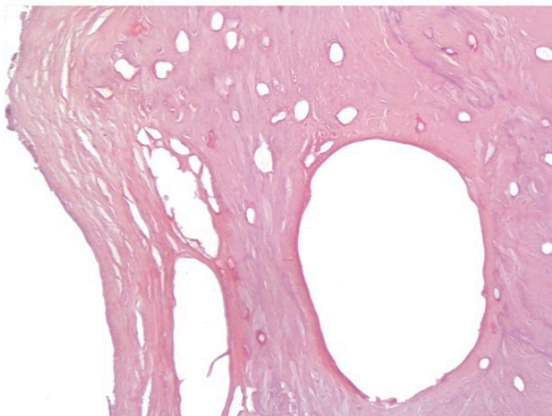
Εικόνα 14: SC 1.1 (x100, H&E)



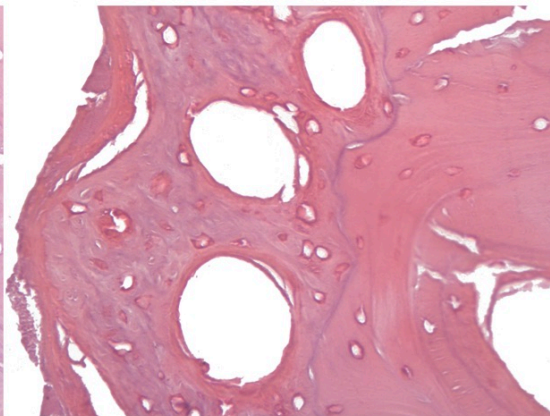
Εικόνα 15: SC 1.1 (x100, H&E)



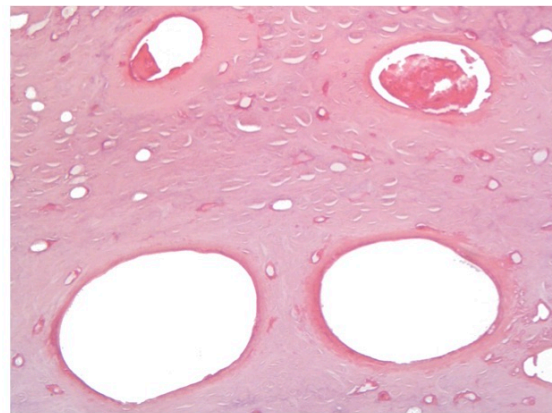
Εικόνα 16: SC 1.1 (x200, H&E)



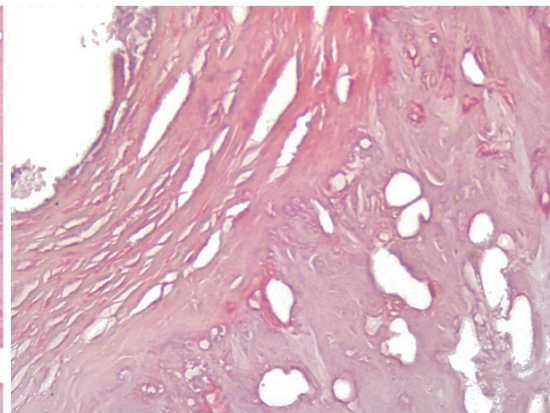
Εικόνα 17: SC 1.1 (x200, H&E)



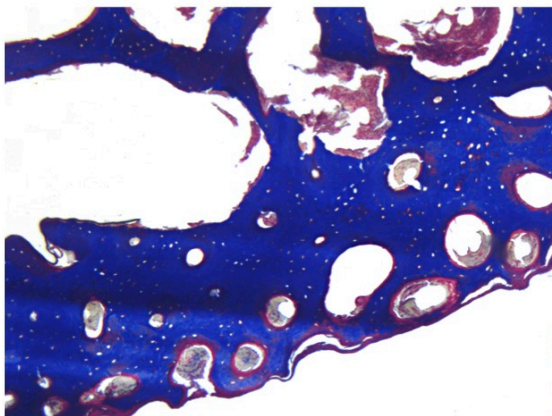
Εικόνα 18: SC 1.1 (x200, H&E)



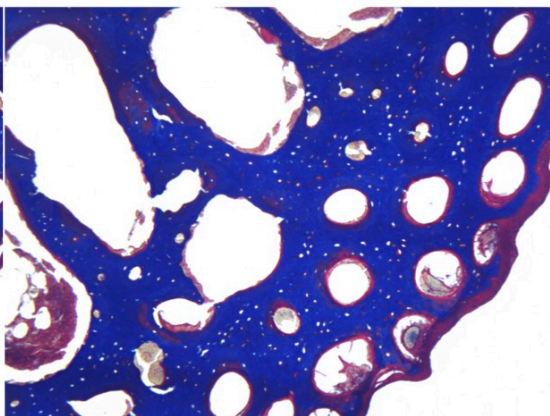
Εικόνα 19: SC 1.1 (x200, H&E)



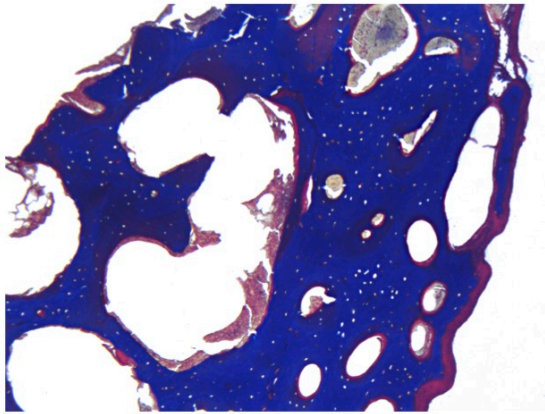
Εικόνα 20: SC 1.1 (x400, H&E)



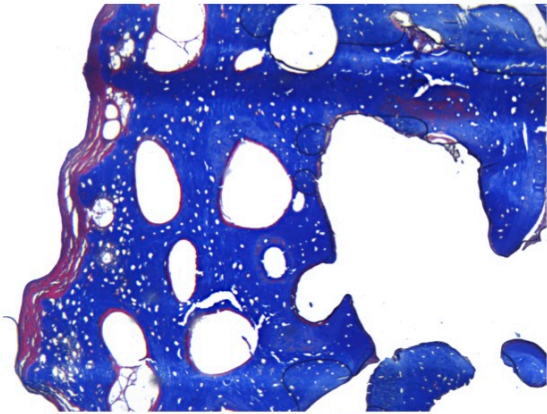
Εικόνα 21: SC 1.3 (x50, Tr. Masson's)



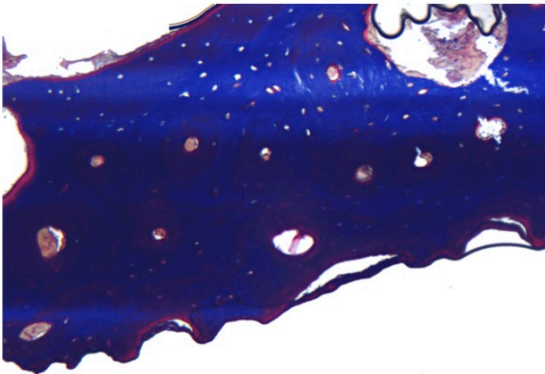
Εικόνα 22: SC 1.3 (x50, Tr. Masson's)



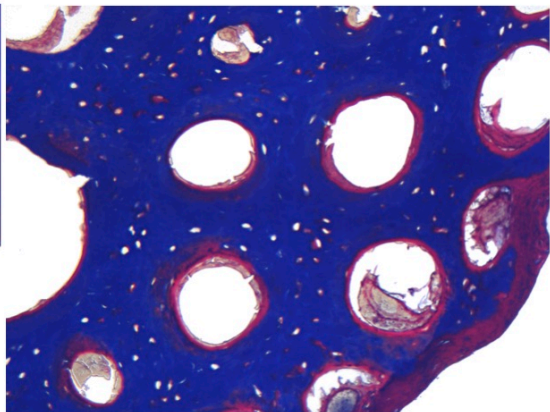
Εικόνα 23: SC 1.3 (x50, Tr. Masson's)



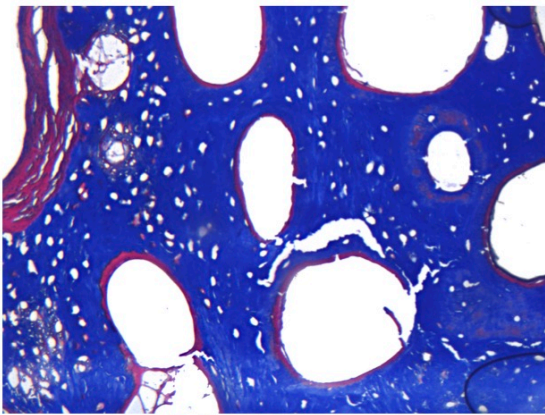
Εικόνα 24: SC 1.3 (x50, Tr. Masson's)



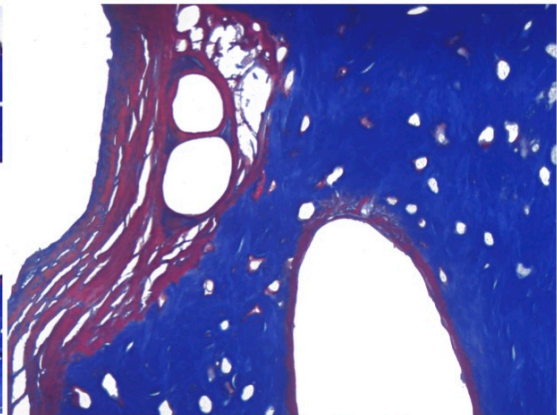
Εικόνα 25: SC 1.3 (x100, Tr. Masson's)



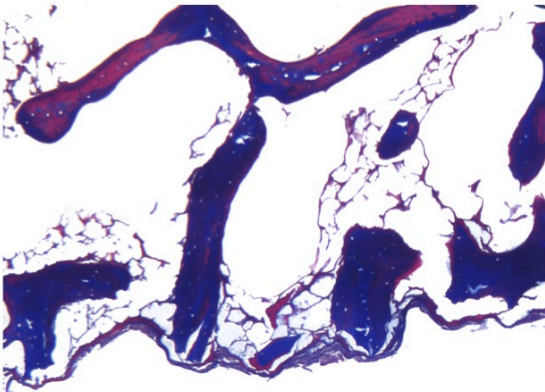
Εικόνα 26: SC 1.3 (x100, Tr. Masson's)



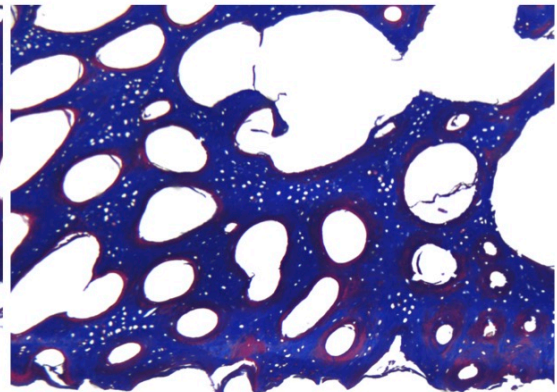
Εικόνα 27: SC 1.3 (x100, Tr. Masson's)



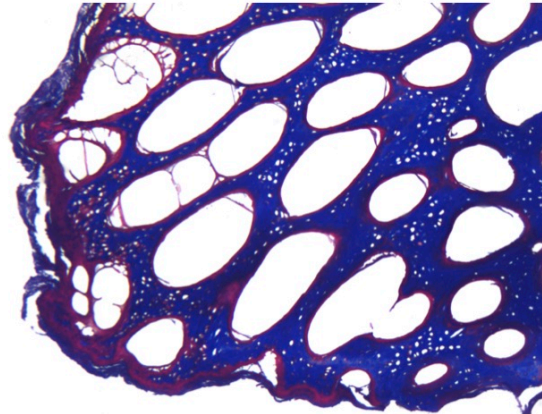
Εικόνα 28: SC 1.3 (x200, Tr. Masson's)



