

### **Bachelorproef**

Het verband tussen het aantal chondrocyten en de periode na de dood in een diermodel: een toepassing voor de schatting van het PMI?

Dierenkliniek Den Ham, Daarleseweg 35a,  
7683 RC Den Ham (Nederland)

Vrije Universiteit Brussel (VUB), Laarbeeklaan  
103, 1090 Jette

Drs. ing. Tristan Krap

### **Salah Omar**

Departement GEZ-LA

Bachelor Biomedische  
Laboratoriumtechnologie

Afstudeerrichting Farmaceutische en  
Biologische Laboratoriumtechnologie

2016-2017



### **Bachelorproef**

Het verband tussen het aantal chondrocyten en de periode na de dood in een diermodel: een toepassing voor de schatting van het PMI?

Dierenkliniek Den Ham, Daarleseweg 35a,  
7683 RC Den Ham (Nederland)

Vrije Universiteit Brussel (VUB), Laarbeeklaan  
103, 1090 Jette

Drs. ing. Tristan Krap

### **Salah Omar**

Departement GEZ-LA

Bachelor Biomedische  
Laboratoriumtechnologie

Afstudeerrichting Farmaceutische en  
Biologische Laboratoriumtechnologie

2016-2017

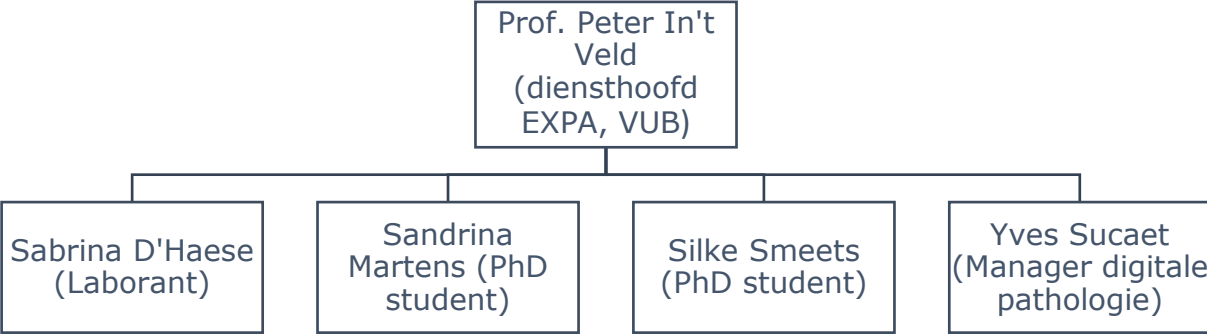
# Voorwoord

Als eerst wil ik God bedanken om mij de kracht te geven, kennis en vermogen om dit onderzoek te ondernemen en tot een goed einde te brengen. Zonder zijn hulp zou deze prestatie nooit zijn geweest.

Vervolgens wil ik mijn dank betuigen aan de Erasmushogeschool voor deze leerrijke en unieke stageplaats. Het was de moeite waard! Patrick Vandermeiren, de persoon met wie ik alles heb kunnen regelen, bedankt hiervoor. Mijn promotor, Tristan Krap en contactpersoon Elke Vanneste wil ik bedanken voor hun feedback.

Prof. In't Veld wil ik bedanken om me de mogelijkheid te geven om mijn praktisch werk op de dienst EXPA aan de VUB te doen. Sabrina, Sandrina en Marleen wil ik bedanken voor hun begeleiding en uitleg in het labo.

# Organigram



# Inhoudsopgave

Voorwoord.....	4
Organigram .....	5
Afkortingenlijst .....	8
Abstract (NI).....	9
Abstract (Eng) .....	10
1. Inleiding en probleemstelling .....	11
2. Literatuuronderzoek .....	12
2.1 De dood.....	12
2.2 De thanatologie en tafonomie .....	13
2.3 Vroege postmortale veranderingen .....	13
2.3.2 Hypostase.....	14
2.3.2 Lijkstijfheid of rigor mortis .....	14
2.3.2 Uitdroging .....	14
2.4 Late postmortale veranderingen of ontbinding .....	14
2.4.1 Ontbinding door rotting .....	14
2.4.2 Ontbinding door uitdroging .....	15
2.4.3 Adipocirevorming.....	15
2.5 Belang van postmortale veranderingen .....	15
2.6 Het postmortaal interval .....	15
2.6.1 De entomologie .....	16
2.6.2 Verzamelde graaddagen .....	16
2.6.3 Kraakbeen .....	18
2.7 Kraakbeen.....	18
2.7.1 Hyalien kraakbeen .....	19
2.7.2 Elastisch kraakbeen .....	19
2.7.3 Vezelig kraakbeen .....	19
2.7.4 Histogenese en groei.....	21
2.7.5 De chondrocyten .....	21
2.7.6 De matrix .....	23
3. Experimenten .....	24
3.1 Macroscopische analyse .....	24
3.1.1 Materiaal en methoden.....	24
3.1.2 Resultaten .....	25
3.1.3 Discussie .....	29
3.2 Microscopische analyse .....	29

3.2.1	Materiaal en methoden.....	29
3.2.2	Resultaten .....	31
3.2.3	Discussie .....	36
3.2.4	Conclusie.....	37
5.	Referenties.....	38
6.	Bijlagen .....	39
	Bijlage 1 .....	39
	Bijlage 2 .....	40
	Bijlage 3.....	45
	Bijlage 4.....	46
	Bijlage 5.....	47
	Bijlage 6.....	48

# Afkortingenlijst

ADD	Accumulated degree days
ADP	Adenosinedifosfaat
ATP	Adenosinetrifosfaat
ECM	Extracellulaire matrix
GAG's	Gesulfateerde glycosaminoglycanen
H&E	Hematoxyline & Eosine
PBS	Part Body Score
PMI	Postmortaal Interval
TBS	Total Body Score



## **Abstract (NI)**

### **Het verband tussen het aantal chondrocyten en de periode na de dood in een diermodel: een toepassing voor de schatting van het PMI?**

Salah Omar

Promotor: Tristan Krap

Contactpersoon EhB: Elke Vanneste

#### **Achtergrond**

Ondanks het feit dat het postmortaal interval (PMI) een van de belangrijkste onderwerpen is in de forensische geneeskunde, bestaat er nog geen beslissende methode om de tijd die verstreken is sinds een persoon is overleden op een nauwgezette manier te schatten. De methoden die tegenwoordig gebruikt worden om het PMI te bepalen, zijn voornamelijk gebaseerd op de vroege en late postmortale veranderingen. Hoewel het PMI tijdens de vroege postmortale veranderingen meestal adequaat geschat wordt, blijft een objectieve bepaling van het PMI in de late postmortale verschijnselen moeilijk.

#### **Doel**

Het verband werd bestudeerd tussen de macro- en microscopische veranderingen van het kraakbeen en de postmortale periode met voornamelijk de studie van het aantal chondrocyten in de verschillende types kraakbeen. Dit om te bepalen of deze veranderingen kunnen gebruikt worden als een schattingsmethode voor het PMI.

#### **Methode**

Het kraakbeen werd verzameld van varkenspoten en -oren waarin de drie types kraakbeen in voorkomen. De poten en oren werden gedurende verschillende tijdsperiodes op een bodyfarm gelegd, zodat later een macro- en microscopische analyse kon uitgevoerd worden. De macroscopische analyse gebeurde a.d.h.v. een scoringsstelsel en de microscopische analyse gebeurde door een manuele telling van de chondrocyten na een hematoxyline & eosine kleuring.

#### **Resultaten**

Bij de macroscopische analyse werden verschillen waargenomen in de kleur, aanwezige gaten en uitdroging van de oren en in de stadia van ontbinding van de poten. De microscopische analyse toonde enkel bij het hyalien en elastisch kraakbeen een kleurverandering van de matrix en een daling van het aantal chondrocyten dat meer uitgesproken was in het hyalien kraakbeen.

#### **Conclusie**

De microscopische kleurverandering en de daling van het aantal chondrocyten in het hyalien kraakbeen kunnen toegepast worden ter schatting van het PMI.

## **Abstract (NI)**

### **The relation between the number of chondrocytes and the post-mortem period in an animal model: an application for the estimation of the PMI?**

Salah Omar

Promotor: Tristan Krap

Contact person EhB: Elke Vanneste

#### **Background**

Despite the fact that the post mortem interval (PMI) is one of the most important topics in forensic medicine, there is no defining method yet to estimate the time elapsed since a person died. The methods currently used to determine the PMI are based mainly on early and late postmortem changes. Although PMI is usually adequately estimated during early postmortem changes, an objective assessment of PMI in late postmortem changes remains difficult.

#### **Purpose**

A correlation study was performed between the macro and microscopic changes of the cartilage and the postmortem period, with particular focus on the number of chondrocytes in the different types of cartilage. This is to determine whether these changes can be used as an estimation method for the PMI.

#### **Method**

The cartilage was collected from porcine paws and ears in which the three types of cartilage occur. The legs and ears were placed on a bodyfarm for different periods of time so that a macro and microscopic analysis could be performed at later timepoints. The macroscopic analysis was conducted using a scoring system and the microscopic analysis was performed by a manual count of chondrocytes after hematoxylin and eosin staining.

#### **Results**

In the macroscopic analysis, differences were observed in the color, presence of holes and in the dehydration of the ears and in the stages of decomposition of the paws. The microscopic analysis showed a change in the color of the matrix only in the hyaline and elastic cartilage and a decrease in the number of chondrocytes that was more pronounced in the hyaline cartilage.

#### **Conclusion**

The microscopic color change and the decrease in the number of chondrocytes in the hyaline cartilage can be applied to estimate the PMI.

# 1. Inleiding en probleemstelling

De estimatie van het postmortaal interval (PMI) vormt nog steeds een doorslaggevend onderwerp in de forensische geneeskunde. De vraagstelling naar de tijd die is verstreken sinds een persoon overleden is, blijft een van de belangrijkste vragen in de forensische praktijk (Alibegović, 2014). Tegenwoordig worden er verschillende methoden toegepast om het PMI te schatten waarvan de meeste berusten op de postmortale verschijnselen. Daling van de lichaamstemperatuur, rigor mortis, hypostase, ontwikkeling en groei van insecten in het lichaam zijn enkele voorbeelden hiervan. Hoewel het PMI door de vroege postmortale verschijnselen die meestal na 24-36u optreden alsnog met een zekere precisie geschat kan worden (Alibegović, 2014), wordt echter algemeen beschouwd dat de nauwkeurigheid van de schatting daalt naarmate de tijd sinds de dood toeneemt. (Rogers et al., 2010).

Het gebruik van kraakbeen als nieuwe parameter voor de schatting van het PMI is geen nieuw onderwerp en kent enkele onderzoeken. De vraag blijft echter hoe de schatting van het PMI bepaald kan worden (Alibegović, 2014). De chondrocyten of kraakbeencellen vormen het centraal onderwerp in dit onderzoek. Nadat de daling van de viabiliteit van de chondrocyten in functie van de tijd aangetoond werd door Alibegović et al. (2014) en Rogers et al. (2010), komt daaropvolgend de vraag of het aantal chondrocyten (kern+lacune) in de verschillende types kraakbeen in functie van de tijd een verschil aantoon. Het microscopisch onderzoek, dat een voorafgaande macroscopisch onderzoek kent, wordt toegepast op de chondrocyten van het kraakbeen in het gewrichtsvlak (hyalien of articulaire kraakbeen), in de meniscus (vezelig kraakbeen) en tot slot in het oor (elastisch kraakbeen) door gebruik te maken van varkenspoten en -oren. De ontbinding van de poten en oren waarin het kraakbeen ligt wordt in het macroscopisch onderzoek geobserveerd. Tot slot wordt er ook nog microscopisch gekeken of er enig verschil bestaat tussen de coupes van het kraakbeen bij de verschillende tijdsintervallen.

De vraag of er een daling van het aantal chondrocyten in de verschillende types kraakbeen valt waar te nemen naarmate de postmortale periode langer wordt, vormt de hoofdvraag van dit onderzoek. Daarnaast wordt er nagegaan welke macroscopische veranderingen optreden bij de poten en oren waarin het kraakbeen zich bevindt en of deze veranderingen correleren met de daling van het aantal chondrocyten. Tot slot blijft de vraag of er microscopische verschillen zijn in de weefselcoupes bij de verschillende types kraakbeen afzonderlijk.

De doelbewuste keuze voor het gebruik van kraakbeen komt doordat kraakbeen een lage celdensiteit heeft welke de autolytische processen vertraagd (Rogers et al., 2010). Bovendien is het kraakbeen op sommige plaatsen goed afgeschermd, zoals bijvoorbeeld het articulaire kraakbeen in de knie. Het gebruik van varkensmateriaal in dit onderzoek is vanwege de overeenkomsten met de mens in aspecten van de lichaamssamenstelling.

De tijdsperiode van de studie duurde twaalf weken waarin in de eerste zes weken de varkenspoten en -oren op een landelijke omgeving werden gelegd, waar kadavers en/of resten van dieren liggen te ontbinden (bodyfarm). De macroscopische analyse en de biopsie op vooraf bepaalde tijdsintervallen, gebeurde eveneens in die eerste zes weken in Den Ham, Nederland.

Deel twee van de studie bestond uit het praktisch werk waarbij de bipten tot weefsels werden verwerkt en de microscopische analyse werd uitgevoerd. Het tweede deel van de studie werd aan de Vrije Universiteit Brussel (VUB) op de dienst Experimentele Pathologie (EXPA) uitgevoerd.

## **2. Literatuuronderzoek**

### **2.1 De dood**

#### 2.1.1 Proces

Bij het intreden van de dood houden de verschillende cellulaire en metabolische processen in de organen en weefsels op met functioneren. Dit gebeurt echter onder verschillende snelheden. Hoewel de dood vaak wordt gekenmerkt met het ophouden van vitale functies, houden het hart, de longen en de hersenstam niet noodzakelijk op met functioneren. Om het geheel proces en het daaraan gekoppeld mechanisme beter te begrijpen, wordt een onderscheid gemaakt tussen cellulaire (moleculaire) en somatische dood (systemische of klinische dood) (Nageshkumar G Rao, 2010).

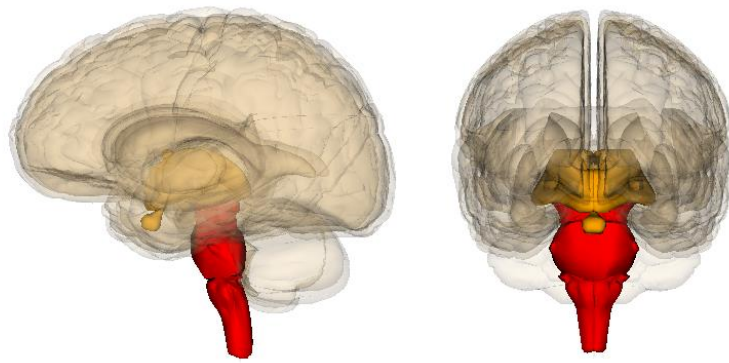
#### 2.1.2 Cellulaire en somatische dood

De cellulaire of moleculaire dood wordt gekenmerkt door het stoppen van de ademhaling, de normale metabolische activiteit van de weefsels en de cellen in het lichaam als gevolg van de uiteindelijke dood van alle cellulaire elementen (verlies van functies en structuur). Het stoppen van de ademhaling wordt snel gevolgd door autolyse. Indien autolyse achteruitgang van het lichaam vertoont, dan is dit fenomeen bewijs voor de dood. De snelheid waarmee de cellen sterven wordt onder andere bepaald door de verschillen in de cellulaire metabolisme (Hodder & Stoughton Ltd, 2011). De cellen sterven namelijk niet gelijktijdig. Zo zullen hersencellen die zeer gevoelig zijn voor ischemie al na enkele minuten afsterven. Andere cellen, zoals de cellen van het hoornvlies zullen na uren zuurstofgebrek irreversibele schade oplopen.

Bij de somatische dood wordt er een irreversibele stilstand van de werking van de hersenen, het hart en de longen waargenomen met als gevolg het verlies van de gevoeligheid en het vermogen om zichzelf te kunnen verplaatsen. Tegenwoordig kunnen de hart- en longfunctie door externe stimuli kunstmatig overgenomen worden. Enkel cardiorespiratoire criteria volstaan bijgevolg niet om tot een overlijden te kunnen besluiten (Pitte & De Letter, 2015).

#### 2.1.3 Hersenstamdood

Hersenstamdood of hersendood (cerebrale dood) is in het algemeen het enige wetenschappelijk aanvaard criterium voor de dood. Dit leidt tot een onherstelbaar verlies van alle hersenstamfuncties. Een ernstige schade van de hersenstam (zie figuur 1) leidt namelijk tot diepe coma en apnoe (ademhalingsstilstand).



**Figuur 1** De hersenstam (in het rood) bevindt zich tussen de grote hersenen, kleine hersenen en het ruggenmerg (Loeffen, 2012).

## 2.2 De thanatologie en tafonomie

In de thanatologie worden de meetbare veranderingen, zoals de analytische biochemie (bijv. pH verandering van het bloed) bestudeert, die het lichaam na het intreden van de dood ondergaat. Deze kennis laat toe om samen met de tafonomie niet enkel een correcte interpretatie te maken van afwijkingen tijdens de lijkschouwing, maar tevens ook het post mortem interval te bepalen (Nageshkumar G Rao, 2010). De tafonomie is de studie van de processen die de resten van een organisme beïnvloeden na het intreden van de dood. Het vormt het geheel onderdeel van het doodonderzoek waaronder de entomologie, antropologie, archeologie, mycologie en andere forensische vakgebieden in voorkomen (Cross & Williams, 2017). Na het intreden van de dood begint de postmortale fase waarbij een onderscheid wordt gemaakt tussen de vroege postmortale veranderingen en late postmortale veranderingen.

## 2.3 Vroege postmortale veranderingen

De vroege postmortale veranderingen worden in de eerste 12 tot 24 uur in het dode lichaam waargenomen. Deze omvatten respectievelijk; algor mortis, hypostase, rigor mortis en tot slot de uitdroging van het lichaam. Met de late postmortale veranderingen wordt de ontbinding van het lichaam bedoelt. De ontbinding kan naargelang de omstandigheden waarin het lichaam zich bevindt in drie richtingen evolueren, namelijk: ontbinding door putrefactie, ontbinding door mummificatie of ontbinding door adipocirevorming.

### 2.3.1 Daling van lichaamstemperatuur

De lichaamstemperatuur welke onder de vroege postmortale veranderingen valt, bedraagt bij het overlijden  $37^{\circ}\text{C}$ , tenzij bij uitzonderlijke situaties zoals bijvoorbeeld koorts (hoger) of onderkoeling (lager). Lijkafkoeling of algor mortis treedt op na de dood. De lichaamstemperatuur van de overledene blijft gedurende de eerste twee uur constant. Na deze aanvankelijke fase, begint de lichaamstemperatuur met circa  $1^{\circ}\text{C}/\text{uur}$  te dalen tot de uiteindelijke

omgevingstemperatuur wordt bereikt. Het afkoelingsproces wordt echter door verschillende factoren beïnvloedt waaronder het lichaamsgewicht, het medium rond het lichaam (lucht of water), de omgevingstemperatuur, de klimatologische omstandigheden (wind, regen e.d.) en de lichaamshouding (Pitte & De Letter, 2015)

### 2.3.2 Hypostase

De bloedcirculatie komt tot stilstand door het stilvallen van de pompfunctie van het hart, maar het nog aanwezig bloed in de bloedvaten verplaatst zich door de zwaartekracht naar een lageregelegen gebied (hypostase). Het bloed stapelt zich op in de aders en haarvaten, dit resulteert in enerzijds een wijziging in de inwendige bloedverdeling en anderzijds tot de vorming van lijkvlekken (livrores). (Pitte & De Letter, 2015).

### 2.3.2 Lijkstijfheid of rigor mortis

Het zenuwstelsel valt uit na de dood, hierdoor treedt er een veralgemene verslapping van de spieren die 3 a 6 uur duurt, welke geleidelijk aan gevolgd wordt door een verstijving van de spieren. Er ontstaat lijkstijfheid of rigor mortis. De lijkstijfheid bereikt na 6 a 12 uur zijn maximum en begint na 18 a 36 uur geleidelijk aan te verminderen. De lijkstijfheid ontstaat als gevolg van het ineenschuiven van de actine- en myosinefilamenten in het spierweefsel. Dit proces wordt pas mogelijk als er adenosinedifosfaat (ADP) aanwezig is, dat ontstaat door hydrolyse van adenosinetrifosfaat (ATP). Na het intreden van de dood is het lichaam nog in staat om ATP te resynthetiseren. De lijkstijfheid treedt in als er geen ATP meer ter beschikking is (Pitte & De Letter, 2015).

### 2.3.2 Uitdroging

De uitdroging van het lijk ontstaat vervolgens. Deze uitdroging wordt best waargenomen op plaatsen waar de huid van nature dun is. De lippen en het scrotum zijn voorbeelden van dergelijke plaatsen. De uitdroging is ten gevolge van de verminderde huidturgor. De postmortale groei van haren en nagels is een fenomeen dat hierdoor verklaard kan worden.

## 2.4 Late postmortale veranderingen of ontbinding

De ontbinding is een complex fenomeen die start met autolyse van het lichaam. Hierdoor worden de cellen en de weefsels in het lichaam afgebroken door de vrijgekomen enzymen. Voorts zorgt de proliferatie van bacteriën en schimmels voor de verdere afbraak van het lichaam. De wijze waarop en het tijdsverloop waarmee de ontbinding zich afwikkelt, wordt beïnvloed door verschillende omgevingsfactoren zoals temperatuur en vochtigheid (Pitte & De Letter, 2015).

### 2.4.1 Ontbinding door rotting

Putrefactie of ontbinding door rotting is het gevolg van de inwerking van micro-organismen (commensalen en pathogene kiemen) op het lichaam. Tijdens het rottingsproces ontstaat liquefactie (vloeibaarwording) van weefsels. Dit proces wordt gekenmerkt door de vorming van een rottingsvlek ter hoogte van de

onderbuikstreek. Verder gaat het rottingsproces gepaard met de ophoping van rottingsgassen in de lichaamsholten. Dit zorgt voor de opzwellen van het lijk. De intra-abdominale rottingsvloeistof vloeit naar buiten. Hierdoor ontstaat er loslating van de opperhuid (epidermolyse), nagels en hoofdhaar. Later zal de borstkas en buikwand invallen. Het putrefactieproces duurt ongeveer 10 tot 20 dagen, maar kan sterk variëren afhankelijk van het feit of het lichaam al dan niet begraven is en afhankelijk van de omgevingstemperatuur en vochtigheid van de omgeving (Pitte & De Letter, 2015).

#### 2.4.2 Ontbinding door uitdroging

Bij de ontbinding door uitdroging of mummificatie treedt er geen liquefactie op, maar wel uitdroging van de weefsels. Dit ontbindingsproces wordt bevorderd wanneer het lijk zich in een droge, warme en geventileerde omgeving bevindt (bijv. op zolder) of tevens ook in een zeer koele omgeving. Mummificatie wordt gekenmerkt door een lederachtige huid, die droog, bruin en hard is. Dit proces ontstaat na meerdere weken, maanden of zelfs jaren (Pitte & De Letter, 2015).

#### 2.4.3 Adipocirevorming

Het langdurig verblijf van lijken in een koude en vochtige omgeving (bijv. in water of op natte grond) kan voor adipocirevorming of vorming van lijkenvet zorgen. Het onderhuids en inwendig vetweefsel ondergaat een chemische omvorming waardoor het weefsel een droog en kruimelig aspect vertoont dat weerstand biedt tegen verrotting. Dit gebeurt initieel in de huid, het onderhuids vetweefsel en vervolgens in de spieren en ingewanden. Het adipocireproces begint meestal na twee maanden en is vanaf 3 tot 6 maanden na het overlijden duidelijk te herkennen (Pitte & De Letter, 2015).

## 2.5 Belang van postmortale veranderingen

De postmortale fase is van cruciaal belang ongeacht of het over de vroege of late postmortale veranderingen gaat. Ten eerste, omdat de wetsdokter hierdoor (in mate van mogelijke) de normale voortgang van ontbinding kan observeren en de oorzaak van de dood kan achterhalen aangezien bijv. een huidletsel beter zichtbaar wordt eens de postmortale veranderingen optreden. Ten tweede, omdat deze veranderingen gebruikt kunnen worden voor de schatting van het postmortaal interval (PMI).

## 2.6 Het postmortaal interval

Het postmortaal interval (PMI) is de tijd die is versteken sinds een persoon overleden is. Het vormt een van de belangrijkste onderwerpen in de forensische geneeskunde. Afhankelijk van de omgevingsfactoren wordt in de praktijk een eerste estimatie van het PMI aan de hand van de vroege postmortale veranderingen gedaan. Het PMI wordt in sommige gevallen met een grote precisie geschat. Er wordt hoofdzakelijk beroep gedaan op de temperatuurveranderingen om het PMI te kunnen bepalen. De temperatuur daalt namelijk na een plateau fase van twee tot drie uur, met 1°C/uur. Deze daling kan toegepast worden op de regel van Moritz ( $37 - \text{rectale temperatuur} + 3$ ). Een ander alternatief om het PMI te

bepalen is het nomogram van Henssge (1981), dit laat toe om op basis van de omgevingstemperatuur, de rectale temperatuur van het lijk, het lichaamsgewicht en met toepassing van een correlatie factor, de tijdsperiode van overlijden te bepalen. Hoewel deze methoden in bepaalde omstandigheden tot een juiste schatting kunnen leiden, wordt er in praktijk naar andere vroege postmortale veranderingen gekeken met name aanwezige lijkvlekken en lijkstijfheid.

### 2.6.1 De entomologie

De estimatie van het PMI wordt logischerwijs ingewikkelder eens de ontbinding is opgetreden. Aangezien een antwoord op de vraag wanneer de persoon overleden is even belangrijk blijft, worden er andere methoden gebruikt om het PMI te bepalen. De entomologie is een voorbeeld hiervan. Het omvat de studie van maden en insecten die zich rond en in het lijk hebben ontwikkeld. Mégnin wordt met zijn werk beschouwd als de pionier van deze discipline. Insecten met voornamelijk vliegen zullen afhankelijk van de omstandigheden (boven 12°C) eieren leggen op het lijk. Hieruit ontstaan larven die zich op hun beurt tot poppen vormen, waaruit een tweede generatie vliegen ontstaat. De totale cyclus varieert tussen 18 tot 24 dagen. Afhankelijk van de insecten die aanwezig zijn, hun ontwikkelingsstadia en de omgevingstemperatuur kan een estimatie gemaakt worden van het PMI. De aanwezigheid van lege poppen kan een aanwijzing zijn van verschillende generatie vliegen. Dit bemoeilijkt de estimatie, in dit geval wordt een estimatie van het minimum PMI gemaakt (Boonen et al., 2015)

### 2.6.2 Verzamelde graaddagen

Megyesi et al. (2005) beschrijft in haar studie een andere methode om het PMI te schatten. De studie illustreert een aanvullende methode om op basis van de staat van ontbinding en rekening houdend met de temperatuur en de tijd, het PMI te schatten. Een methode om het PMI a.d.h.v. de verzamelde graaddagen en de staat van ontbinding te schatten, is uitermate nuttig in gevallen waarin insecten niet aanwezig zijn, niet of op de verkeerde wijze verzameld worden. De verzamelde graaddagen of in het Engels: accumulated degree days (ADD), vertegenwoordigen de warmte-energie-eenheden die beschikbaar zijn om een biologisch proces voort te zetten, zoals bacterie- of larvegroeï. ADD wordt berekend door de gemiddelde dagelijkse temperaturen op het moment van sterfte tot het lichaam gevonden wordt, samen te voegen. De gemiddelde temperaturen onder de 0°C worden niet in rekening gebracht. De staat van ontbinding van het lichaam of delen ervan wordt gescoord op basis van een aangepaste methode van Gollaway et al. (1989). De scoring gebeurt onafhankelijk in drie specifieke regio's van het lichaam; het hoofd en de nek, de romp en de ledematen. De score stijgt naarmate de staat van ontbinding bevordert. De eindscore is de som van de drie getallen afkomstig van de verschillende regio's van het lichaam. De methode wordt zowel toegepast op het geheel gevonden lichaam als op lichaamsdelen. In het Engels wordt er over total body score (TBS) en part body score (PBS) gesproken. De scoring voor de ledematen is verdeeld in vier verschillende categorieën afhankelijk van de verschillende stadia van ontbinding (zie tabel 1).



**Tabel 1** Scoringssysteem van de ledematen (Megyesi 2005).

<b>Categorie</b>	<b>Stadia en (score)</b>
A. Vers	1. Vers, geen verkleuring (1pt)
B. Vroege ontbinding	1. Roze-witte verschijning met huidverlies van handen en /of voeten. (2pt) 2. Grijs tot groene verkleuring; wat huid is nog relatief vers. (3pt) 3. Verkleuring en /of bruine tinten, vooral bij randen, drogen van vingers, tenen en andere ledematen. (4pt) 4. Bruin tot zwarte verkleuring, huid met een leerachtige uitstraling. (5pt)
C. Late ontbinding	1. Vochtige ontleding met botblootstelling bij minder dan de helft van het gebied dat gescoord wordt. (6pt) 2. Mummificatie met botblootstelling bij minder dan de helft van het gebied dat gescoord wordt. (7pt)
D. Skeletvorming	1. Botblootstelling over de helft van het gebied wordt behaald, sommige weefsels worden afgebroken en lichaamsvloeistof blijft over. (8pt) 2. Botten zijn grotendeels droog, maar behouden wat vet. (9pt) 3. Droog bot. (10)

Om een antwoord te formuleren op de vraag hoe uiteindelijk het PMI geschat kan worden, wordt TBS eerst bepaald a.d.h.v. de scoringsmethode. Om ADD te vinden, wordt TBS in onderstaande vergelijking verwerkt waarin 388.16 de standaardfout van de regressie is.

$$ADD = 10^{(0.002 \cdot TBS + 1.81)} \pm 388.16$$

Het resulterend getal is het aantal verzamelde graaddagen die nodig zijn om het waargenomen stadium van ontbinding te bereiken. Terugwerkend in de tijd wordt ADD op het moment dat het lichaam ontdekt wordt, afgetrokken van de gemiddelde dagelijkse temperatuur tot ADD gelijk is aan nul. Het aantal teruggerekende dagen is een schatting van het PMI. Hoewel deze studie duidelijk de invloed van tijd en temperatuur op de staat van ontbinding aantoonde, kent het een grote spreiding waardoor het PMI enkel geschat kan worden.