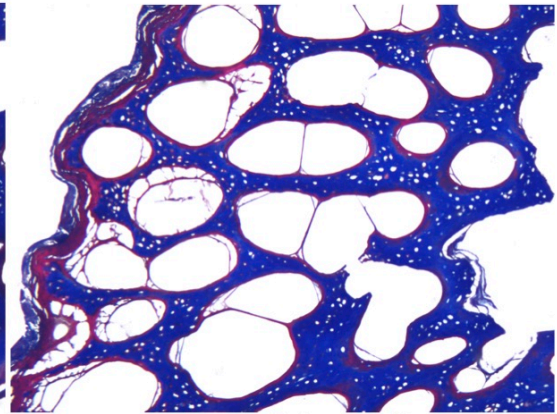
Εικόνα 29: SC 3.1 (x50, Tr. Masson's)



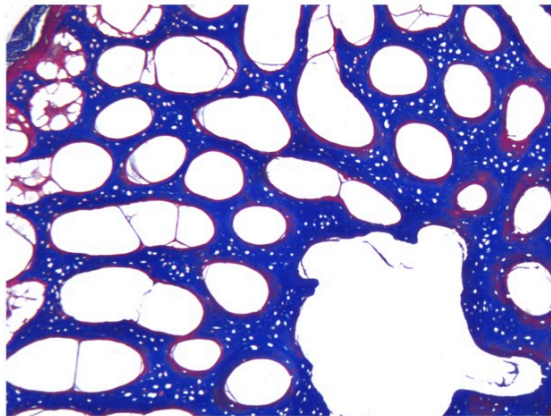
Εικόνα 30: SC 3.1 (x50, Tr. Masson's)



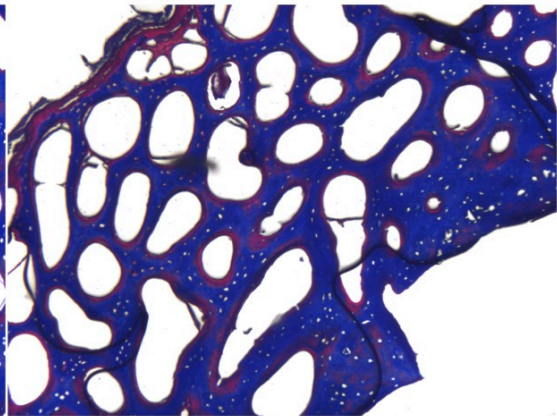
Εικόνα 31: SC 3.1 (x50, Tr. Masson's)



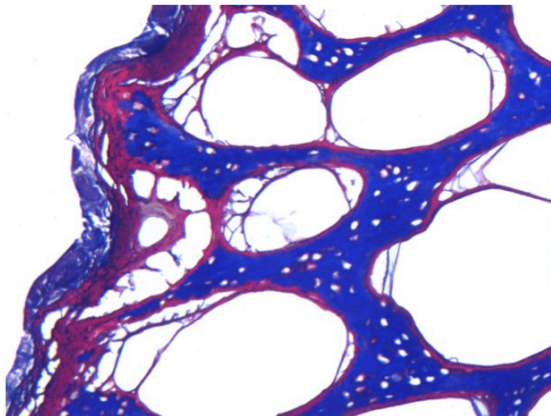
Εικόνα 32: SC 3.1 (x50, Tr. Masson's)



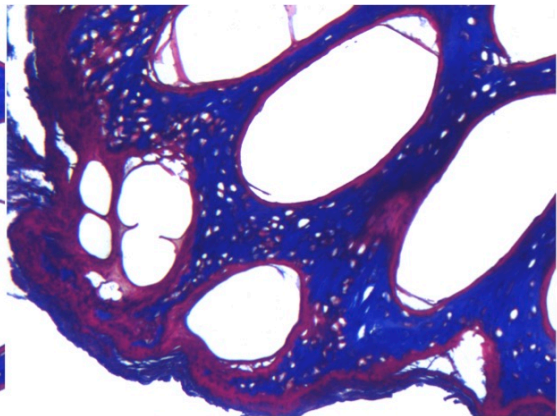
Εικόνα 33: SC 3.1 (x50, Tr. Masson's)



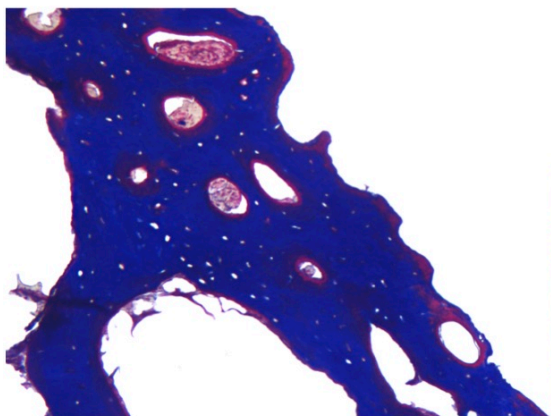
Εικόνα 34: SC 3.1 (x50, Tr. Masson's)



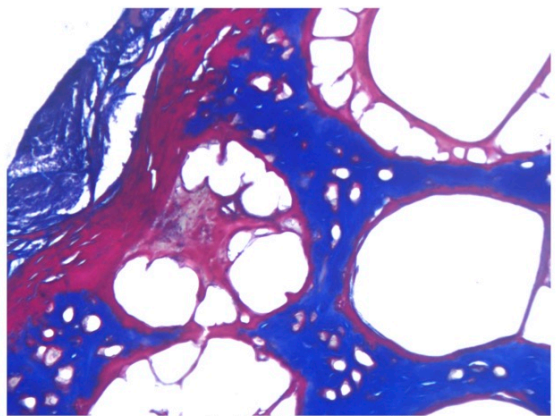
Εικόνα 35: SC 3.1 (x100, Tr. Masson's)



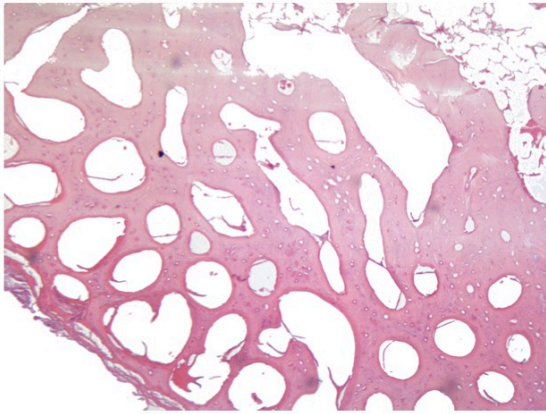
Εικόνα 36: SC 3.1 (x100, Tr. Masson's)



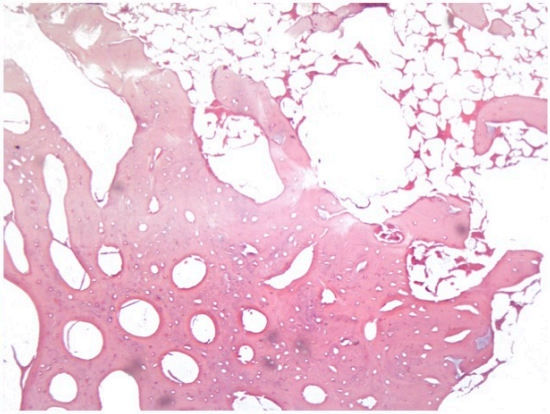
Εικόνα 37: SC 3.1 (x100, Tr. Masson's)



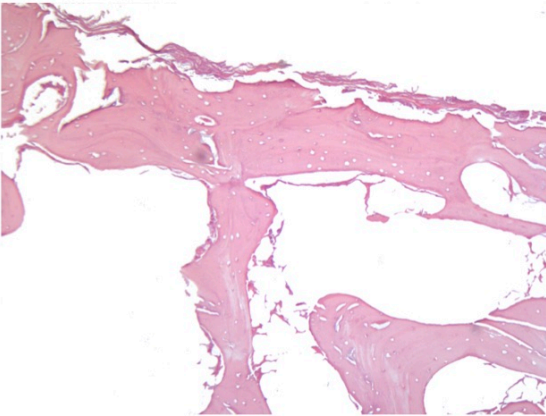
Εικόνα 38: SC 3.1 (x200, Tr. Masson's)



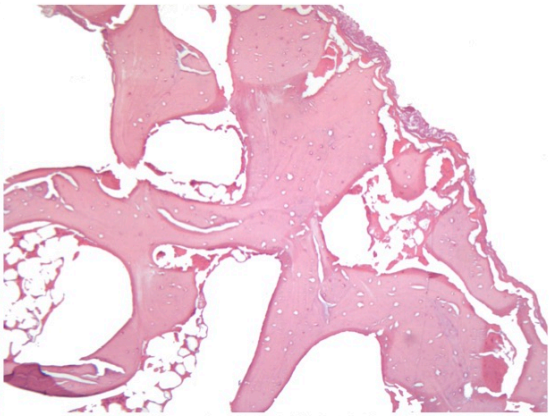
Εικόνα 39: SC 3.3 (x50, H&E)



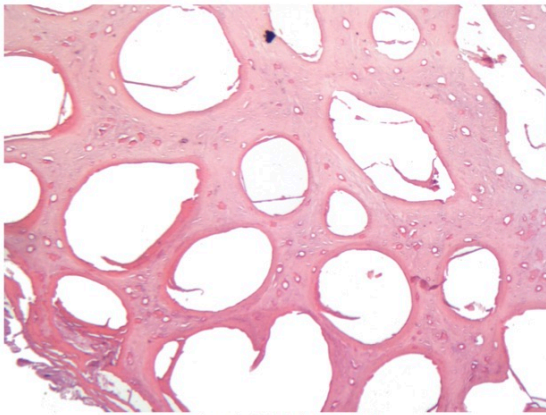
Εικόνα 40: SC 3.3 (x50, H&E)



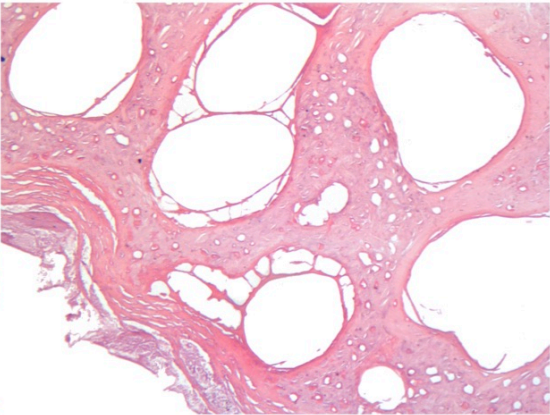
Εικόνα 41: SC 3.3 (x50, H&E)



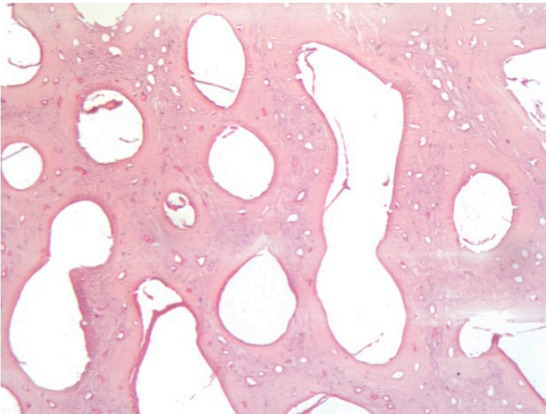
Εικόνα 42: SC 3.3 (x50, H&E)



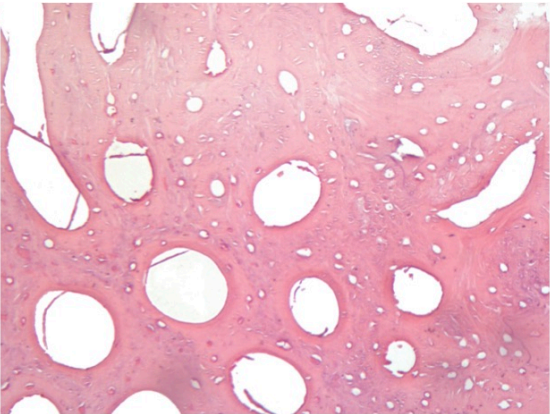
Εικόνα 43: SC 3.3 (x100, H&E)



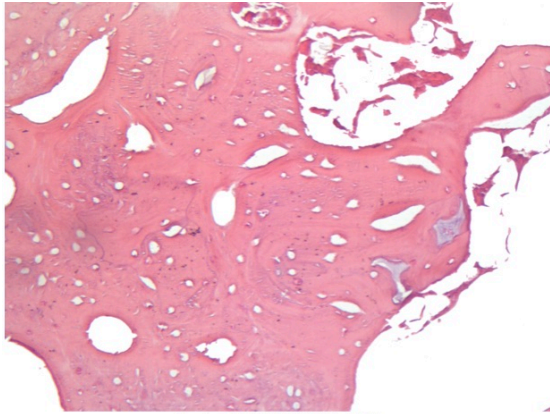
Εικόνα 44: SC 3.3 (x100, H&E)



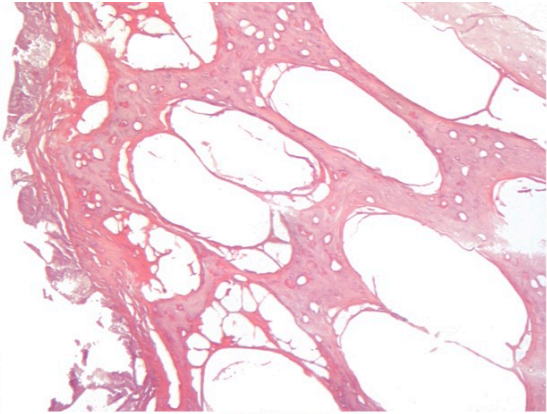
Εικόνα 45: SC 3.3 (x100, H&E)



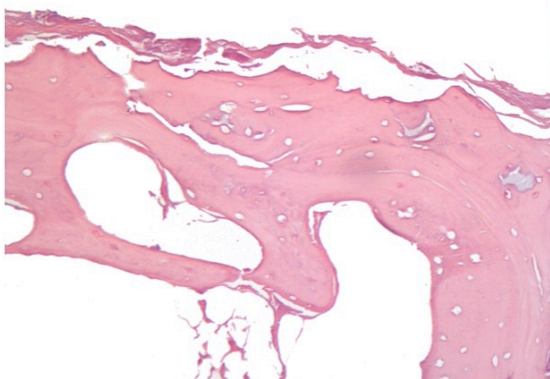
Εικόνα 46: SC 3.3 (x100, H&E)



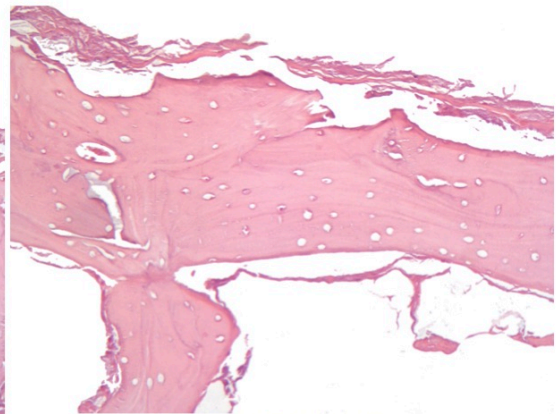
Εικόνα 47: SC 3.3 (x100, H&E)



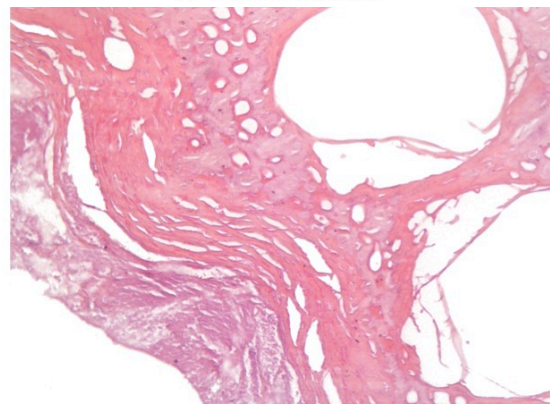
Εικόνα 48: SC 3.3 (x100, H&E)



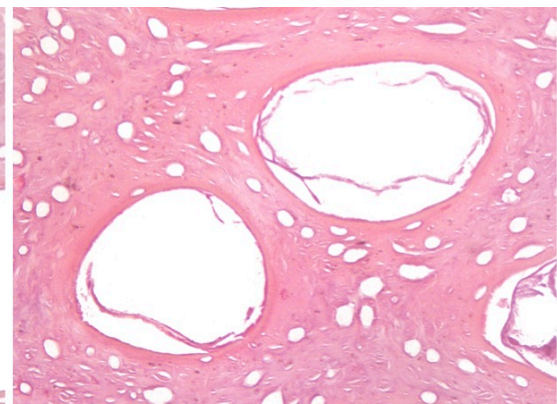
Εικόνα 49: SC 3.3 (x100, H&E)



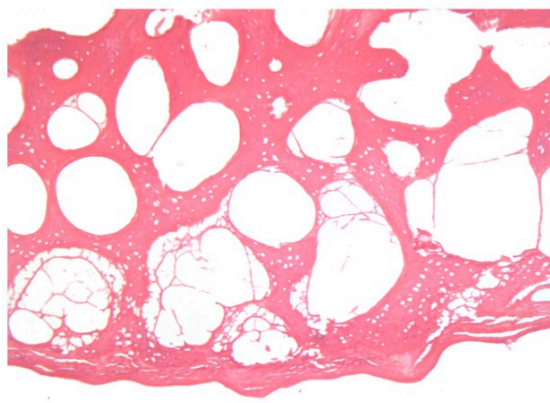
Εικόνα 50: SC 3.3 (x100, H&E)



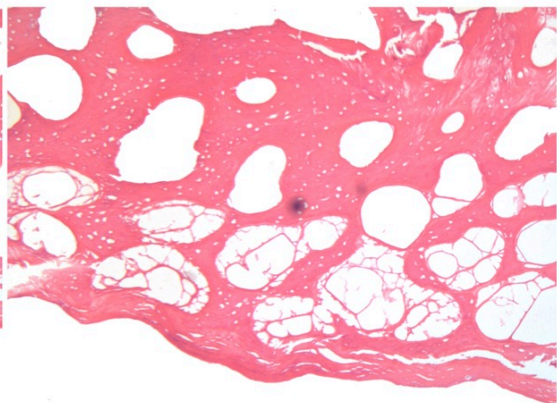
Εικόνα 51: SC 3.3 (x200, H&E)



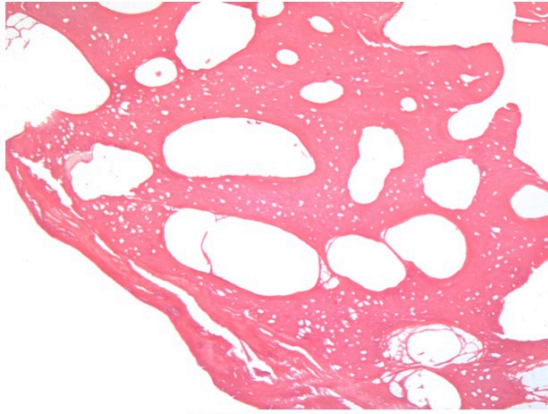
Εικόνα 52: SC 3.3 (x200, H&E)



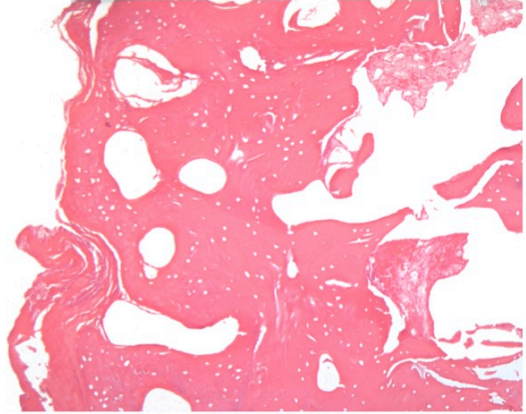
Εικόνα 53: SCA_1 (x50, H&E)



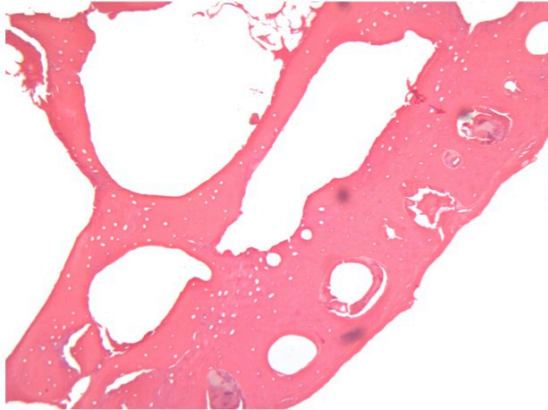
Εικόνα 54: SCA_3 (x50, H&E)



Εικόνα 55: SCA (x50, H&E)



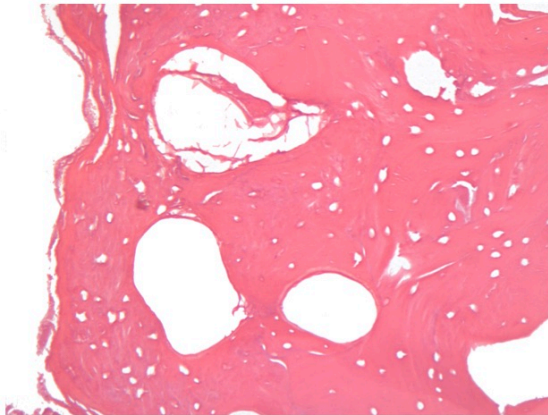
Εικόνα 56: SCA (x50, H&E)



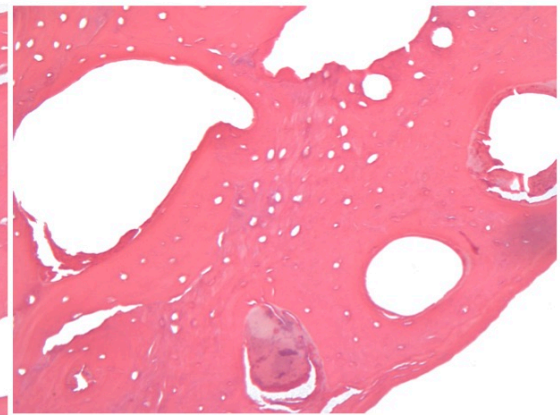
Εικόνα 57: SCA (x50, H&E)



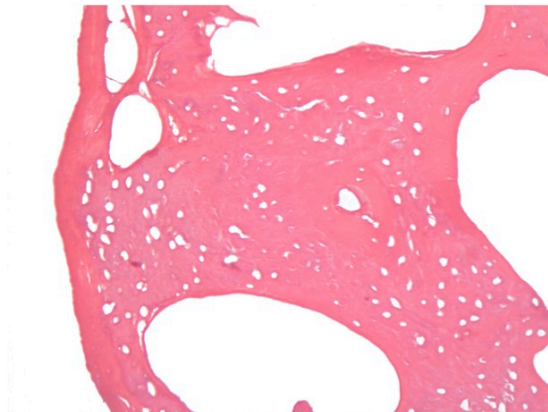
Εικόνα 58: SCA (x50, H&E)



Εικόνα 59: SCA (x100, H&E)