De ADD wordt berekend nadat de drempeltemperatuur of in het Engels: threshold temperature is bepaald. De drempeltemperatuur vertegenwoordigt de temperatuur waarbij het biologisch proces in een organisme stopt. Een drempelwaarde van 0°C wordt gebruikt aangezien de biologische processen zoals bacteriegroei bij een lagere temperatuur worden belemmerd. ADD wordt berekend door alle gemiddelde dagelijkse temperaturen (boven 0°C) bij elkaar op te tellen

en dit vanaf de dood tot de ontdekking van het lichaam of lichaamsdelen. De gemiddelde temperaturen onder de 0°C worden niet in rekening gebracht (Megyesi, 2005).

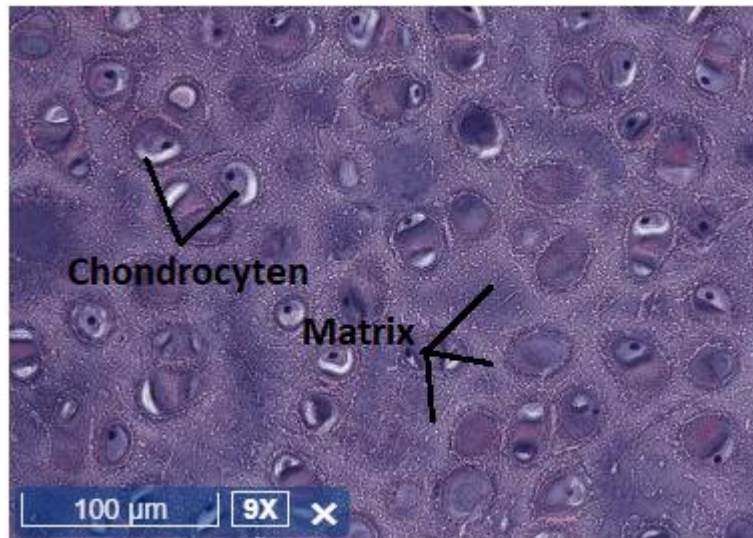
### 2.6.3 Kraakbeen

Verder geeft Alibegović (2014) in zijn studie weer, dat verschillende studies het gebruik van kraakbeen en de daling van de viabiliteit van chondrocyten aantonen. De viabiliteit van de chondrocyten vermindert geleidelijk met de tijd en temperatuur. Dit zorgt voor een objectieve bepaling van het PMI in de late postmortale fase van enkele weken. De manier waarop de bepaling van het PMI gebeurt, dient verder onderzocht te worden.

Tot slot toont Rogers et al. (2010) aan in zijn studie over de postmortale degradatie van articulaire kraakbeen in varkens, dat er microscopisch een kernverlies is naarmate de tijd vordert. Het grootste verlies is tussen de zes en negen weken postmortem, na twaalf weken wordt het kraakbeen moeilijk te herkennen en is een waarneming niet mogelijk. De studie van Hassan, Abd-Elgaber & Paulis (2016) toont eveneens een verlies van kernen en kraakbeenmatrix in functie van de tijd in het elastisch kraakbeen van het oor. Het gebruik van kraakbeen toont op basis van de uitgevoerde studies aan, dat kraakbeen als parameter kan dienen voor het PMI te schatten. Het kraakbeen is bovendien niet meteen afhankelijk van de ontbinding aangezien de ontbinding voornamelijk op vochtige plaatsen gebeurt. De biopsname is bovendien eenvoudig en kan zelfs ter plaatse (bij gevonden lichaam of lichaamsdelen) uitgevoerd worden (Alibegović, 2014).

## 2.7 Kraakbeen

Kraakbeen is een gespecialiseerde vorm van bindweefsel, dat hoofdzakelijk zorgt voor de ondersteuning van de omliggende zachte weefsels. Naast het bieden van steun, vervult het kraakbeen een essentiële rol in de verbinding van de botten, het vormen van een glijvlak voor de gewrichten en tot slot bij de groei van de pijpbeenderen (Junqueira & Carneiro, 2007). Het kraakbeen is avasculair en bestaat uit kraakbeencellen (chondrocyten) en een uitgebreide extracellulaire matrix (ECM) (zie figuur 2). Op basis van de hoeveelheid en type vezels bestaan er drie soorten, namelijk; hyalien, elastisch en vezelig kraakbeen.



**Figuur 2** De chondrocyten en matrix weergegeven in het elastisch kraakbeen (oor) van een varken met H&E kleuring.

### 2.7.1 Hyalien kraakbeen

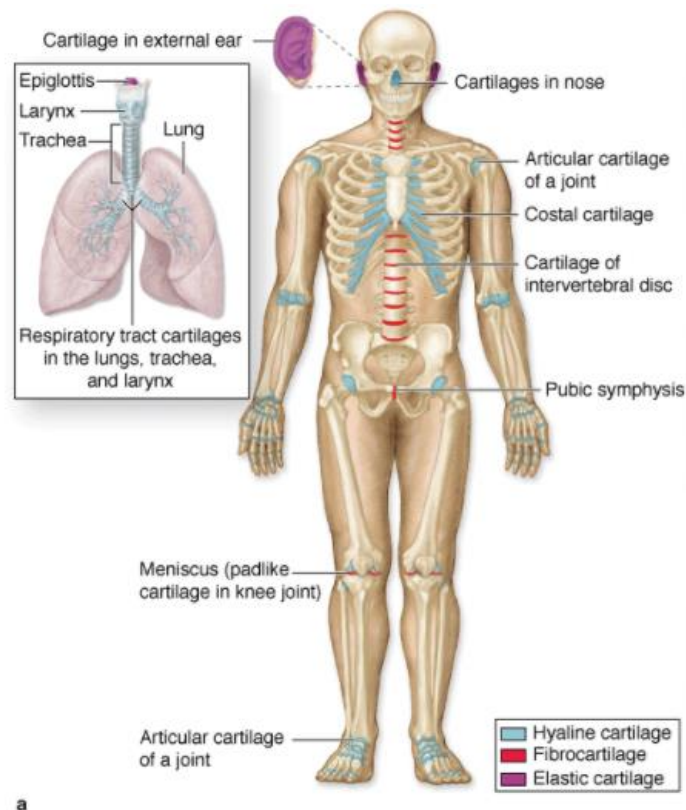
Hyalien kraakbeen bestaat voornamelijk uit collageen type II en komt voor op het oppervlak van gewrichten (gewrichtskraakbeen of articulaire kraakbeen), in de neus, larynx (strottenhoofd), trachea (luchtpijp) en alsook in de bronchi (zie figuur 2) (Eroschenko, 2000).

### 2.7.2 Elastisch kraakbeen

Het elastisch kraakbeen is vergelijkbaar met het hyalien kraakbeen, behalve dan de aanwezigheid van elastische vezels in de matrix van het elastisch kraakbeen. Dit soort kraakbeen komt voor in het buitenoor, in de buis van Eustachius en in de epiglottis (zie figuur 2) (Eroschenko, 2000).

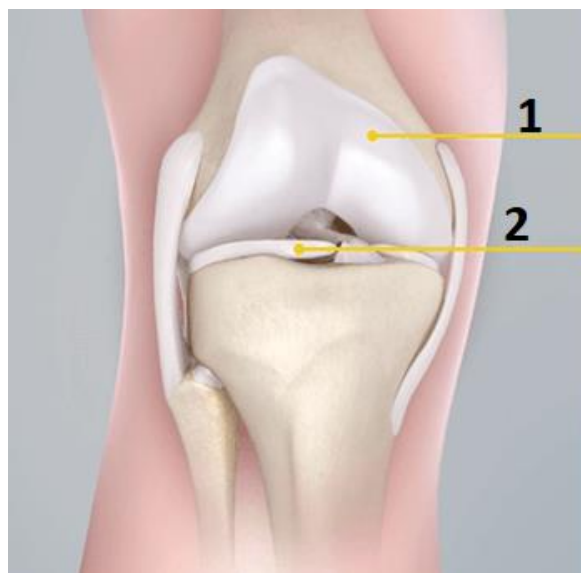
### 2.7.3 Vezelig kraakbeen

Het vezelig kraakbeen wordt gekarakteriseerd door de aanwezigheid van onregelmatige, dichte bundels van collageenvezels. In tegenstelling tot het hyalien en elastisch kraakbeen, bestaat vezelig kraakbeen uit afwisselende lagen van kraakbeenmatrix en dikke dichte lagen van type I collageenvezels (Eroschenko, 2000). Vezelig kraakbeen komt voor in de tussenwervelschijven, in de symphysis pubica en in de aanhechtingen van sommige ligamenten aan het bot. Ook de menisci bestaan uit vezelig kraakbeen (zie figuur 2) (Junqueira & Carneiro, 2007).



a  
 Source: Mescher AL, Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, 12th Edition: <http://www.accessmedicine.com>  
 Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

**Figuur 3** De verdeling van kraakbeen bij volwassenen. De drie soorten kraakbeen zijn in verschillende gebieden van het skelet verdeeld, voornamelijk in de gewrichten en waar flexibele ondersteuning nuttig is, zoals in de ribben, neus en oren (Mescher, 2015).



**Figuur 4** Locatie van het gewrichtsvlak (1), hyalien kraakbeen en van de meniscus (2), vezelig kraakbeen in de knie van de mens. (Vericel Corporation, 2017).

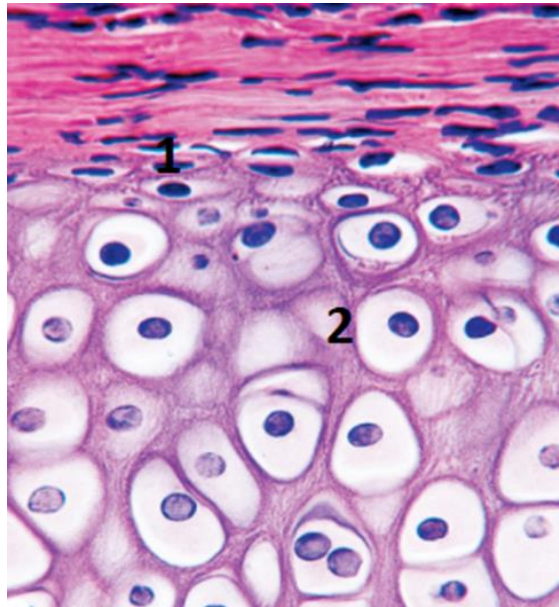
#### 2.7.4 Histogenese en groei

Kraakbeen ontstaat uit mesenchymcellen die zich gaan vermenigvuldigen en dichte opeenhopingen van cellen vormen, de chondroblasten. De chondroblasten die de kraakbeenmatrix synthetiseren, verwijderen van elkaar naarmate er meer matrix in hun omgeving wordt afgezet. De hypertrofische chondroblasten zorgen voor het ontstaan van de kraakbeencellen of chondrocyten. De mesenchymcellen aan het oppervlak van het kraakbeen ontwikkelen zich tot het perichondrium met chondroblasten en chondrocyten. Het perichondrium bestaat uit bindweefsel dat het hyalien en elastisch kraakbeen omgeeft. Het vezelig kraakbeen heeft geen perichondrium (Junqueira & Carneiro, 2007).

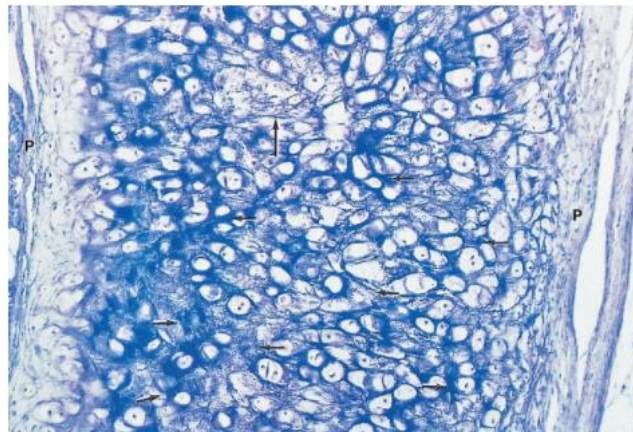
De verdere groei van het kraakbeen gebeurt enerzijds door de interstitiële groei, waarbij de chondroblasten en chondrocyten zich mitotisch vermenigvuldigen. De chondrocyten produceren het ECM. Anderzijds zullen de perichondriumcellen (chondroblasten en fibroblasten) zich tot kraakbeencellen ontwikkelen (Junqueira & Carneiro, 2007).

#### 2.7.5 De chondrocyten

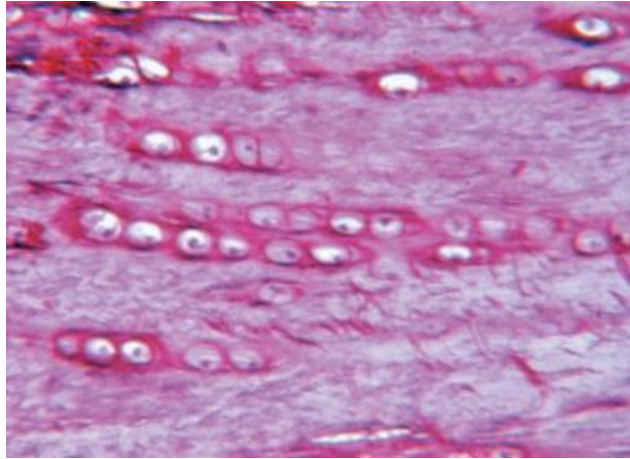
De kraakbeencellen of chondrocyten zijn gevestigd in holtes (lacunes) verspreid over de hele matrix. Ze hebben geen behoefte aan hoge zuurstofomstandigheden om te overleven en zijn afhankelijk van het anaëroob metabolisme. Hierdoor zijn chondrocyten in staat om nog na de dood weken te overleven (Alibegović, 2014). De morfologie van de chondrocyten varieert naargelang het type kraakbeen waarin ze in voorkomen. Diep in het hyalien kraakbeen lijken de chondrocyten een afgerond profiel te hebben. Perifeer in datzelfde type kraakbeen zijn ze elliptisch (zie figuur 5). Chondrocyten komen vaak voor in kleine clusters (isogene groepen) die de nakomelingen zijn van een individuele chondroblast. In het elastisch kraakbeen zijn de chondrocyten het grootst. Het resultaat is dat de isogene groepen hier dicht bij elkaar zijn (zie figuur 6). In tegenstelling tot de andere types kraakbeen, zijn de chondrocyten bij het vezelig kraakbeen minder talrijk en veel meer gescheiden (zie figuur 7) (Caceci, 2015). De cellen liggen afzonderlijk in paren of in korte rijen tussen de bundels van de dichte collageenvezels (Krause, 2005). De chondrocyten staan hoofdzakelijk in voor het onderhoud van de kraakbeenmatrix (Eroschenko, 2000).



**Figuur 5** Weergave van het hyalien kraakbeen waarin de chondrocyten perifeer elliptisch zijn (1) en in het midden hebben ze een afgeronde vorm (2). Vergroting 300x met Hematoxyline & Eosine (HE) kleuring (Mescher, 2015).



**Figuur 6** De chondrocyten van het elastisch kraakbeen (epiglottis) zijn wat betreft celgrootte en verdeling vergelijkbaar met de chondrocyten van het hyalien kraakbeen. De chondrocyten van het elastisch kraakbeen zijn wel in grotere mate aanwezig. Vergroting 100x met Weigert resorcine-fuchsine kleuring (Mescher, 2015).



**Figuur 7** Het vezelig kraakbeen (pubis symphysis) toont de rijen van chondrocyten aan. Vergroting 400x Picrosirius-hematoxyline kleuring (Mescher, 2015).