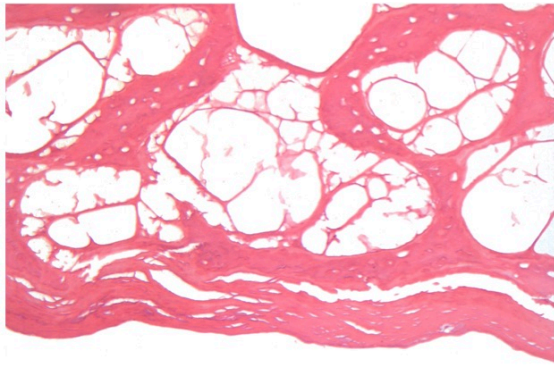
Εικόνα 60: SCA (x100, H&E)



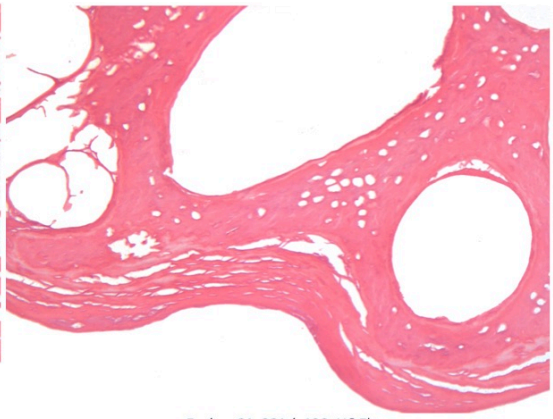
Εικόνα 61: SCA (x100, H&E)



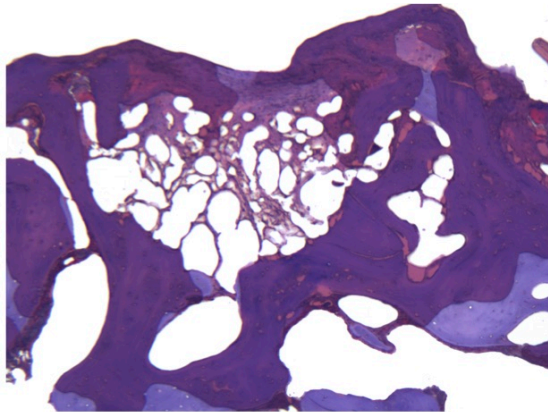
Εικόνα 62: SCA (x100, H&E)



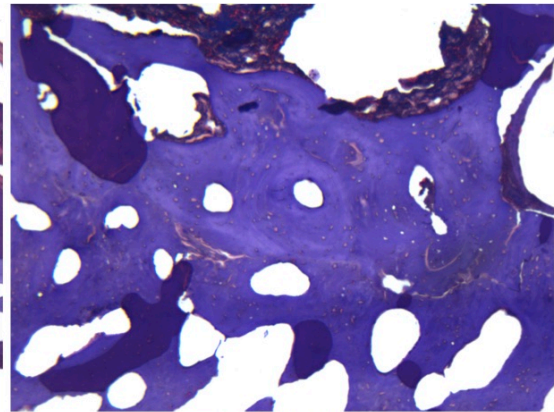
Εικόνα 63: SCA (x100, H&E)



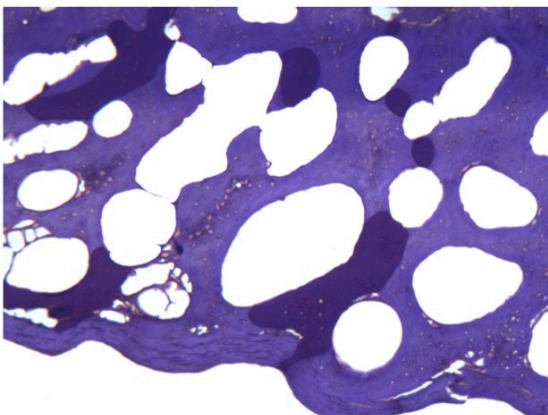
Εικόνα 64: SCA (x100, H&E)



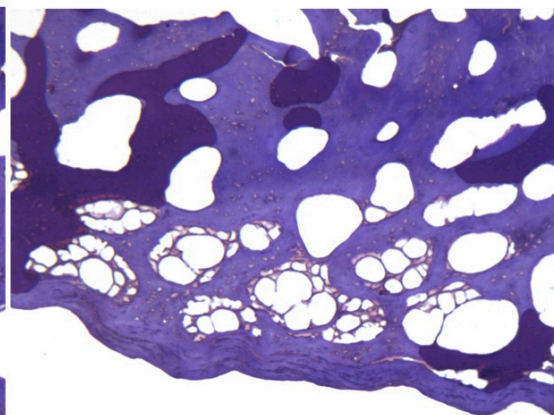
Εικόνα 65: SCA (x50, H&E)



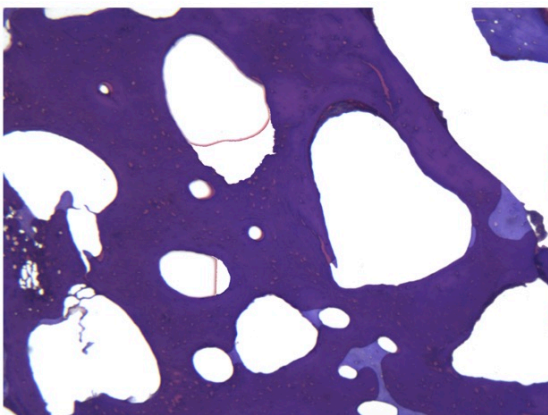
Εικόνα 66: SCA (x50, Tr. Masson's)



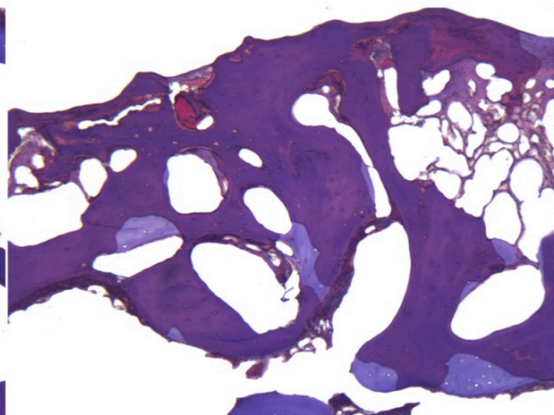
Εικόνα 67: SCA (x50, Tr. Masson's)



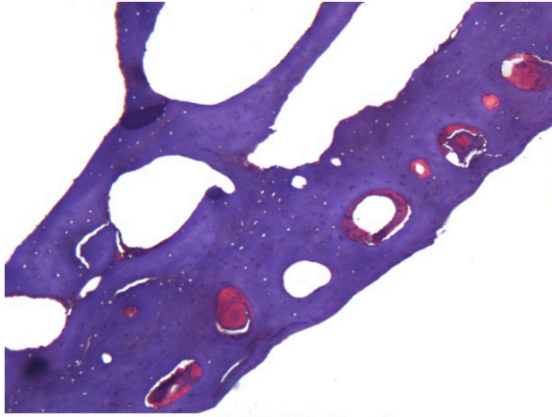
Εικόνα 68: SCA (x50, Tr. Masson's)



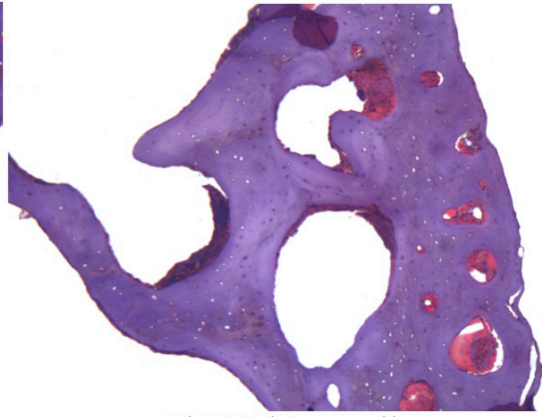
Εικόνα 69: SCA (x50, Tr. Masson's)



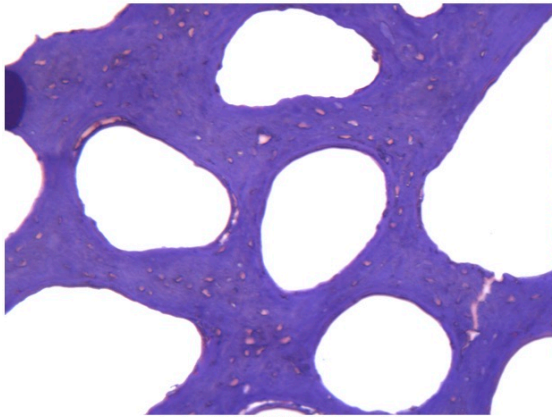
Εικόνα 70: SCA (x50, Tr. Masson's)



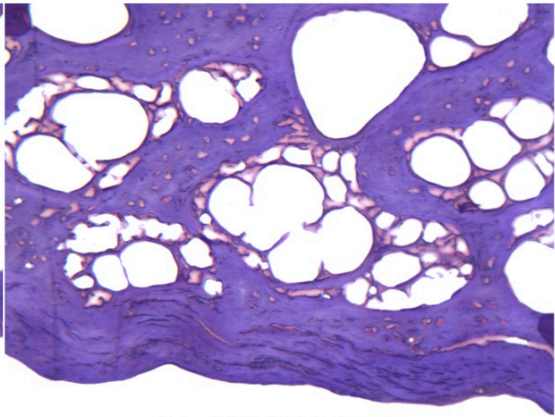
Εικόνα 71: SCA (x50, Tr. Masson's)



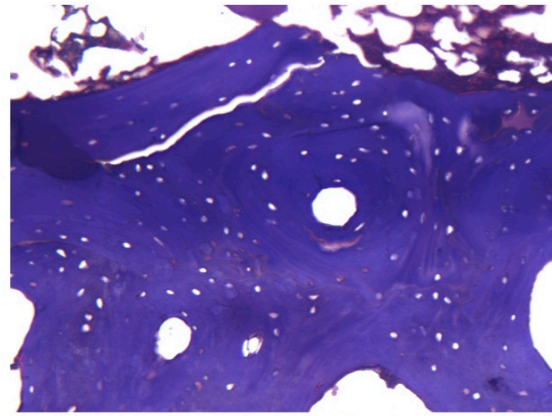
Εικόνα 72: SCA (x50, Tr. Masson's)



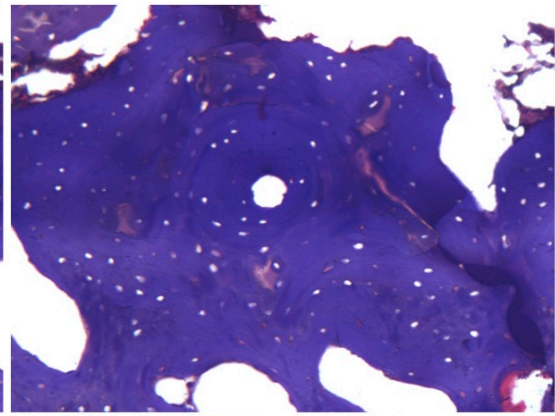
Εικόνα 73: SCA (x100, Tr. Masson's)



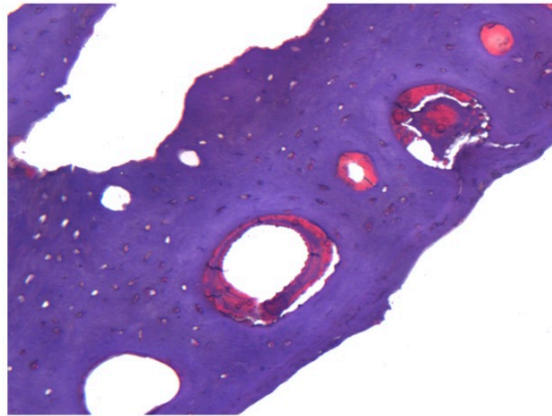
Εικόνα 74: SCA (x100, Tr. Masson's)



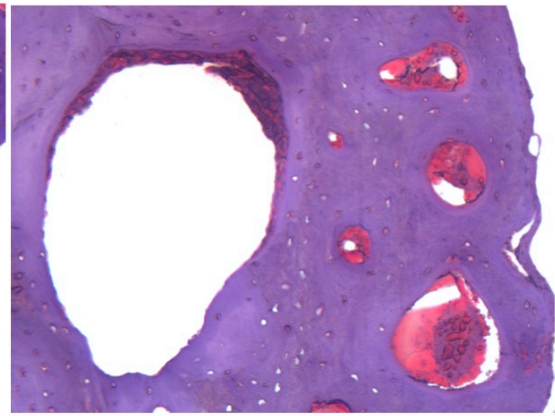
Εικόνα 75: SCA (x100, Tr. Masson's)



Εικόνα 76: SCA (x100, Tr. Masson's)



Εικόνα 77: SCA (x100, Tr. Masson's)

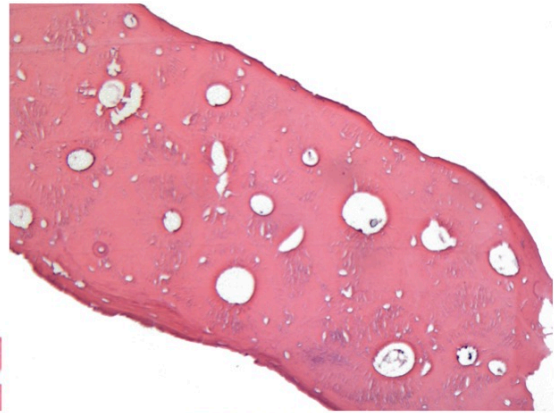


Εικόνα 78: SCA (x100, Tr. Masson's)

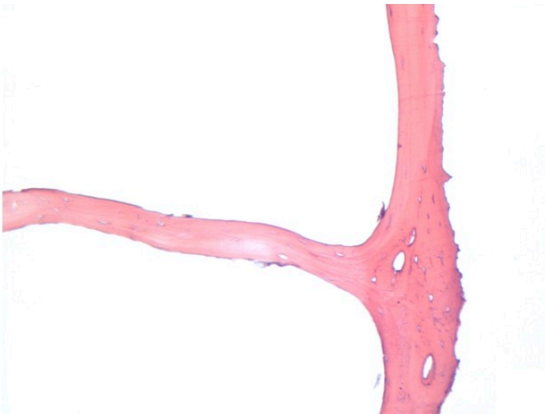
5. *Canis familiaris*



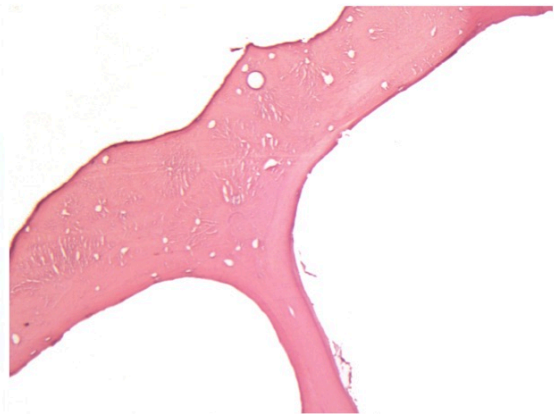
Εικόνα 1: CA 1.3 (x50, H&E)



Εικόνα 2: CA 1.3 (x100, H&E)



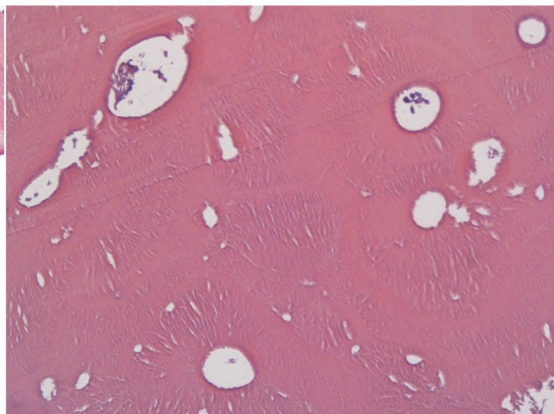
Εικόνα 3: CA 1.3 (x100, H&E)



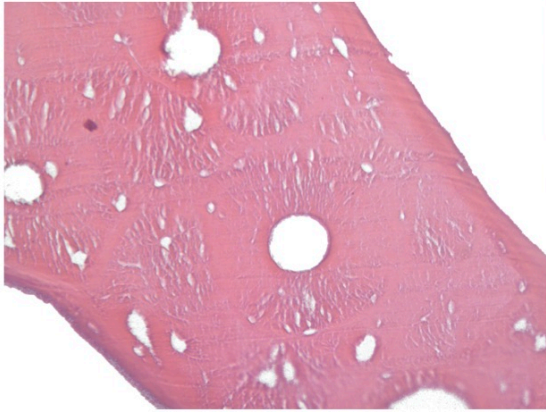
Εικόνα 4: CA 1.3 (x100, H&E)



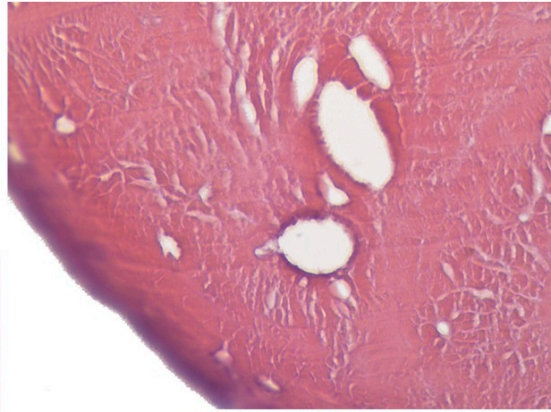
Εικόνα 5: CA 1.3 (x100, H&E)



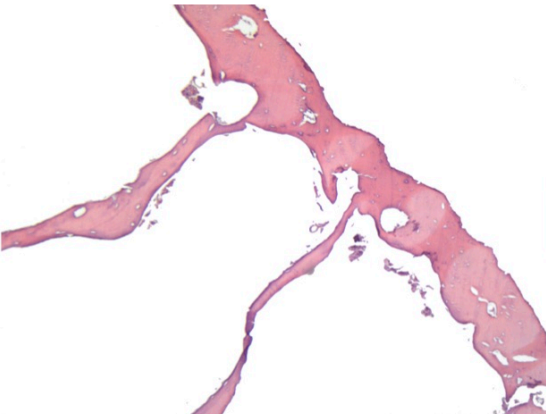
Εικόνα 6: CA 1.3 (x200, H&E)



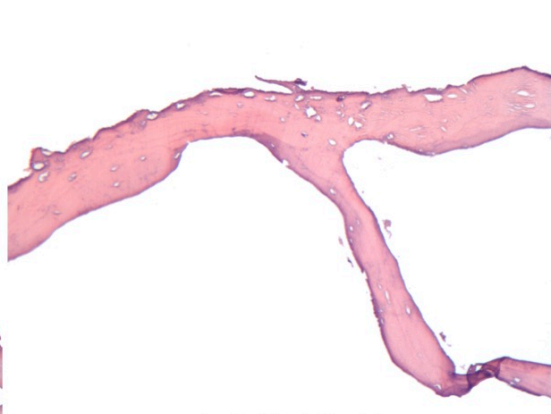
Εικόνα 7: CA 1.3 (x200, H&E)



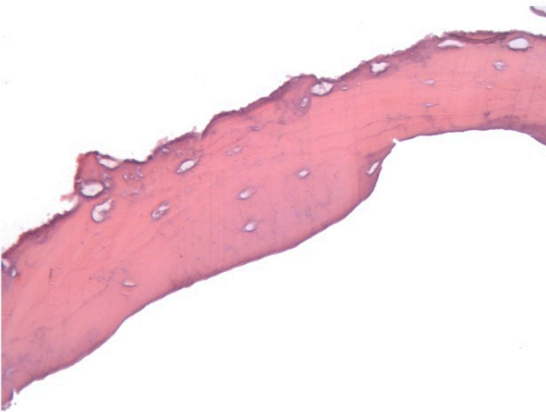
Εικόνα 8: CA 1.3 (x400, H&E)



Εικόνα 9: CA 2.1 (x50, H&E)



Εικόνα 10: CA 2.1 (x100, H&E)



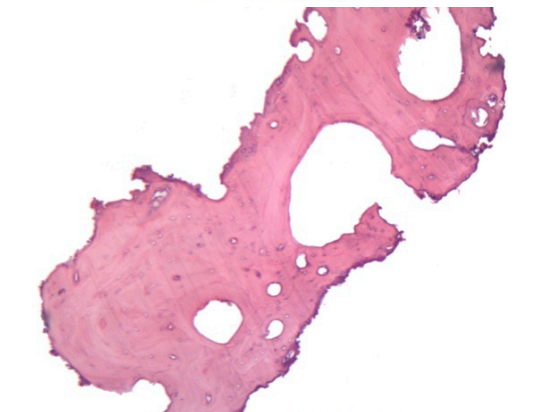
Εικόνα 11: CA 2.1 (x200, H&E)



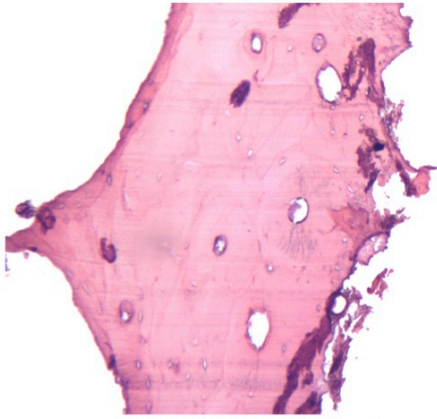
Εικόνα 12: CA 2.1 (x200, H&E)



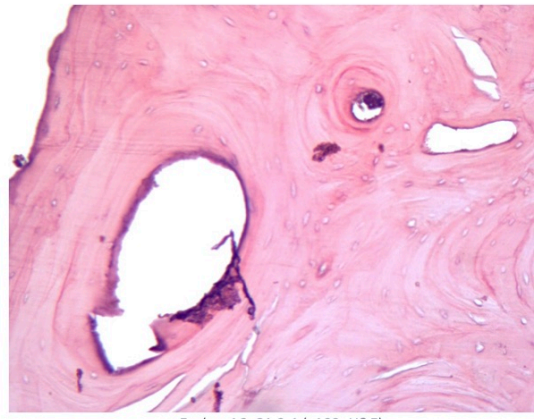
Εικόνα 13: CA 3.1 (x50, H&E)



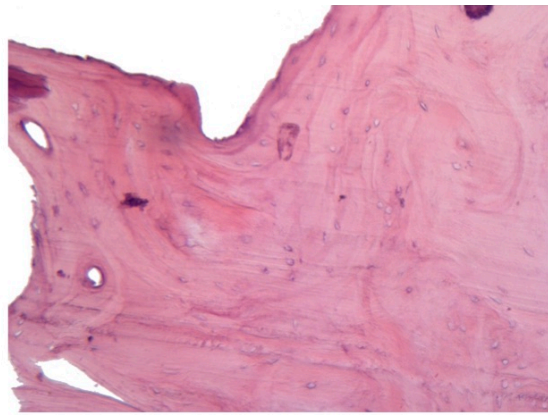
Εικόνα 14: CA 3.1 (x50, H&E)



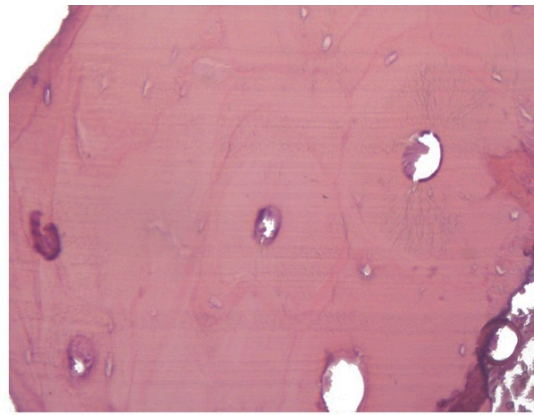
Εικόνα 15: CA 3.1 (x100, H&E)