#### 2.7.6 De matrix

De kraakbeenmatrix bestaat uit vezels (collageen en elastische) en een grondsubstantie. De extracellulaire grondsubstantie is opgebouwd uit gesulfateerde glycosaminoglycanen (GAG's) en hyaluronzuur die nauw verbonden zijn met de elastische en collageenvezels binnen de grondsubstantie (Eroschenko, 2000).

## 3. Experimenten

### 3.1 Macroscopische analyse

#### 3.1.1 Materiaal en methoden

Een totaal van 21 varkenspoten en 21 varkensoren werd gebruikt voor dit onderzoek. Zestien poten en zestien oren werden gedurende een bepaalde tijdsperiode tijdens de maanden juni en juli op een bodyfarm gelegd in Den Ham, Nederland (zie figuur 8). De oren en poten werden omgeven met kippengaas en een vliegennet ter bescherming tegen aaseters en vliegen (zie figuur 9). De rest van de poten (vijf) en oren (vijf) diende als controlegroep (blanco's) en werd niet op de bodyfarm gelegd. Hierop werd meteen een macroscopische waarneming uitgevoerd. De macroscopische waarnemingen gebeurden a.d.h.v. verzameld fotomateriaal dat met een digitaal fototoestel (Nikon, D3000) werd getrokken op de bodyfarm zelf of in het labo. De poten en oren werden na 1,2,3,8,9,15,21 en 28 dag(en) verzameld, waarbij bij elk tijdsinterval telkens twee (in duplo) poten en oren werden verzameld voor de waarneming. De macroscopische veranderingen van de poten gebeurden a.d.h.v. het scoringssysteem van Megyesi (2005). Bij de oren volstond een observatie van de kleur, uitdrogingen en eventueel aanwezige gaten. Alvorens de macroscopische analyse werd uitgevoerd a.d.h.v. het scoringssysteem, werden de weergegevens van het dichts bijliggend weerstation (Heino, Nederland) verzameld (zie bijlage 1). De correlatie van de tijd en de temperatuur kon op deze manier bepaald en op de macroscopische scoring toegepast worden. De verzamelde graaddagen werden gedurende de 28 dagen verzameld (zie bijlage 1). ADD werd met een drempeltemperatuur van 0°C als volgt berekend;

$$\frac{T_{\max} + T_{\min}}{2} - 0^{\circ}\text{C}$$

De gevonden waarde is de ADD voor een dag. Zo zijn bijvoorbeeld de 133 verzamelde graaddagen op 14 juni (zie bijlage 1) de som van de gemiddelde temperaturen ( $(T_{\max} - T_{\min})/2$ ) van 7 t.e.m. 14 juni.

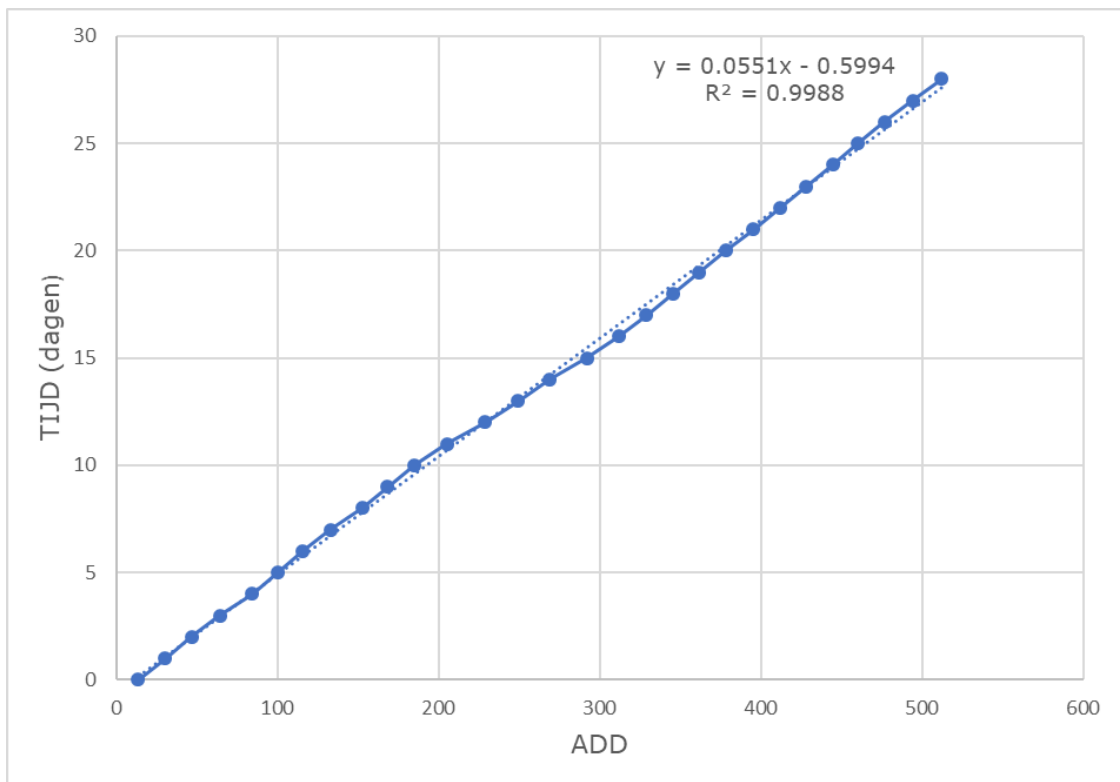




**Figuur 8** Bodyfarm gelegen in Den Ham, Nederland. **Figuur 9** Oren (links) en poten (rechts) op de bodyfarm omgeven met kippengaas en een vliegennet.

### 3.1.2 Resultaten

Grafiek 1 geeft het verband weer tussen de tijd en de verzamelde graaddagen. De gemiddelde dagelijkse temperatuur stijgt naarmate de tijd vordert. De macroscopische waarneming van de oren toont aan dat er een degelijk verschil is in kleur en in de aanwezigheid van uitdrogingen en gaten (zie tabel en bijlage 2). Bij de macroscopische waarneming van de poten wordt een stijgende stadia van ontbinding waargenomen naarmate het tijdsinterval vordert (zie bijlage 2), maar na 21 dagen is de score met een graad lager geworden (zie tabel 3). Dit verschijnsel zou mogelijk plaatsgevonden hebben door de enorme regenval op dag 21 (zie bijlage 1) waardoor het regenwater een invloed heeft gehad op onder andere het uitzicht van de poot. In grafiek 2 wordt het verband tussen een stijgende score met een verdere graad van ontbinding en de tijd weergegeven.



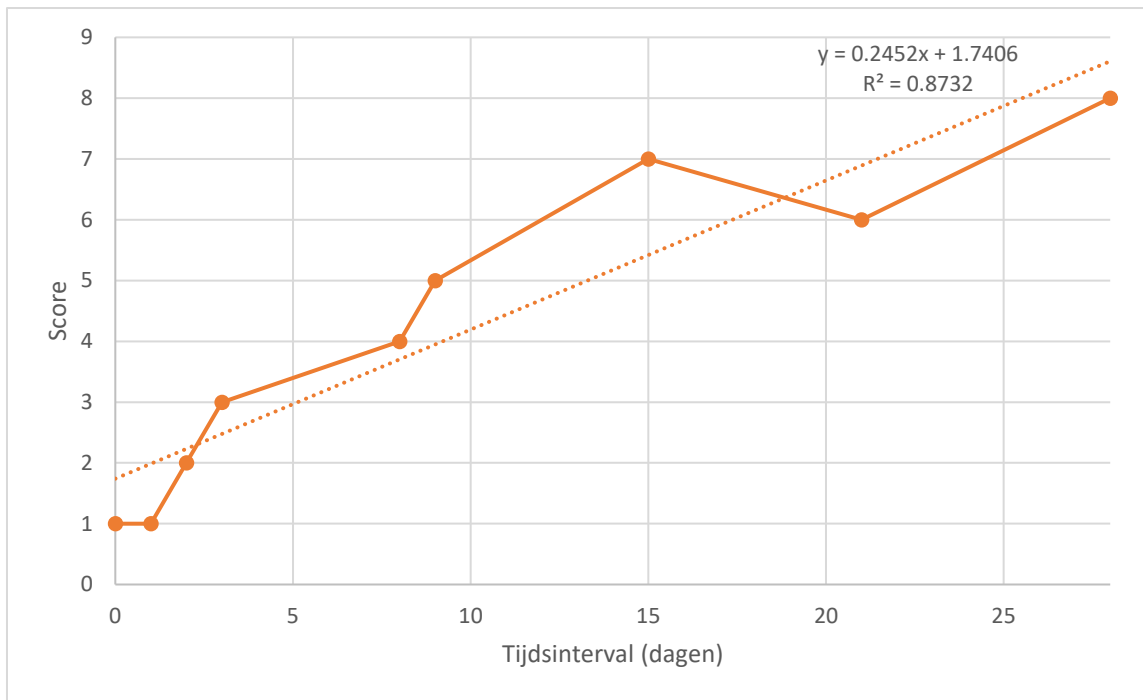
**Grafiek 1** Verband tussen de tijd en de verzamelde graaddagen als toepassing op verdere analyses.

**Tabel 2** Macroscopische waarneming van de oren (zie figuren bijlage 2).

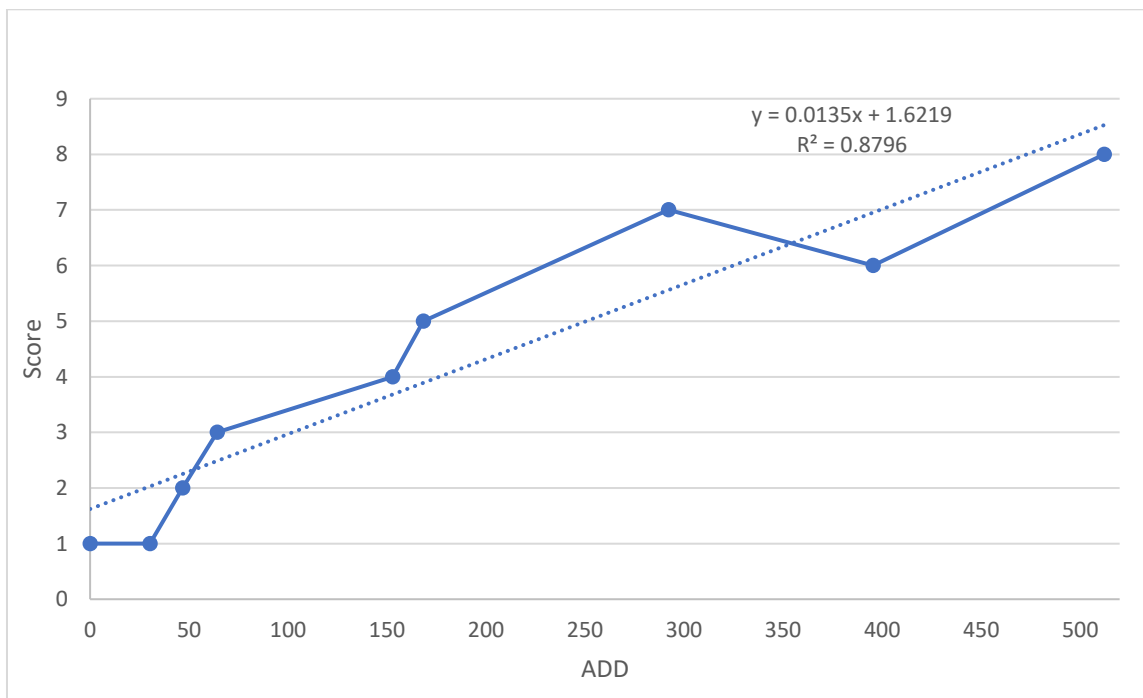
Tijdsinterval	Parameters			
	Dag(en)	Kleur	Uitdroging	Gaten
0		Lichtroze	/	/
1		Lichtroze tot lichtbruin/		/
2		Lichtbruin	Aan de randen	/
3		Lichtbruin	Aan de randen	/
8		Bruin-paars	Helemaal	/
9		Bruin-paars	Helemaal	/
15		Bruin-paars	Helemaal	/
21		Wit-lichtbruin	/	Aan de randen
28		Bruin	/	Aan de randen

**Tabel 3** Macroscopische waarneming van de poten (een poot/tijdsinterval, zie figuren bijlage 2) volgens het scoringsysteem van Megyesi (2005).

<b>Tijdsinterval (dagen)</b>	<b>Stadia van ontbinding en (score)</b>
0	Vers, geen verkleuring (1)
1	Vers, geen verkleuring (1)
2	Roze-witte verschijning (2)
3	Grijs tot groene verkleuring; wat huid is nog vers (3)
8	Verkleuring en/of bruine tinten, vooral bij randen (4)
9	Bruin tot zwarte verkleuring, huid met lederachtige uitstraling (5)
15	Mummificatie met botblootstelling bij minder dan de helft van het gebied dat gescoord wordt. (7)
21	Vochtige ontleding met botblootstelling bij minder dan de helft van het gebied dat gescoord wordt. (6)
28	Botblootstelling over de helft van het gebied wordt behaald, sommige weefsels worden afgebroken en lichaamsvloeistof blijft over. (8pt)



**Grafiek 2** Verband tussen de score van de macroscopische postmortale veranderingen en de tijdsintervallen.



**Grafiek 3** Verband tussen de score van de macroscopische postmortale veranderingen en ADD.

### 3.1.3 Discussie

Het sterk verband tussen de tijd en de verzamelde graaddagen zou toegepast kunnen worden voor de schatting van het PMI zoals beschreven werd door Megyesi (2005). Verder geeft het verband tussen de verzamelde dagen en de tijd aan, dat de temperatuur net als de tijd betrokken kan worden in de analyse van de postmortale veranderingen. Het belang om de temperatuur net als de tijd bij de postmortale ontbinding te betrekken, werd eveneens bevestigd door Megyesi (2005). De macroscopische en postmortale veranderingen van de oren en poten waarin het kraakbeen zich bevindt is een bevestiging van de studie van Rogers et al. (2010) waarbij a.d.h.v. een specifiek scoringsysteem voor articulair kraakbeen eveneens een macroscopisch verschil bij varkenspoten werd waargenomen.

## 3.2 Microscopische analyse

### 3.2.1 Materiaal en methoden

#### *Van biopt tot weefselcoupe*

De biopname gebeurde bij elk specifiek interval afzonderlijk meteen na de macroscopische waarneming. De biopten werden telkens met een scalpel met een oppervlakte van 1cm<sup>2</sup> gesneden zoals te zien is op figuur 10. Na de biopnames werden de biopten in weefselcassettes in 4% formaline gepreserveerd. Na de verschillende biopnames gedurende vier weken, werd vervolgens de weefselvoorbereiding (protocol zie bijlage 3) uitgevoerd met de citadel Tissue Processor (Leica TP 1020). De biopten werden hierna ingebed in paraffine m.b.v. een inbedtoestel (Thermo Scientific, HistoStar). Van de gevormde blokjes werd doormiddel van een microtoom (Thermo Scientific, Microm HM 450) plakjes gesneden met een dikte van 4 micron. De plakjes werden op een draagglas (Superfrost Plus) met water, op een verwarmplaat op 37°C gedroogd. Tot slot werden deze coupes in een droogoven (Binder TP 115) op 37°C bewaard.



**Figuur 10** Biopt 1cm op 1 cm afkomstig van varkensoor (elastisch kraakbeen).

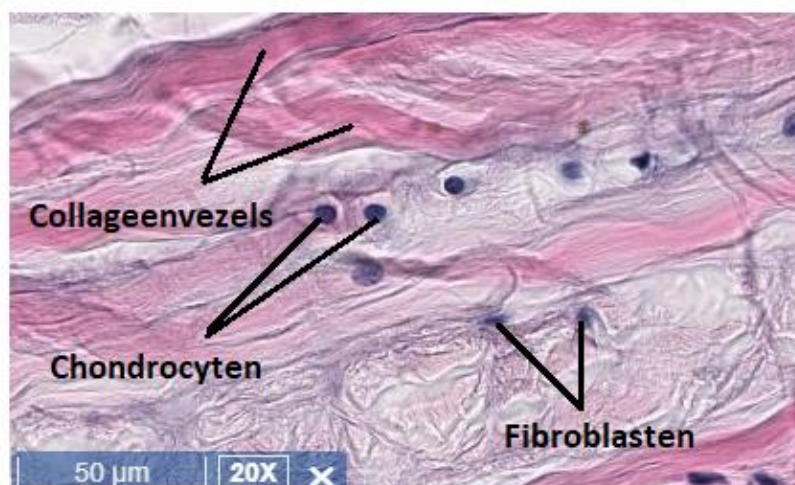
### *Hematoxyline & Eosine (H&E) kleuring*

De coupes werden hierna gekleurd met de klassieke H&E kleuring (protocol zie bijlage 4), zodat de weefselstructuren aangekleurd worden. De kernen kleuren blauw en het cytoplasma normaal roze, maar door de GAG's kleurt het cytoplasma in enkele soorten kraakbeen blauw. Na de H&E kleuring werd enerzijds de celtelling en anderzijds de microscopisch vergelijkende analyse van de coupes uitgevoerd.

### *Celtellingen*

Na de H&E kleuringen te hebben uitgevoerd werden de coupes m.b.v. een scanapparaat (Leica, APERIO CS 2) op de computer met een vergroting van 40x verwerkt. Voor de tellingen werden oorspronkelijk de coupes van de blanco en die van 21 dagen met elkaar vergeleken, dit om na te gaan of er een verschil vastgesteld kon worden in het aantal chondrocyten tussen de controlegroep en het tijdsinterval van 21 dagen. De tellingen op de coupes van het hyalien en elastisch kraakbeen gebeurden door verschillende regio's te selecteren met een gelijke oppervlakte van 0,25mm<sup>2</sup> in het gebied met de grootste dichtheid (het donkerst gebied), vermits de cellen daar het best gekleurd werden. De selectie van de celregio's en de celtelling werden op een systematische manier uitgevoerd zodat er een betrouwbaar resultaat verkregen kon worden. De selectie van de celregio's en de celtelling werd uitgevoerd a.d.h.v. een software (Aperio, ImageScope). De telling werd niet uitgevoerd op de coupes van het vezelig kraakbeen aangezien de aanwezigheid van verschillende structuren (o.a. collageenvezels) en celniveaus met name het celtype (fibroblasten en chondrocyten) voor differentiatie zorgde wat bijgevolg tot een subjectieve waarneming zou resulteren waar geen conclusies van getrokken kunnen worden (zie figuur 11).

Er werd voor de telling van de coupes van het elastisch en hyalien kraakbeen respectievelijk vijf en drie controles (coupes) geteld. Voor de coupes van de andere tijdsintervallen werd telkens een en bij enkele twee coupes geteld (zie bijlage 5). De resultaten werden in functie van het tijdsinterval uitgezet. De coupes van week drie (dag 15) werden bij het hyalien kraakbeen niet geteld aangezien de genomen biopst geen kraakbeen was.



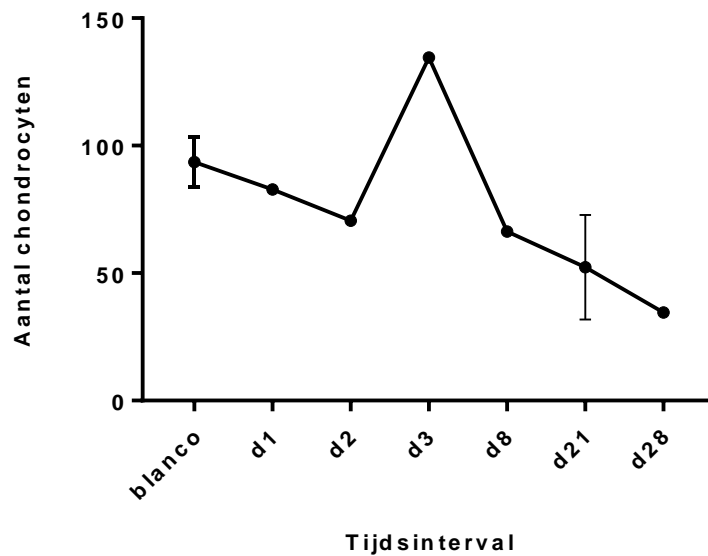
**Figuur 11** Het vezelig kraakbeen met de aanwezigheid van collageenvezels, chondrocyten en fibroblasten. Afkomstig van meniscus van een varken, 20x vergroting met H&E kleuring.

### Vergelijkende analyse van de coupes

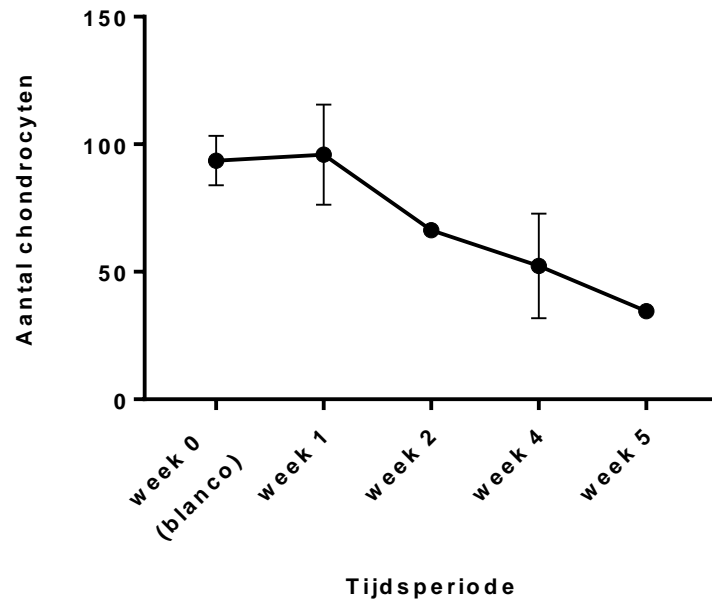
Na de H&E kleuring werden naast de tellingen, de verschillende coupes van elk type kraakbeen met elkaar vergeleken. De coupes van de verschillende tijdsintervallen van zowel het elastisch als het vezelig en hyalien kraakbeen werden m.b.v. het digitale histopathologie software (histosrv VUB) met elkaar vergeleken.

### 3.2.2 Resultaten

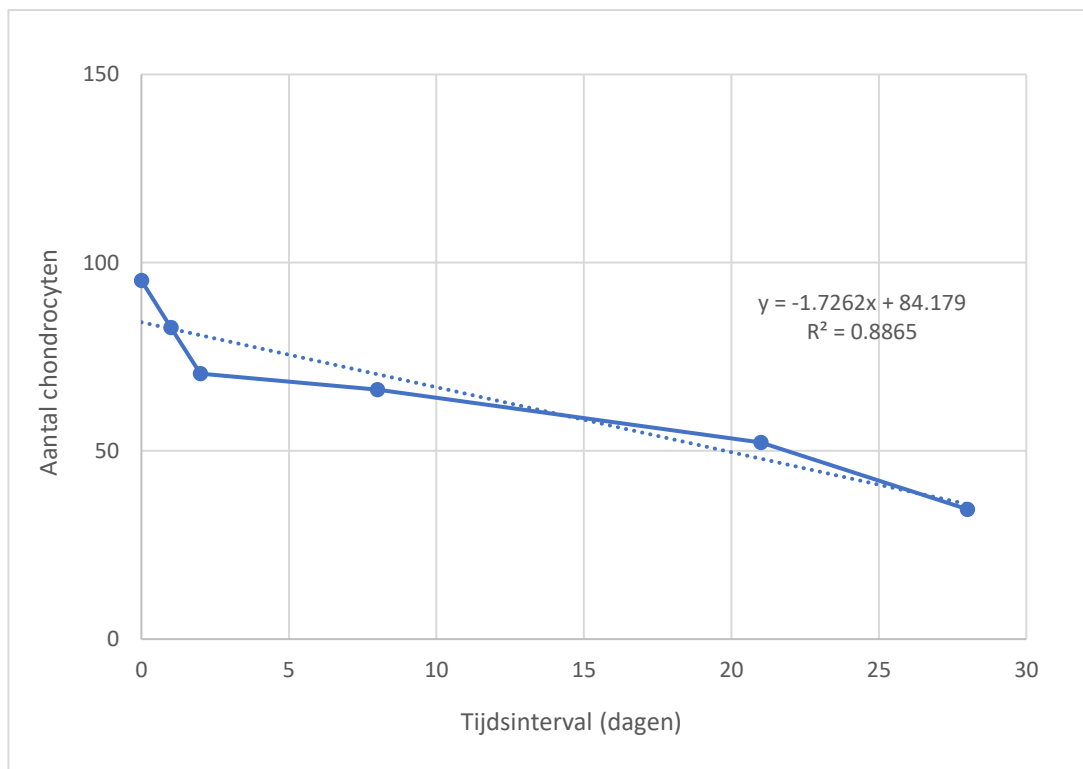
#### *Hyalien kraakbeen*



**Grafiek 4** Het aantal chondrocyten in het hyalien kraakbeen bij de verschillende tijdsintervallen in dagen.

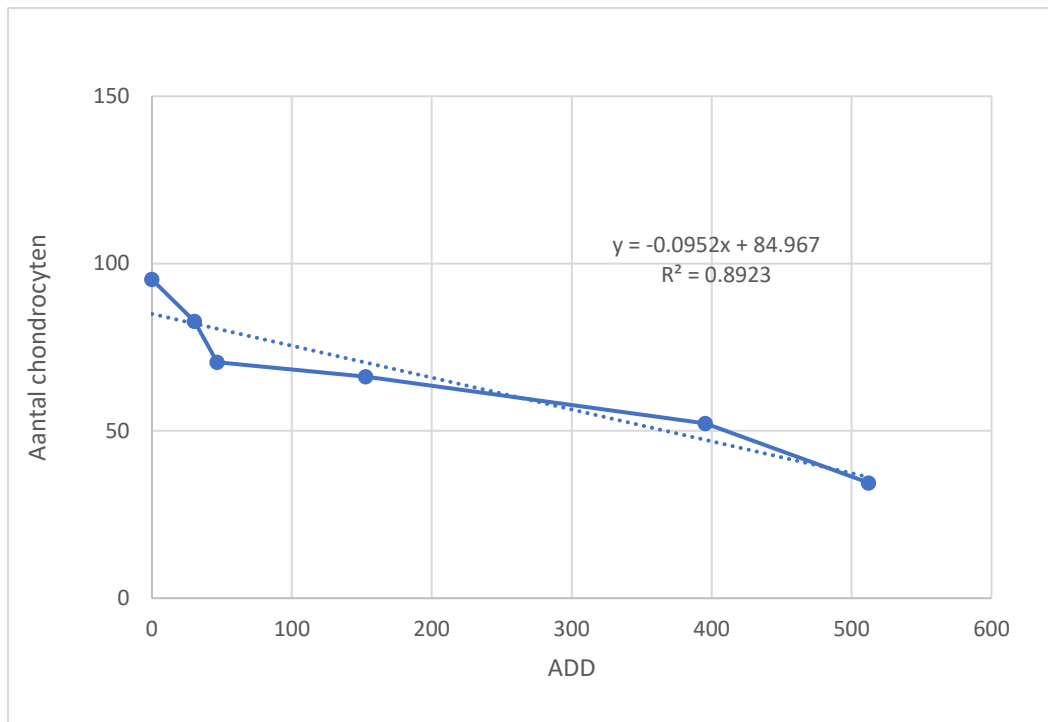


**Grafiek 5** Het aantal chondrocyten in het hyalien kraakbeen in de verschillende weekperiodes.

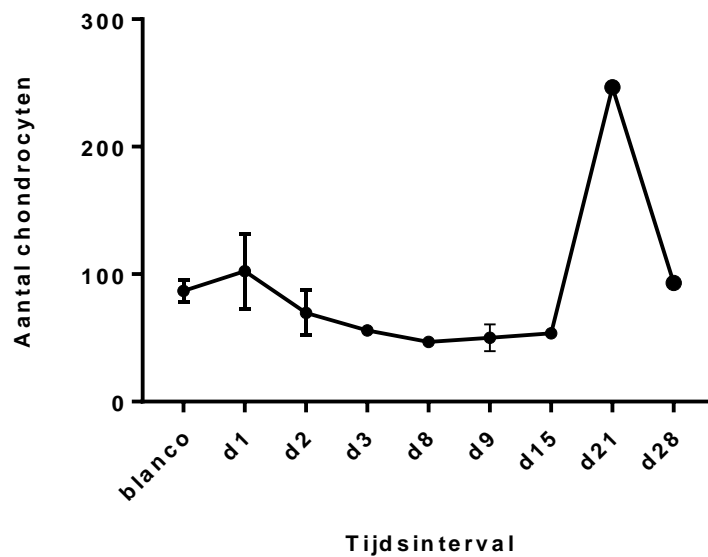


**Grafiek 6** Het aantal chondrocyten in het hyalien kraakbeen in de verschillende periodes (zonder dag 3).

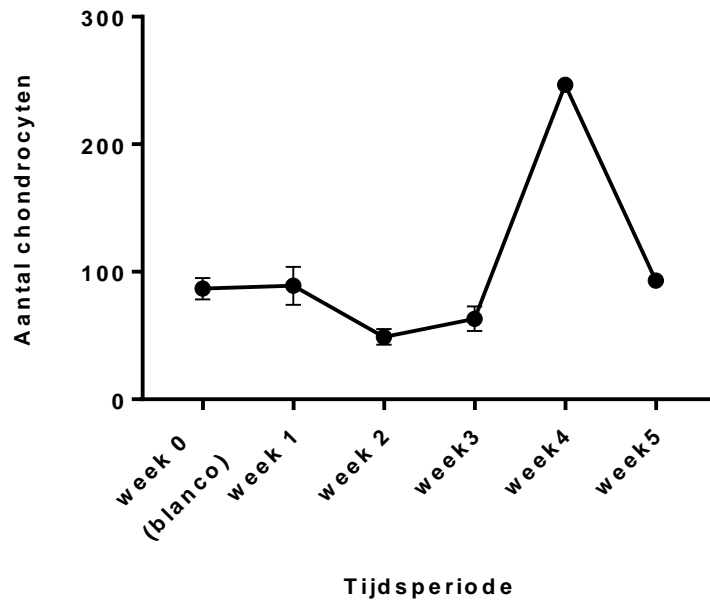




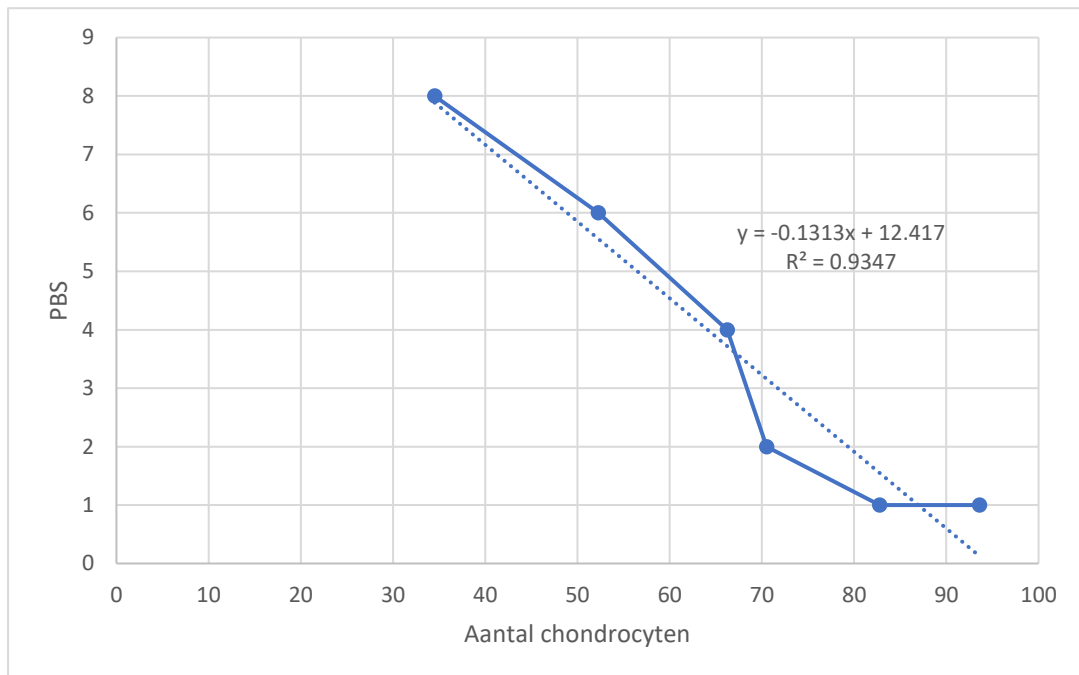
**Grafiek 7** Het aantal chondrocyten in functie van ADD (zonder dag 3).