Εικόνα 16: CA 3.1 (x100, H&E)



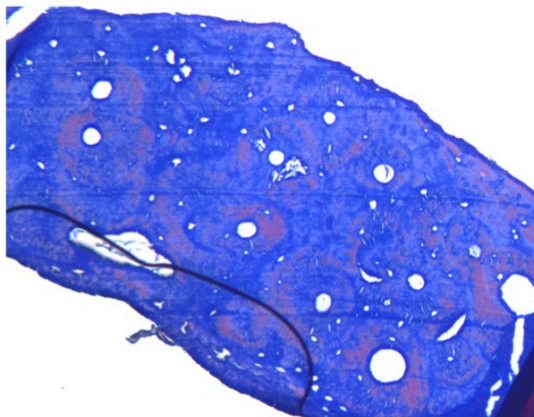
Εικόνα 17: CA 3.1 (x100, H&E)



Εικόνα 18: CA 3.1 (x200, H&E)



Εικόνα 19: CA 1.3 (x50, Tr. Masson's)

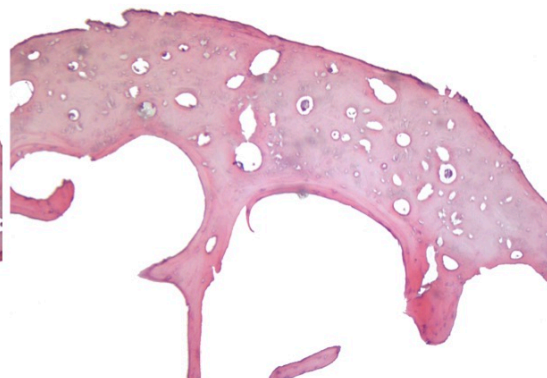


Εικόνα 20: CA 1.3 (x100, Tr. Masson's)

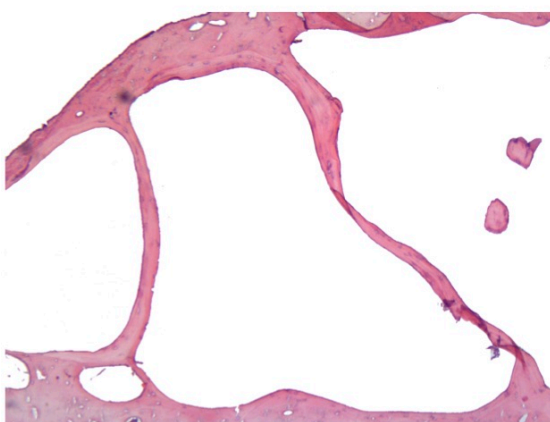
6. *Felis catus*



Εικόνα 1: FB 0.3 (x50, H&E)



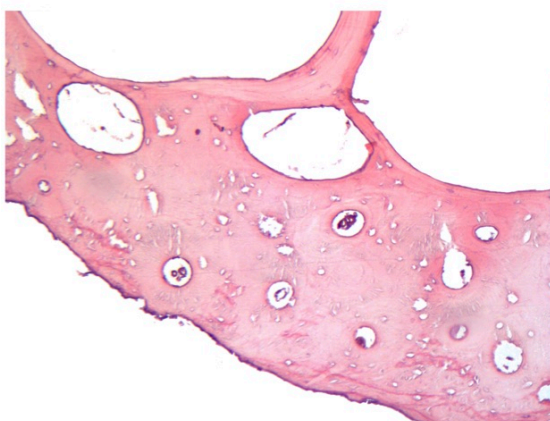
Εικόνα 2: FB 0.3 (x50, H&E)



Εικόνα 3: FB 0.3 (x50, H&E)



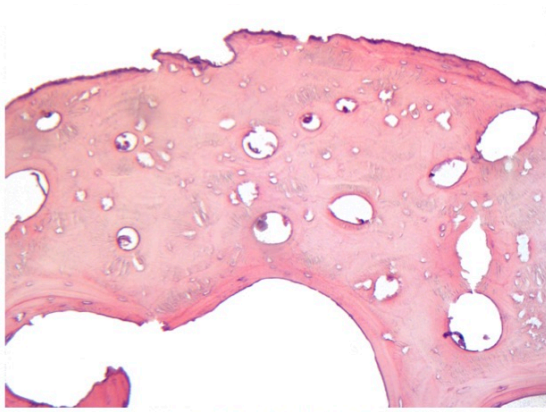
Εικόνα 4: FB 0.3 (x100, H&E)



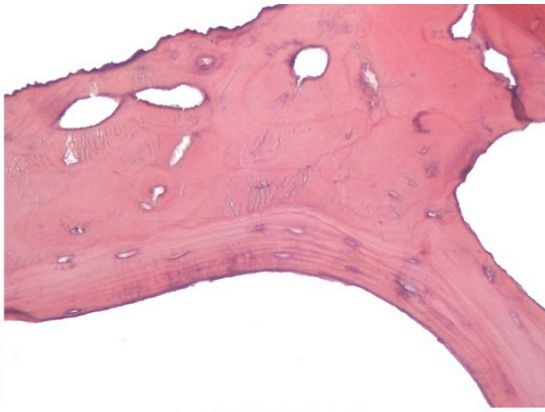
Εικόνα 5: FB 0.3 (x100, H&E)



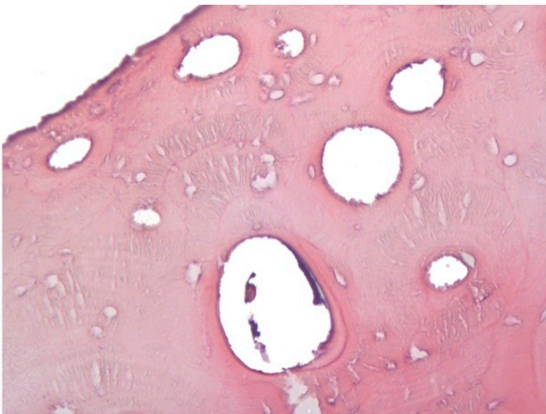
Εικόνα 6: FB 0.3 (x100, H&E)



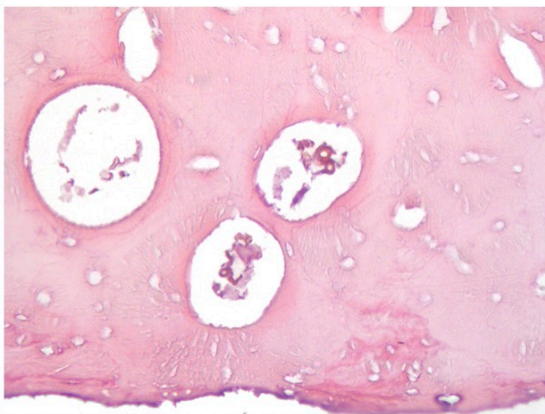
Εικόνα 7: FB 0.3 (x100, H&E)



Εικόνα 8: FB 0.3 (x200, H&E)



Εικόνα 9: FB 0.3 (x200, H&E)



Εικόνα 10: FB 0.3 (x200, H&E)



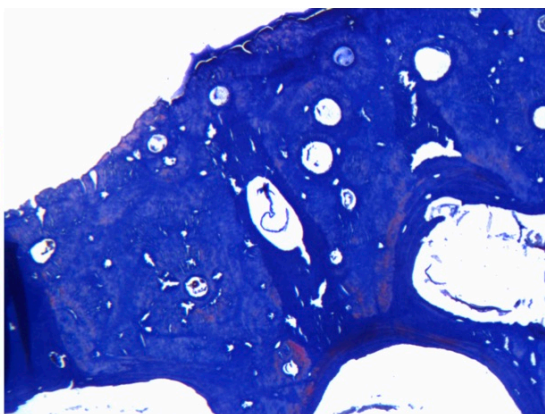
Εικόνα 11: FB 0.3 (x400, H&E)



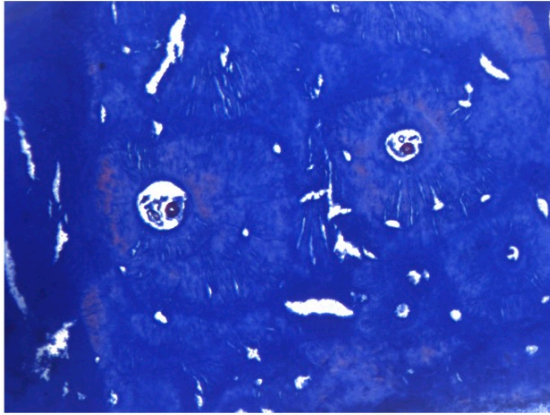
Εικόνα 12: FB 0.3 (x50, Tr. Masson's's)



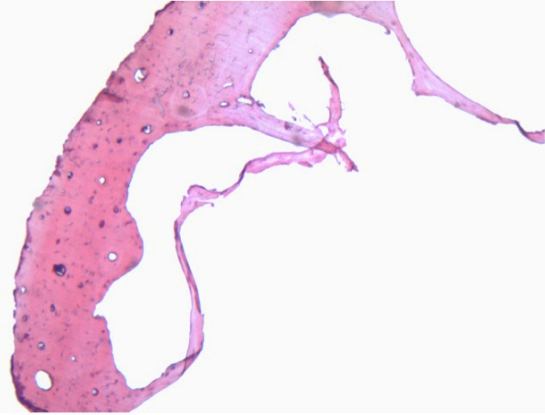
Εικόνα 13: FB 0.3 (x50, Tr. Masson's's)



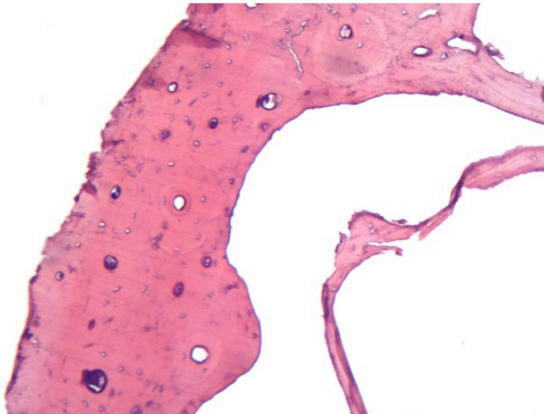
Εικόνα 14: FB 0.3 (x100, Tr. Masson's's)



Εικόνα 15: FB 0.3 (x200, Tr. Masson's's)



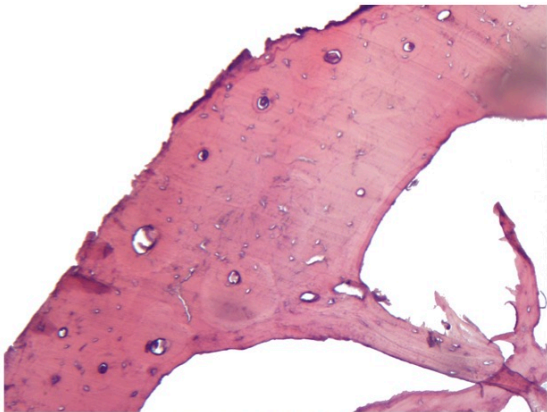
Εικόνα 16: FB 1.2 (x50, H&E)



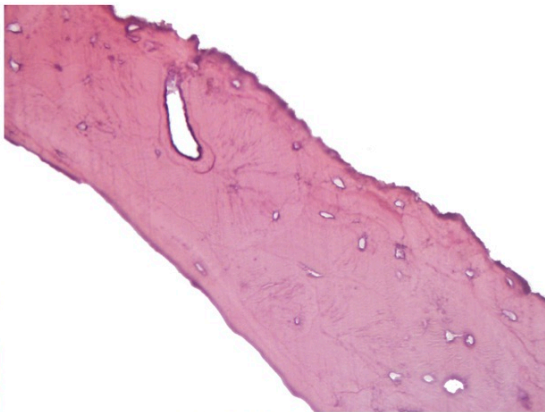
Εικόνα 17: FB 1.2 (x100, H&E)