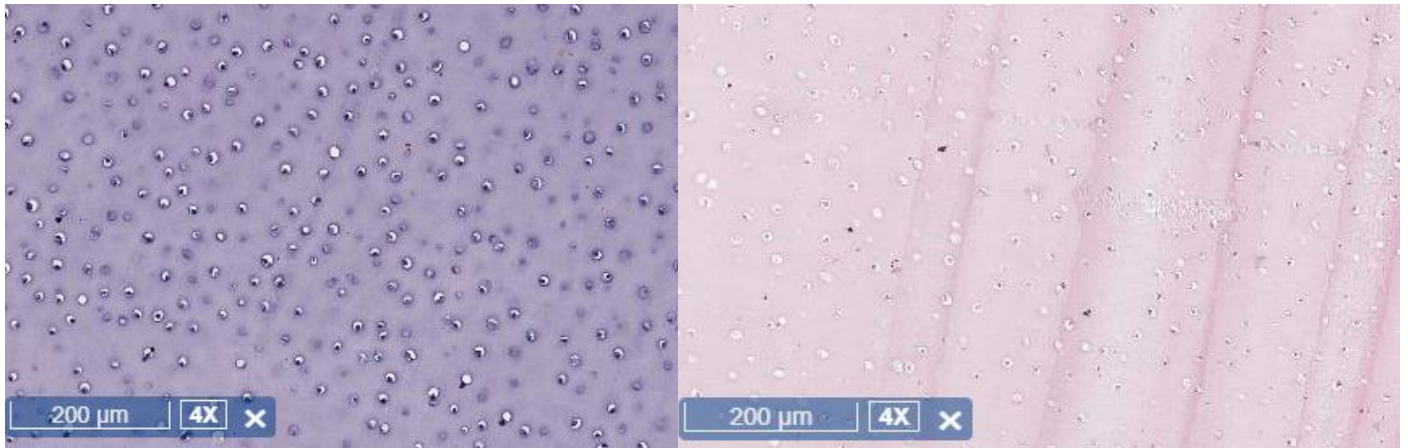
**Grafiek 8** Het aantal chondrocyten in het elastisch kraakbeen bij de verschillende tijdsintervallen in dagen.



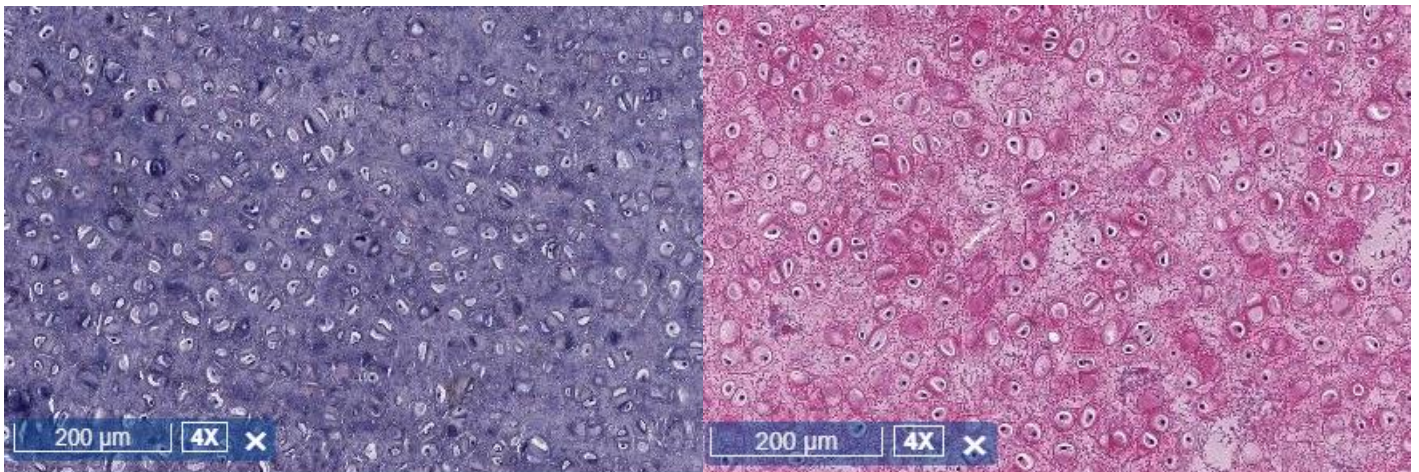
**Grafiek 9** Het aantal chondrocyten in het elastisch kraakbeen in de verschillende weekperiodes.



**Grafiek 10** Part Body Score (PBS) van de poten in functie van het aantal chondrocyten. Het verband tussen macro- en microscopische veranderingen bij hyalien kraakbeen aan het gewrichtsvlak, zonder de resultaten van dag drie (beschouwd als outlier).



**Figuur 12** Microscopisch vergelijkend onderzoek van het hyalien kraakbeen tussen coupe van blanco (links) en coupe na 8 dagen postmortem (rechts). Gewrichtsvlak varken met H&E kleuring.



**Figuur 13** Microscopisch vergelijkend onderzoek van het elastisch kraakbeen tussen coupe van blanco (links) en coupe na 21 dagen postmortem (rechts). Varkensoor met H&E kleuring

### 3.2.3 Discussie

Bij de microscopische analyse van het hyalien kraakbeen wordt een daling van het aantal chondrocyten waargenomen na de biopname van respectievelijk 1,2,3,8,21 en 28 dagen. Deze daling stemt overeen met de bevindingen van Rogers et al. (2010) en Alibegović (2014). De chondrocyten die weinig behoefte hebben aan nutriënten en zuurstof zoals beschreven werd door Alibegović (2014), kunnen na de dood nog weken overleven. De vraag blijft echter of de stijging van de cellen na drie dagen te verklaren is door de verdere differentiatie van de cellen. Daarnaast kunnen de weeromstandigheden (zie data weerstation bijlage 1) met voornamelijk de neerslag een invloed hebben gehad op het hyalien kraakbeen dat in deze studie blootgesteld was aan de omgeving en het regenwater rechtstreeks contact kon maken met het gewrichtsvlak. Indien het aantal chondrocyten in functie van de tijdsperiodes in weken wordt bepaald zoals weergegeven in grafiek vijf, dan valt de daling van het aantal chondrocyten op. In de eerste week kan een kleine stijging van het aantal chondrocyten waargenomen worden, dit komt omdat de resultaten van dag drie hierin voorkomen. Overigens wordt in week twee, vier en vijf een daling van het aantal chondrocyten waargenomen die bevestigt dat het aantal chondrocyten niet gelijk blijft, maar integendeel daalt naarmate de tijd vordert.

Indien het resultaat van dag drie als uitschieter beschouwd zou worden en de andere resultaten in functie van de tijdsintervallen uitgezet wordt, dan bestaat er een zekere correlatie van het aantal cellen naarmate de tijd vordert, zoals weergegeven in grafiek zes. Net zoals bij de macroscopische analyse wordt hier eveneens nagegaan of er een verband bestaat tussen het aantal chondrocyten en ADD. In grafiek zeven kan er een verband waargenomen worden die zelfs sterker is dan wanneer het aantal chondrocyten enkel in functie van het tijdsinterval uitgezet wordt. Zowel de tijd als temperatuur hebben een invloed op het aantal chondrocyten. ADD kan aldus niet enkel toegepast worden op de macroscopische postmortale veranderingen, zoals beschreven is door Megyesi (2005), maar eveneens op de microscopische veranderingen.

Bij het elastisch kraakbeen kan er ook een geleidelijke daling van het aantal cellen waargenomen worden, zoals weergegeven in grafiek acht. Op dag 1,9 en 15 lijkt het aantal cellen groter te worden. Wat duidelijk op te merken valt, is de enorme stijging op dag 21 die op dag 28 terug begint te dalen. Deze stijging is te vergelijken met de stijging die bij het hyalien kraakbeen ook voorkomt, maar wel vroeger namelijk op dag 3 (zie grafiek vier). Hoewel er geen duidelijk patroon is van het aantal cellen, werd er reeds aangetoond in de studie van Hassan, Abd-Elgaber & Paulis (2016), dat er een verlies van kernmateriaal is in het elastisch kraakbeen (oren) bij konijnen, naarmate de postmortale periode langer wordt. Net als bij het hyalien kraakbeen zijn de mogelijke verklaringen voor de stijging van het aantal chondrocyten, door enerzijds de verdere differentiatie van de chondrocyten na de dood die wellicht later optrad in het elastisch kraakbeen doordat de oren afgeschermd waren met huid. Anderzijds had het op dag 21 enorm geregend (zie data weerstation bijlage 1), waardoor dit mogelijk een invloed zou hebben gehad op het verder verloop van het aantal chondrocyten.

Indien het aantal chondrocyten in functie van de tijdsperiodes in weken wordt uitgezet zoals te zien is in grafiek negen, dan kan er geen geleidelijke dalend patroon waargenomen worden. Er bestaat een afwisseling van een stijging en

daling. Deze variatie kan erop wijzen dat de chondrocyten niet enkel afhankelijk zijn van de tijd die vordert, maar dat er bij deze veranderingen andere factoren bij betrokken zijn.

Zowel macro- als microscopische veranderingen komen vaak voor in studies op kraakbeen als parameter voor het PMI. De studie van Hassan, Abd-Elgaber & Paulis (2016) en Rogers et al. (2010) bevestigen de aanwezige veranderingen zowel in het elastisch als articulaire kraakbeen, naarmate de postmortale periode langer wordt, maar het verband daarentegen tussen de macro- en microscopische veranderingen is onduidelijk. Het verband tussen de macro- en microscopische veranderingen van het hyalien kraakbeen is weergegeven in grafiek 10. Het omgekeerd rechtlijnig verband tussen de macro- en microscopische veranderingen toont een daling van het aantal chondrocyten bij een stijgende PBS-score (gevorderde stadia van ontbinding).

Het microscopisch vergelijkend onderzoek toont een opmerkelijk kleurverschil bij zowel het elastisch als hyalien kraakbeen. Het kleurverschil is vooral in de matrix waar te nemen. De studie van Hassan, Abd-Elgaber & Paulis (2016) bevestigt dit aangezien een daling van de matrixdensiteit in het elastisch kraakbeen bij konijnen werd aangetoond. De kleurverandering is echter van blauw naar (licht)roze en wordt dus zowel bij het hyalien als elastisch kraakbeen wel bij een verschillend tijdsinterval waarneembaar. Bij het vezelig kraakbeen werd geen duidelijk kleurverschil waargenomen (zie bijlage zes voor alle figuren van het vergelijkend onderzoek).

#### 3.2.4 Conclusie

Dit onderzoek op kraakbeen toont aan dat er verschillende methoden bestaan die toegepast kunnen worden om het PMI te schatten. De daling van het aantal chondrocyten is duidelijk te volgen in het hyalien kraakbeen, welke als schattingsmethode voor het PMI gebruikt kan worden. Het verband tussen de macroscopische waarneming en het aantal chondrocyten wordt alsook best toegepast op hyalien kraakbeen. Bovendien geeft het microscopisch vergelijkend onderzoek een duidelijk beeld van de postmortale periode die in praktijk verder omgezet kan worden. Het elastisch en hyalien kraakbeen worden hiervoor gebruikt. Bij het microscopisch vergelijkend onderzoek kan een stap verder gezet worden. De celdensiteit kan met behulp van een beeldverwerkingsprogramma (bijv. ImageJ) bepaald worden. Hierdoor kunnen de verschillende verkregen getallen met elkaar vergeleken worden en kan een vergelijking op een objectievere manier uitgevoerd worden.

Wel op te merken valt dat er beperkingen zijn in de toepassing van de gevonden resultaten. Door de invloed van de omgevingsfactoren met name de neerslag en door een opmerkelijk klimaatverschil kunnen dezelfde bevindingen afhankelijk van de regio van elkaar afwijken. Hiervoor dient een gelijkaardig onderzoek in de gewenste regio uitgevoerd te worden. Het is bovendien van cruciaal belang dat er verder onderzoek dient gedaan te worden op menselijk kraakbeen om na te gaan of de verkregen resultaten in forensische cases toegepast kunnen worden. Tot slot kent dit onderzoek een rechtstreekse toepassing bij de bepaling van het PMI in het dierenrijk of in andere forensische gevallen waar sprake is van wildstroperij.

## Bibliografie

- Alibegović, A. (2014, Augustus 19). *Journal of Forensic and Legal Medicine*. Opgehaald Juli 2017, from [www.elsevier.com/locate/jflm](http://www.elsevier.com/locate/jflm): Cartilage: A new parameter for the determination of the postmortem interval?
- Boel, P. D. (2015). *Forensisch onderzoek De mogelijkheden van het forensisch onderzoek*. Brussel: politeia.
- Cromheecke, M. (2012). *Kraakbeendefecten in het kniegewricht*. Gent : UGent.
- Eroschenko, P. (2000). *Atlas of histology with functional correlations*. Pennsylvania : Lisa JC Franko.
- Junqueira, L. &. (2007). *Functionele histologie* . Maarsen: Elsevier .
- Loeffen, M. (2012, November 4). *BrainMatters*. Retrieved from <http://www.brainmatters.nl/terms/hersenstam/brainstem/>
- Megyesi, S. N. (2005, Mei). *NCBI*. Retrieved from Pubmed: Using Accumulated Degree-Days to Estimate the Postmortem Interval from Decomposed Human Remains
- Meshner, L. (2015). *JUNQUEIRA's Basic Histology Text and Atlas*. Indiana: McGrawHill Education.
- Paulis, G. H.-E. (2016, Januari). Retrieved from Researchgate: Estimation of postmortem interval from cartilage changes of rabbit auricle
- Rao, N. G. (2010). *The Health Sciences Publisher*. Retrieved from JAYPEE.
- Rogers, S. W. (2010, Februari ). *Journal of Forensic and Legal Medicine*. Retrieved from ResearchGate: Postmortem degradation of porcine articular cartilage
- Stoughton, H. &. (2011). *Simpson's Forensic Medicine* . In J. K. Payne-James, *Simpson's Forensic Medicine* (p. 245). Londen: Hodder Education. Retrieved from <https://scm2016.files.wordpress.com/2014/05/simpson-forensic-medicine.pdf>
- Vericel Corporation. (2017). *maci*. Retrieved from <http://www.maci.com/patients/about-knee-pain/knee-pain-and-anatomy.html>
- Williams, A. &. (2017). In *Forensic Science Education and Training* (p. 191). UK : Wiley .