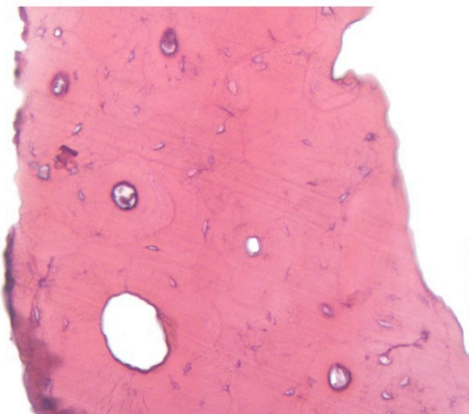
Εικόνα 18: FB 1.2 (x100, H&E)



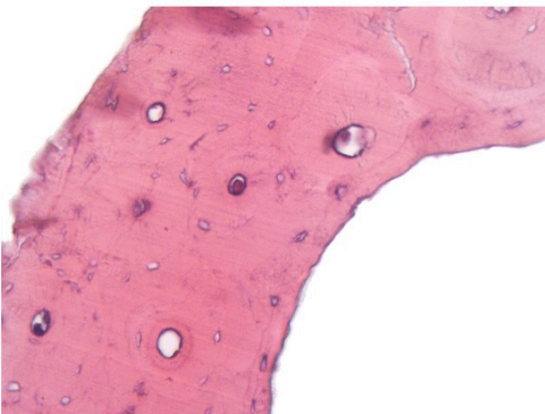
Εικόνα 19: FB 1.2 (x100, H&E)



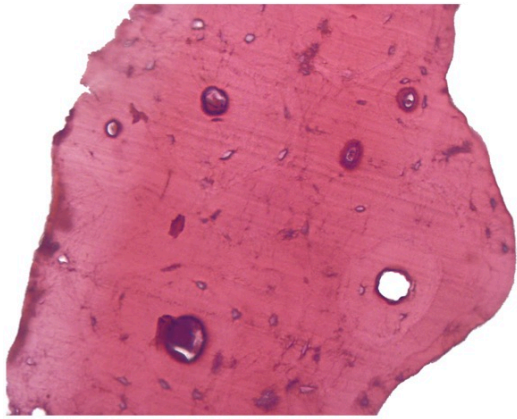
Εικόνα 20: FB 1.2 (x200, H&E)



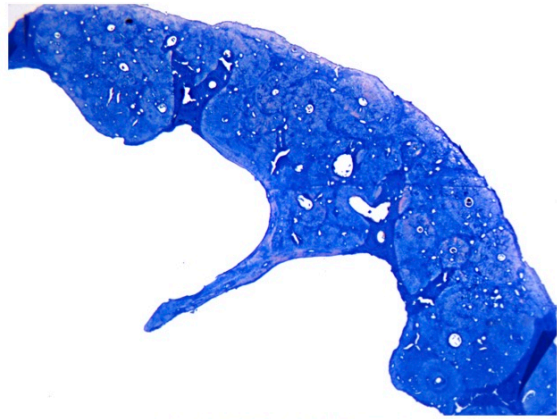
Εικόνα 21: FB 1.2 (x200, H&E)



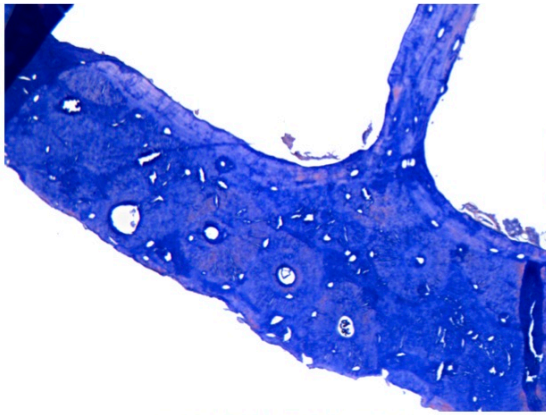
Εικόνα 22: FB 1.2 (x200, H&E)



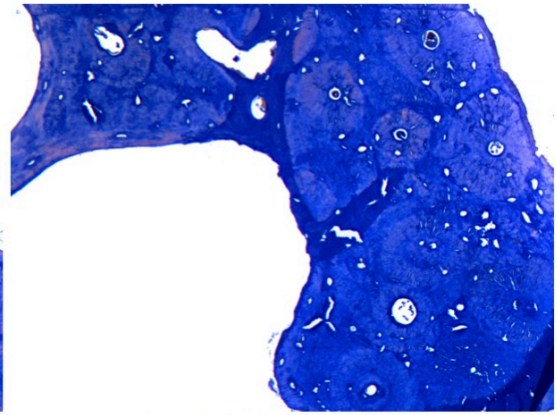
Εικόνα 23: FB 1.2 (x200, H&E)



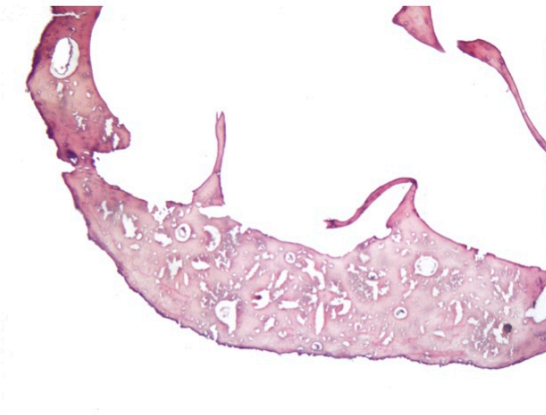
Εικόνα 24: FB 1.3 (x50, Tr. Masson's's)



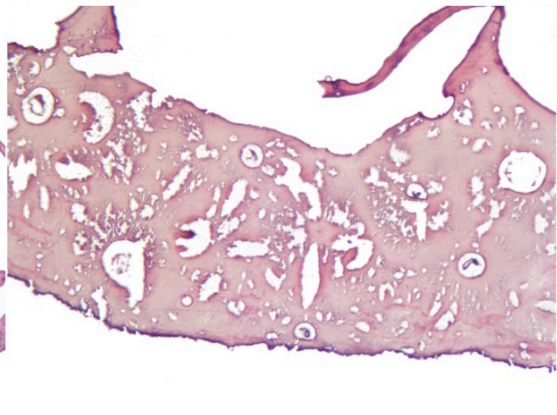
Εικόνα 25: FB 1.3 (x100, Tr. Masson's's)



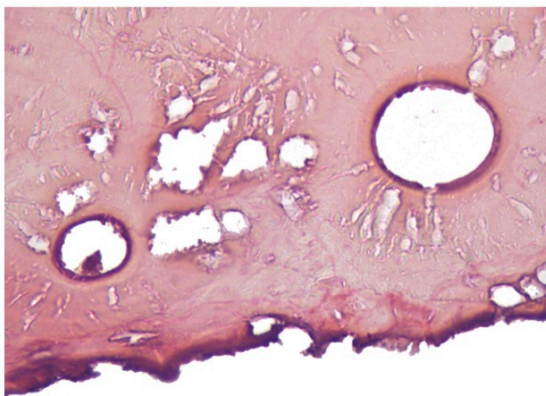
Εικόνα 26: FB 1.3 (x100, Tr. Masson's's)



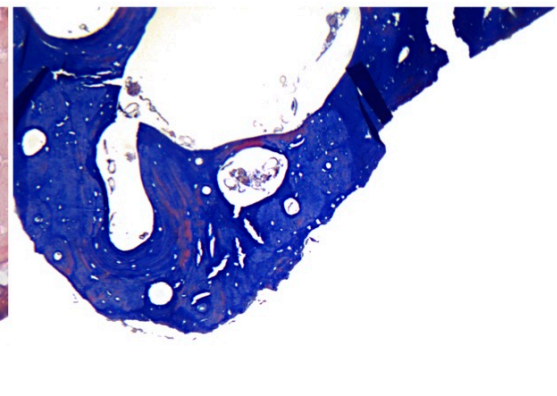
Εικόνα 27: FB 2.2 (x50, H&E)



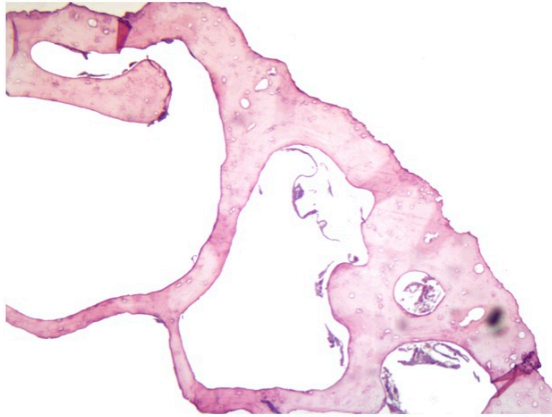
Εικόνα 28: FB 2.2 (x100, H&E)



Εικόνα 29: FB 2.2 (x400, H&E)



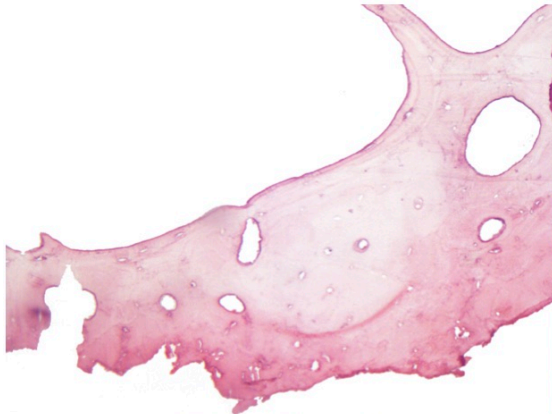
Εικόνα 30: FB 2.3 (x50, Tr. Masson's's)



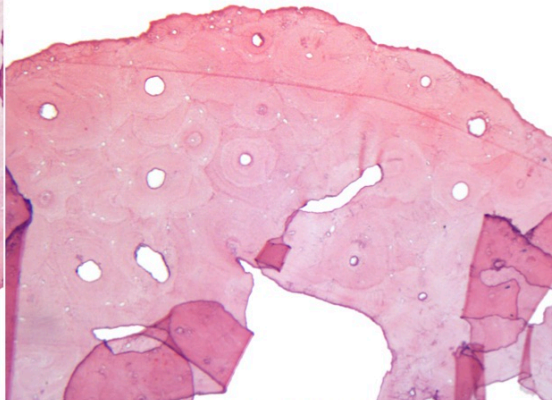
Εικόνα 31: FB 3.1 (x50, H&E)



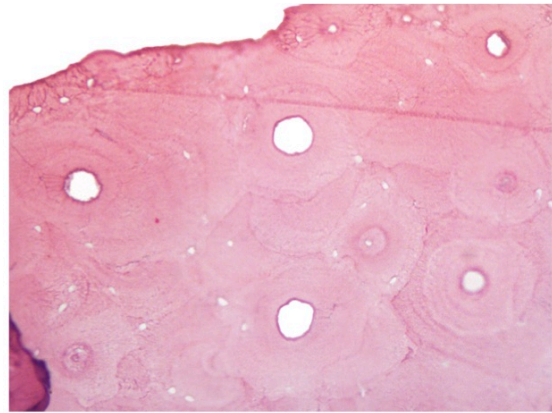
Εικόνα 32: FB 3.1 (x100, H&E)



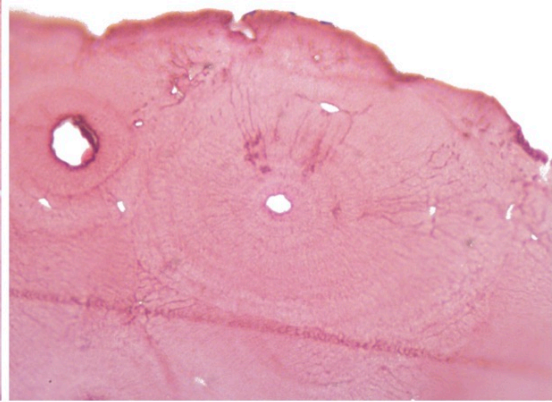
Εικόνα 33: FB 3.2 (x100, H&E)