## 6. Bijlagen

### Bijlage 1 Data weerstation Heino, Nederland en ADD

		datum	Temperatuur (°C)			luchtvochtigheid (%)	Neerslag		ADD 0°C
			gemid.	max	min		hoev.(mm)	duur(u)	
woensdag	Start	7/jun	13.7	16	11.4	73	1.8	1.9	13.7
donderdag	<b>Dag 1</b>	8/jun	16.6	23.1	12.3	73	1.2	0.8	30.3
vrijdag	<b>Dag 2</b>	9/jun	16.4	19.6	12.1	76	17	5.1	46.7
zaterdag	<b>Dag 3</b>	10/jun	17.5	22.8	10.7	71	0	0	64.2
zondag	Dag 4	11/jun	20.3	27.6	12.4	65	0	0	84.5
maandag	Dag 5	12/jun	15.7	17.4	13	72	0.1	0.1	100.2
dinsdag	Dag 6	13/jun	15.6	20.2	9.1	73	0	0	115.8
woensdag	Dag 7	14/jun	17.2	23.8	6.8	67	0	0	133
donderdag	<b>Dag 8</b>	15/jun	19.7	27.4	11.9	68	0	0	152.7
vrijdag	<b>Dag 9</b>	16/jun	15.6	18.4	10.9	75	0	0	168.3
zaterdag	Dag 10	17/jun	17	21.6	10.2	80	0	0	185.3
zondag	Dag 11	18/jun	20.1	27.5	10.2	75	0	0	205.4
maandag	Dag 12	19/jun	23.7	30.8	13.7	63	0	0	229.1
dinsdag	Dag 13	20/jun	20.2	25.9	13	70	0	0	249.3
woensdag	Dag 14	21/jun	19.7	26.9	11.2	64	0	0	269
donderdag	<b>Dag 15</b>	22/jun	23.1	32.1	16.4	66	2.8	0.8	292.1
vrijdag	Dag 16	23/jun	19.6	24	16.5	69	0	0	311.7
zaterdag	Dag 17	24/jun	17.3	19.4	16.2	88	2.3	2	329
zondag	Dag 18	25/jun	16.7	19	15.3	90	4.9	3.5	345.7
maandag	Dag 19	26/jun	16.2	20.6	9.7	69	0.6	0.6	361.9
dinsdag	Dag 20	27/jun	16.2	21.7	8.5	76	1.5	2.6	378.1
woensdag	<b>Dag 21</b>	28/jun	17.4	23.2	13.9	96	43.3	9.6	395.5
donderdag	Dag 22	29/jun	16.7	19.3	13.3	93	5.8	2	412.2
vrijdag	Dag 23	30/jun	16.1	19.6	13.2	90	5.6	3.1	428.3
zaterdag	Dag 24	1/jul	16.3	21.1	13.1	89	6.6	4.8	444.6
zondag	Dag 25	2/jul	15.5	19.8	9.9	81	<0.05	0	460.1
maandag	Dag 26	3/jul	16.6	21.9	9.5	76	<0.05	0	476.7
dinsdag	Dag 27	4/jul	17.5	21.5	13.3	69	0	0	494.2
woensdag	<b>Dag 28</b>	5/jul	18	23.2	12.7	79	0	0	512.2

Bijlage 2 Fotomateriaal van poten en oren na bepaalde tijdsintervallen.



**Figuur 14** Varkenspoten en oor na 0 dagen (controle).



**Figuur 15** Varkenspoten en oor na 1 dag.



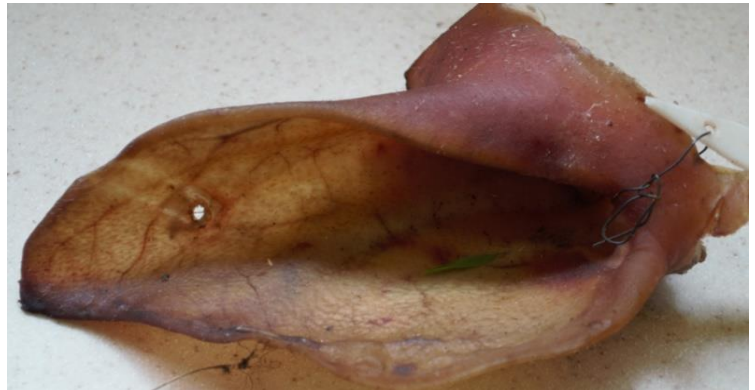


**Figuur 16** Varkenspoot en oor na 2 dagen.



**Figuur 17** Varkenspoot en oor na 3 dagen.





**Figuur 18** Varkenspoot en oor na 8 dagen.



**Figuur 19** Varkenspoot en oor na 9 dagen.



**Figuur 20** Varkenspoot en oor na 15 dagen.



**Figuur 21** Varkenspoot en oor na 21 dagen.



**Figuur 22** Varkenspoot en oor na 28 dagen.

Bijlage 3 Protocol weefselvoorbereiding met de citadel Tissue Processor (Leica TP 1020).

**P1**

-startpositie= 2-propanol 70%

-duur: 19uur

<b>2)</b>	<b>2-PROPANOL 70%</b>	<b>2uur</b>
<b>3)</b>	<b>2-PROPANOL 70%</b>	<b>2uur</b>
<b>4)</b>	<b>2-PROPANOL 90%</b>	<b>2uur</b>
<b>5)</b>	<b>2-PROPANOL 90%</b>	<b>2uur</b>
<b>6)</b>	<b>2-PROPANOL</b>	<b>2uur</b>
<b>7)</b>	<b>2-PROPANOL</b>	<b>2uur</b>
<b>8)</b>	<b>TOLUEEN</b>	<b>1uur</b>
<b>9)</b>	<b>TOLUEEN</b>	<b>1uur</b>
<b>10)</b>	<b>TOLUEEN</b>	<b>1uur</b>
<b>11)</b>	<b>PARAFINNE</b>	<b>2uur</b>
<b>12)</b>	<b>PARAFINNE</b>	<b>2uur</b>

## Bijlage 4 Protocol hematoxyline en eosine kleuring

Gebruikte protocol op de dienst EXPA aan de VUB.

- Plaats de coupes minstens 30 minuten in de droogoven (Binder TP 115) op 60°C.
- Deparaffineer de coupes gedurende **5 minuten in toluol bad I, II**
- Breng de coupes over in **iso-propylalcohol bad I en II gedurende 2 minuten**
- Breng de coupes over in **iso-propylalcohol 90% gedurende 2 minuten**
- Breng de coupes over in **iso-propylalcohol 70% gedurende 2 minuten**
- Spoel de coupes gedurende **5 minuten in stromend leidingwater**
- Kleur de coupes gedurende **10 minuten in Haematoxyline oplossing** (filtreer voor gebruik)
- Spoel de coupes gedurende **2 minuten in stromend leidingwater**
- Dompel de coupes gedurende **2 minuten in HCl oplossing**
- Spoel de coupes gedurende **1 minuut in stromend leidingwater**
- Dompel de coupes **enkele seconden** onder **lithiumcarbonaat**
- Spoel gedurende **1 minuut in stromend leidingwater**
- Kleur de coupes gedurende **5 minuut in Erythrosine B oplossing**
- Spoel kort in stromend leidingwater
- Dehydrateer de coupes in **iso-propylalcohol 70% gedurende 30 seconden**
- Dehydrateer de coupes in **iso-propylalcohol 90% gedurende 30 seconden**
- Dehydrateer de coupes in **iso-propylalcohol bad I en II gedurende 30 seconden**
- Breng de coupes over in **toluol bad I gedurende 1 minuut**
- Breng de coupes over in toluol bad II
- Monteer de coupes met Pertex mounting medium

Bijlage 5 Resultaten celtellingen bij hyalien en elastisch kraakbeen.

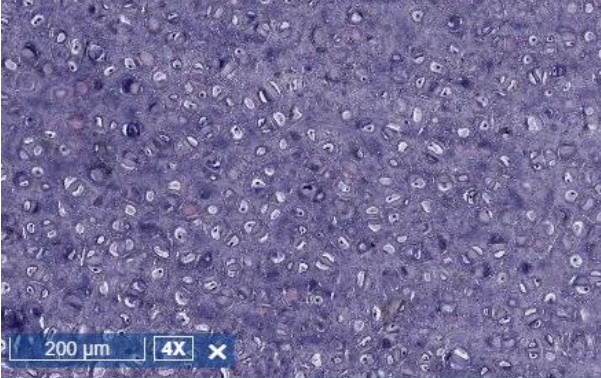
<b>Tijdsinterval</b>	<b>blanco</b>	<b>d1</b>	<b>d2</b>	<b>d3</b>	<b>d8</b>	<b>d21</b>	<b>d28</b>
<b>Coupe 1</b>	95.25	82.75	70.5	134.5	66.25	72.75	34.5
<b>Coupe 2</b>	109.5					31.75	
<b>Coupe 3</b>	76						

<b>Tijdsinterval</b>	<b>blanco</b>	<b>d1</b>	<b>d2</b>	<b>d3</b>	<b>d8</b>	<b>d9</b>	<b>d15</b>	<b>d21</b>	<b>d28</b>
<b>Coupe 1</b>	87.5	131.75	87.25	55.75	46.75	60.5	53.5	246.5	93
<b>Coupe 2</b>	109	72.75	52			39.5			
<b>Coupe 3</b>	86.5								
<b>Coupe 4</b>	93								
<b>Coupe 5</b>	57.75								

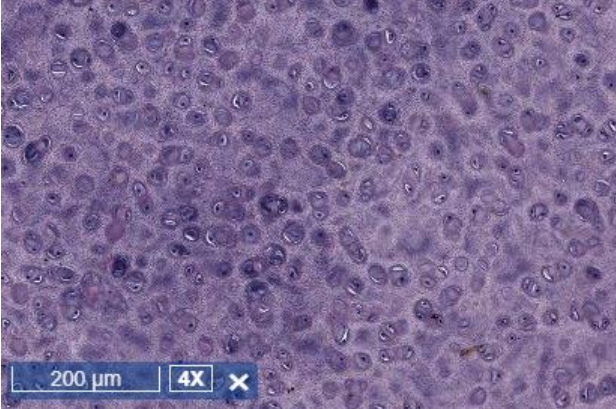
Bijlage 6 Figuren van het microscopisch vergelijkend onderzoek