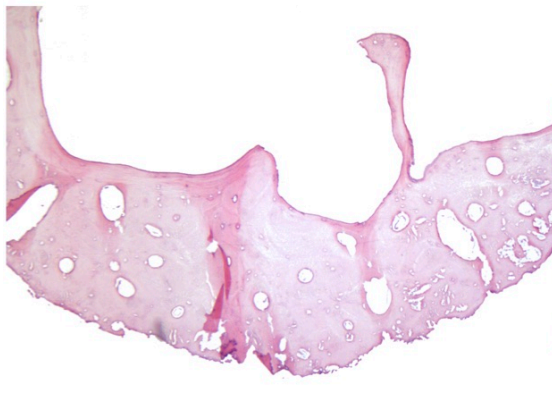
Εικόνα 34: FB 3.2 (x100, H&E)



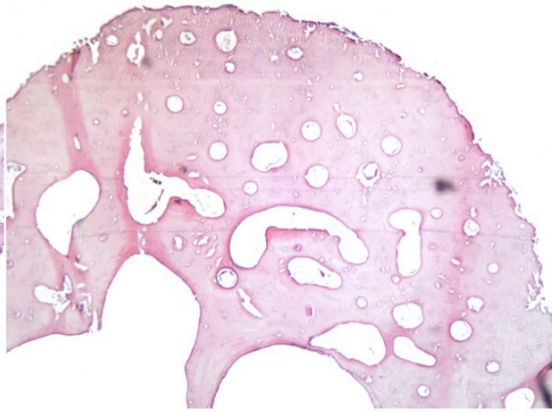
Εικόνα 35: FB 3.2 (x200, H&E)



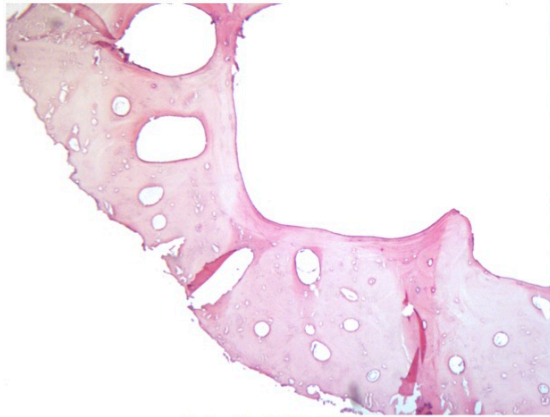
Εικόνα 36: FB 3.2 (x400, H&E)



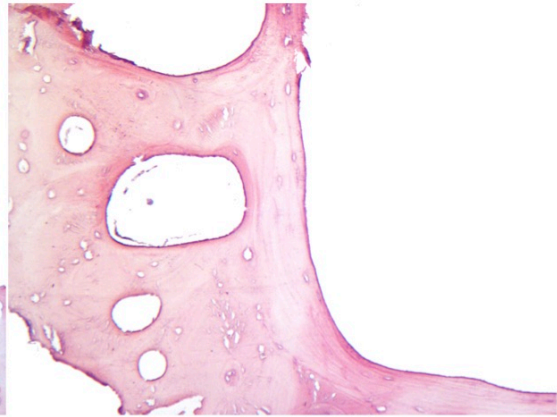
Εικόνα 37: FB 3.3 (x50, H&E)



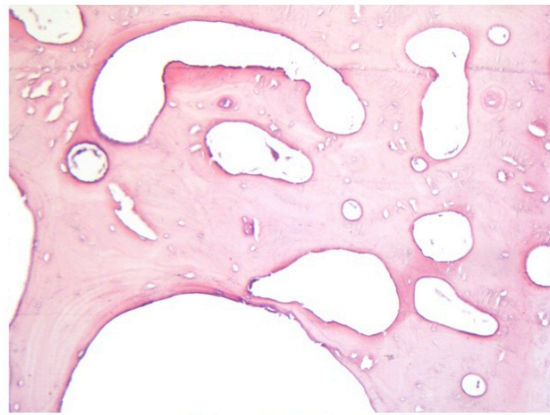
Εικόνα 38: FB 3.3 (x50, H&E)



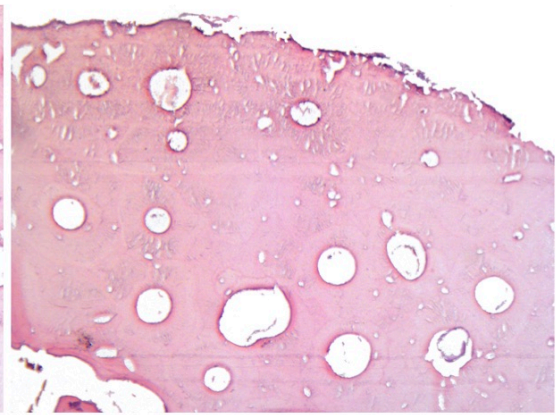
Εικόνα 39: FB 3.3 (x50, H&E)



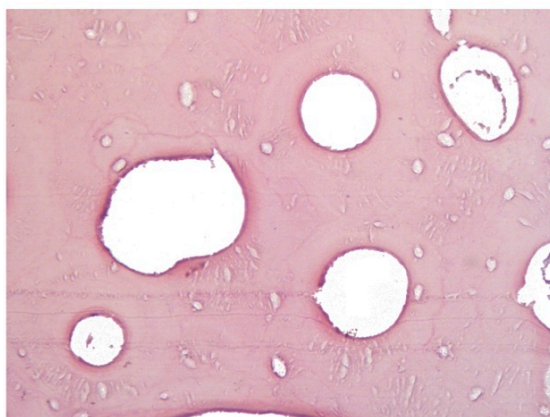
Εικόνα 40: FB 3.3 (x100, H&E)



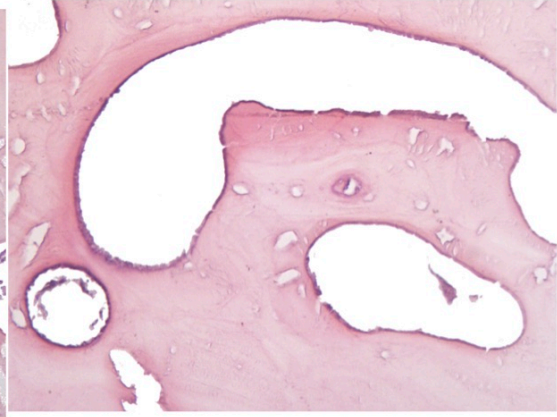
Εικόνα 41: FB 3.3 (x100, H&E)



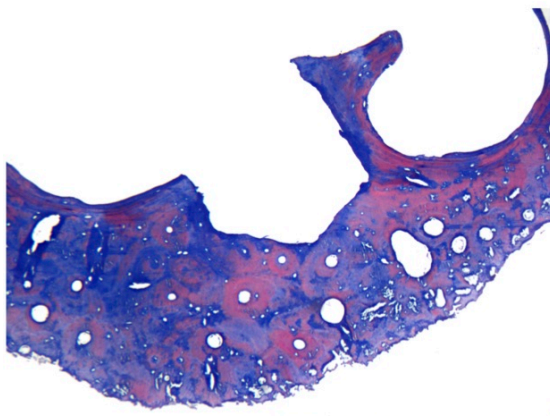
Εικόνα 42: FB 3.3 (x100, H&E)



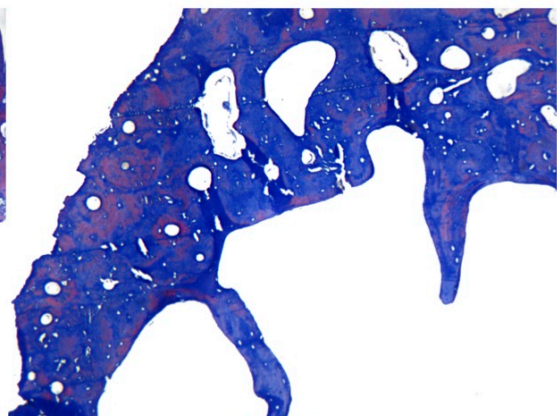
Εικόνα 43: FB 3.3 (x200, H&E)



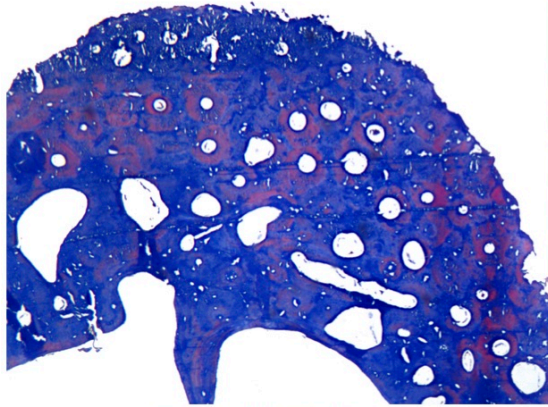
Εικόνα 44: FB 3.3 (x200, H&E)



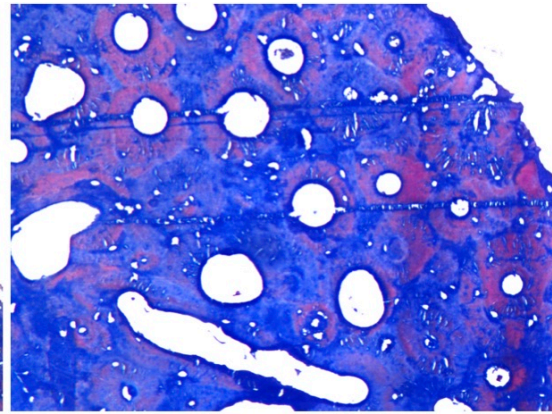
Εικόνα 45: FB 3.3 (x50, Tr. Masson's's)



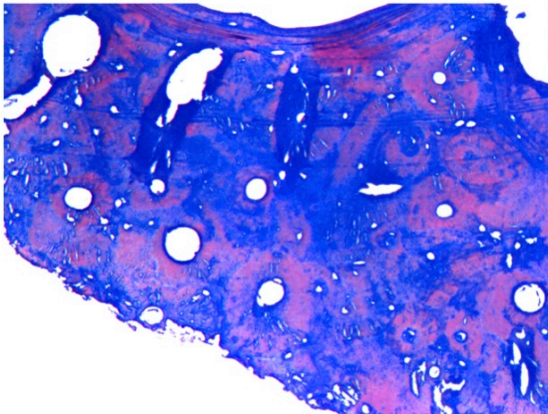
Εικόνα 46: FB 3.3 (x50, Tr. Masson's's)



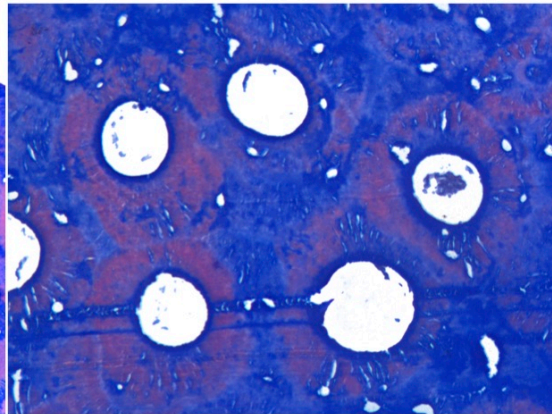
Εικόνα 47: FB 3.3 (x50, Tr. Masson's's)



Εικόνα 48: FB 3.3 (x100, Tr. Masson's's)



Εικόνα 49: FB 3.3 (x100, Tr. Masson's's)



Εικόνα 50: FB 3.3 (x200, Tr. Masson's's)

Δηλώνω ρητά ότι το κείμενο της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας δεν αποτελεί προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγες δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον.

Η Δηλούσα: Βασιλεία Ψαρρά