Elastisch kraakbeen

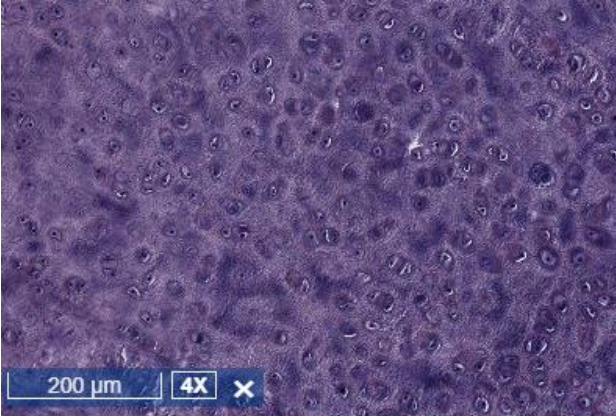
Blanco



Na 1 dag

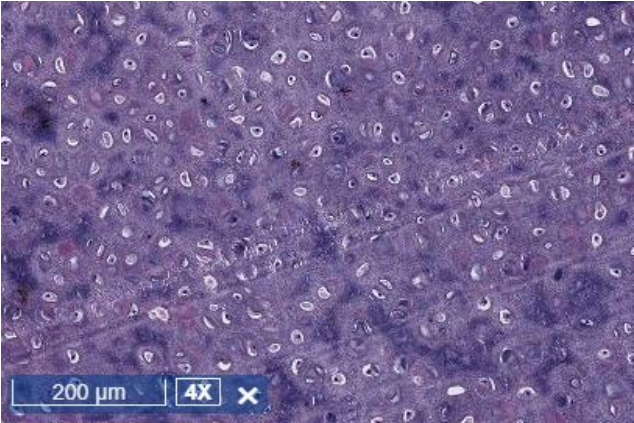


Na 2 dagen

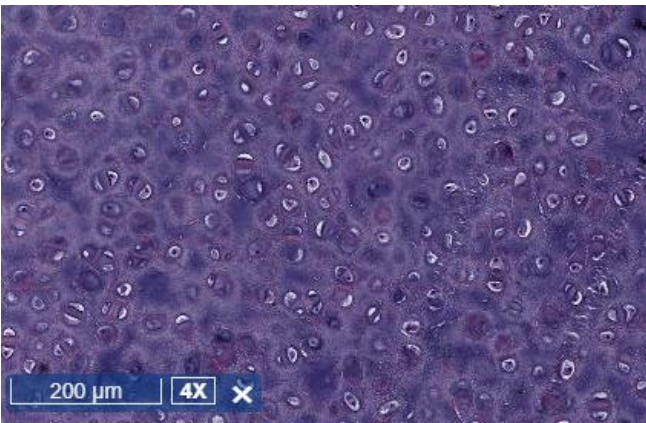




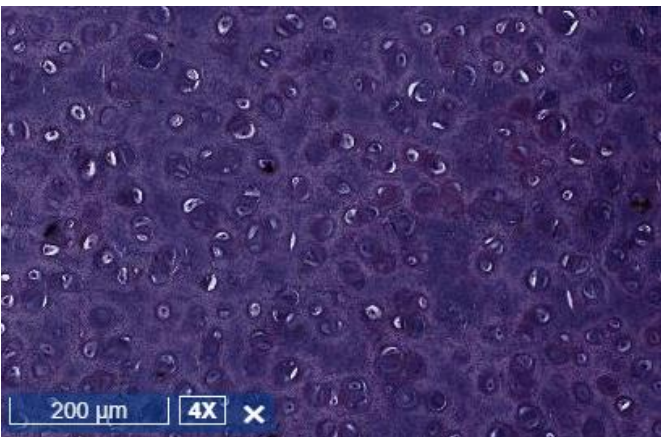
Na 3 dagen



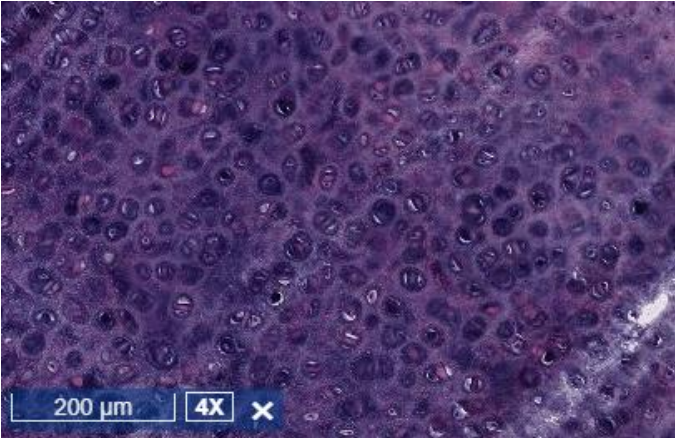
Na 8 dagen



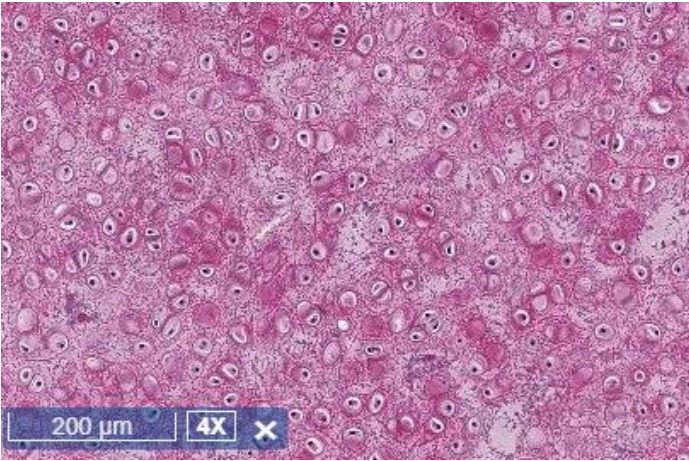
Na 9 dagen



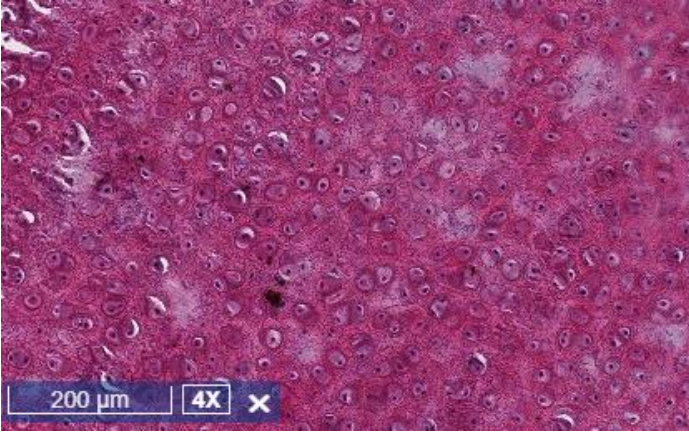
Na 15 dagen



Na 21 dagen

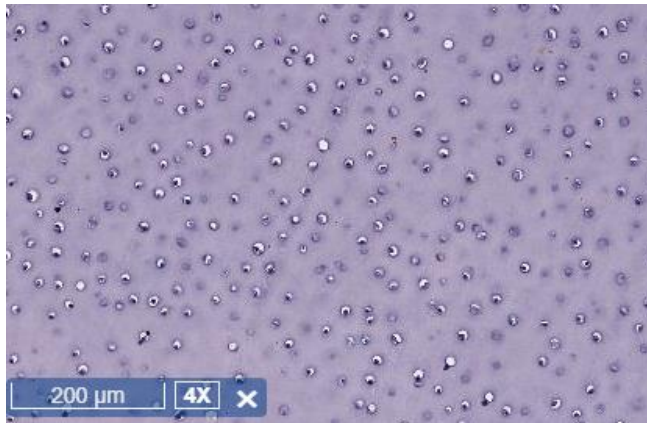


Na 28 dagen

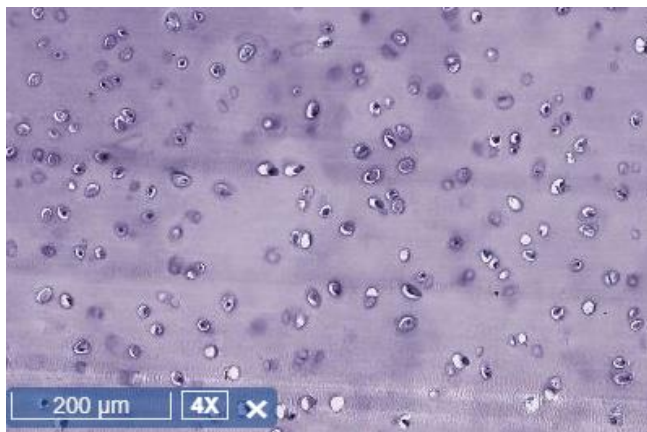


Hyalien kraakbeen

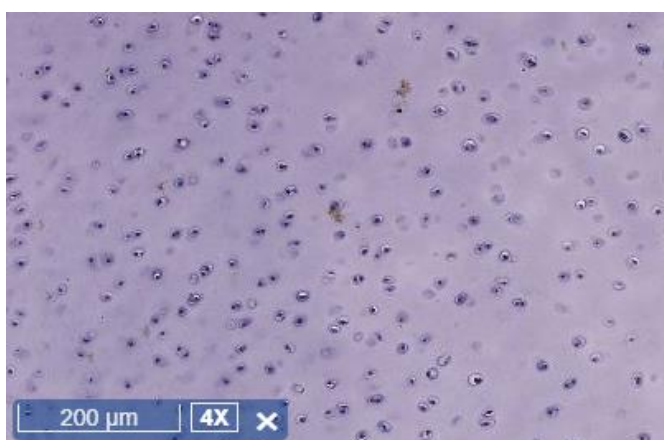
Blanco



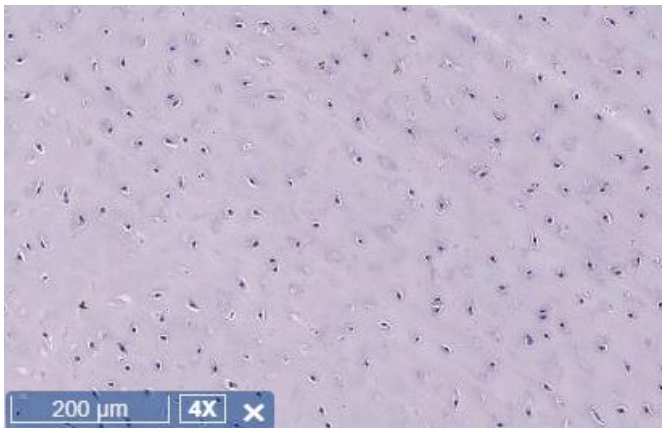
Na 1 dag



Na 2 dagen



Na 3 dagen



Na 8 dagen



Na 21 dagen

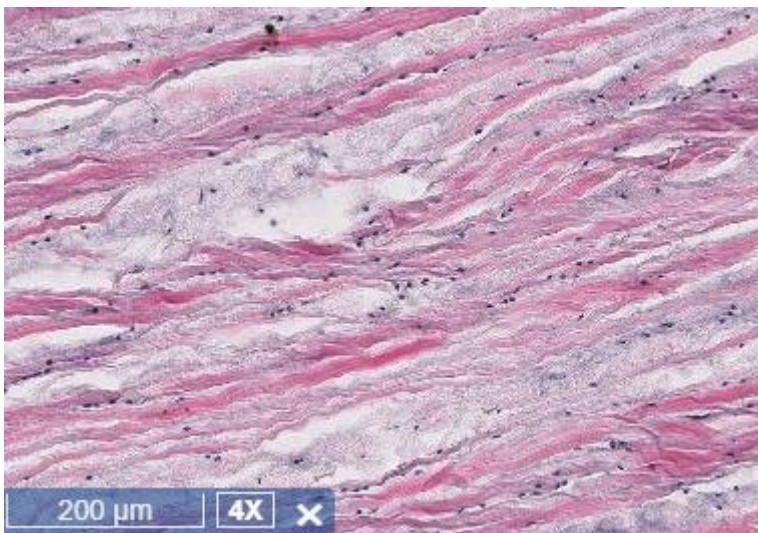


Na 28 dagen

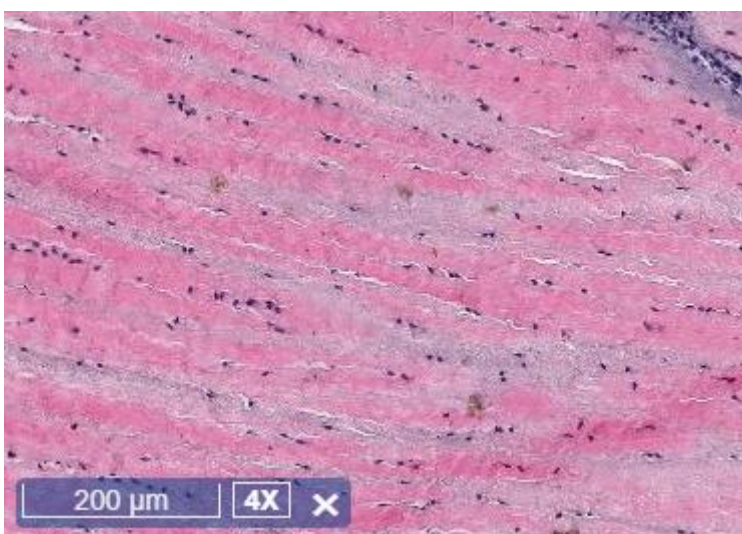


Vezelig kraakbeen

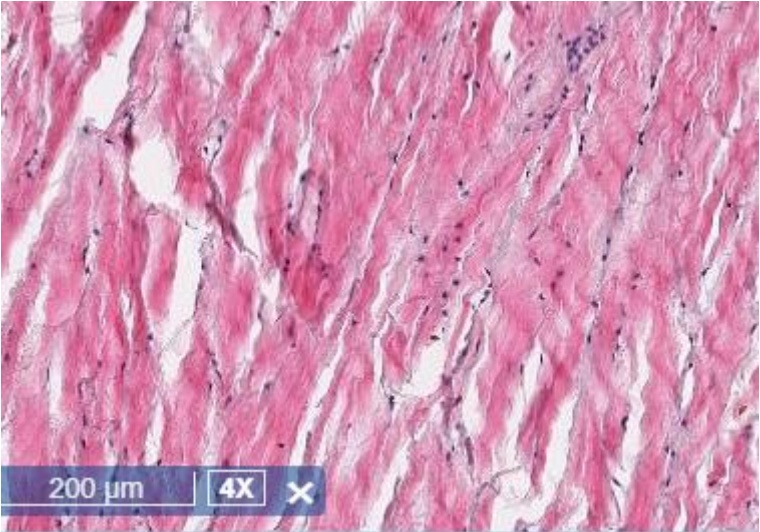
Blanco



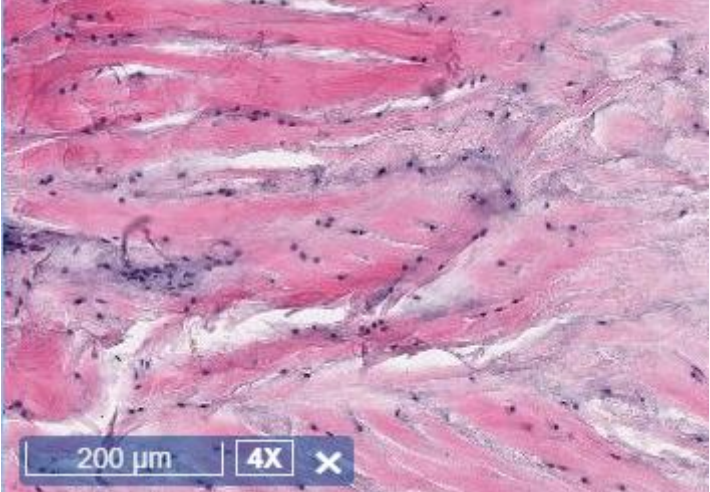
Na 1 dag



Na 2 dagen



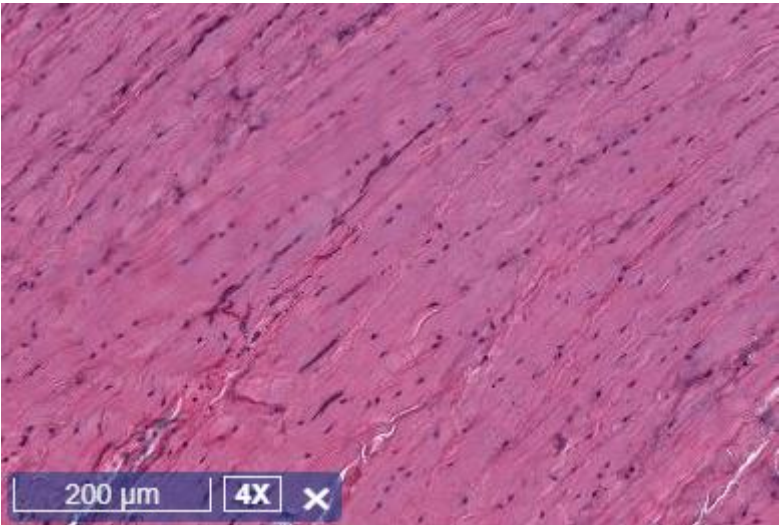
Na 3 dagen



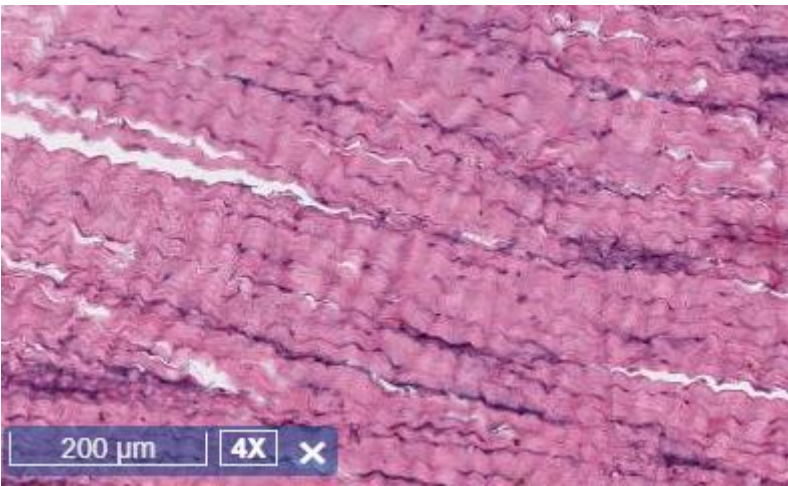
Na 8 dagen



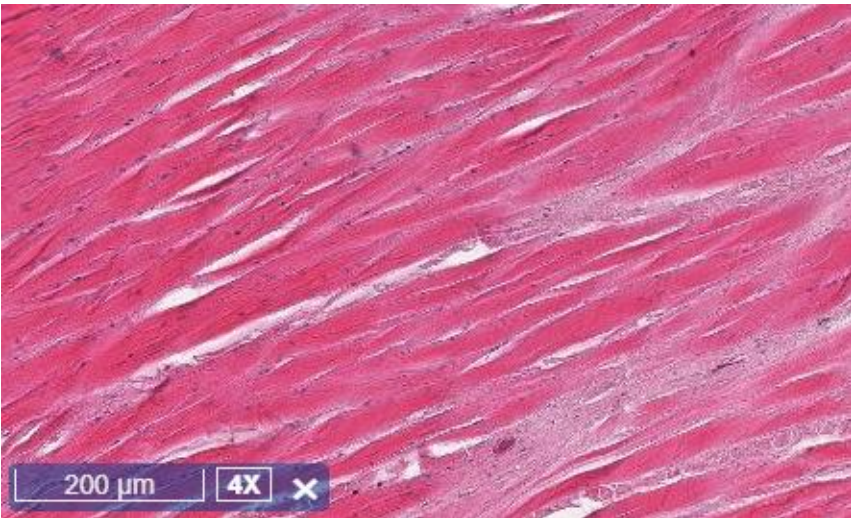
Na 9 dagen



Na 15 dagen



Na 21 dagen



NA 28 DAGEN

