

Jarosław Bednarek

## Metody oceny wieku w chwili śmierci w oparciu o histomorfometrię istoty zbitej tkanki kostnej

### Methods of age at death estimation based on compact bone histomorphometry

Z Katedry Medycyny Sądowej UMK w Toruniu, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Kierownik: prof. dr hab. med. K. Śliwka

Praca przedstawia różne możliwości oceny wieku w chwili śmierci w oparciu o badania histomorfometryczne istoty zbitej tkanki kostnej. Omówiono najważniejsze metody badań oraz występujące pomiędzy nimi różnice. Analiza piśmiennictwa poświęconego temu zagadnieniu wykazała, że istnieje szereg czynników mających istotny wpływ na rzetelność i dokładność stosowanych metod. Czynniki te to przede wszystkim genetyczna zmienność międzypopulacyjna, choroby, urazy i obciążenia mechaniczne. Różnice w dokładności metod oceny wieku wynikać mogą również ze zmienności międzypopulacyjnej lub być konsekwencją problemów metodycznych. Pomimo tego odpowiednio przeprowadzona analiza histomorfometryczna szkieletu stanowi pełnowartościowe narzędzie do oceny wieku w chwili śmierci, zwłaszcza wtedy gdy badania dotyczą szkieletów niekompletnych lub znacznie rozkawałkowanych.

The paper presents a review of possibilities of age at death assessment based on compact bone histomorphology. The author discusses the major methods of such evaluation and their differences. The analysis of related literature shows that there are several factors that exert a significant effect on reliability and accuracy of age estimation. These factors mainly involve genetic variation, pathologic conditions, traumas and mechanical stresses. Differences in accuracy of age assessment may also result from interpopulation variability and methodological factors. Nevertheless, the histomorphological analysis if done correctly is a fully valuable tool that allows for

estimating age at death, especially in examinations of incomplete or markedly dismembered skeletons.

Słowa kluczowe: ocena wieku, histomorfometria, żebra

Key words: age at death estimation, histomorphometry, ribs

W medycynie sądowej i antropologii, w celu oceny wieku człowieka na podstawie szkieletu, powszechnie stosuje się metody morfologiczne [1, 2]. Metody te wykorzystują fakt istnienia określonego morfologicznego stanu cechy w konkretnym etapie życia osobnika. Można zatem przyjąć, że ocena wieku odbywa się w oparciu o jakościową analizę szkieletu. Podstawowym problemem metodycznym dotyczącym cech jakościowych jest trudność w precyzyjnym ich zdefiniowaniu a tym samym w obiektywnym ustaleniu jaki wariant cechy widoczny jest na szkielecie. Może to prowadzić do nieprawidłowych wniosków i w związku z tym niedoszacowania lub przeszacowania wieku w chwili śmierci. Kolejną niedogodnością związaną z wykorzystaniem jakościowych cech morfologicznych jest ich niedostateczna dostępność. W wielu przypadkach zły stan zachowania szkieletu ogranicza lub wręcz uniemożliwia podjęcie pełnej analizy kostnych wskaźników wieku [3].

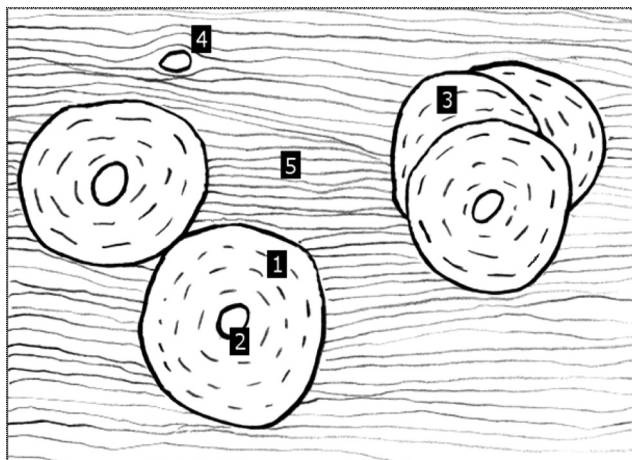
Opisane trudności zmuszają badaczy do poszukiwania innych rodzajów zależności po-

między stanem szkieletu a wiekiem osobnika. Szczególnie ważne jest w tym kontekście wykorzystanie cech, których poszczególne warianty można obiektywnie wyodrębnić, np. poprzez precyzyjny pomiar lub policzenie. Dlatego też jednym z najlepszych rozwiązań jest histomorfometryczna analiza istoty zbitiej tkanki kostnej.

## BIOLOGICZNE PODSTAWY HISTOMORFOMETRYCZNEJ OCENY WIEKU

Histomorfometria jest techniką badawczą polegającą na wykonywaniu pomiarów lub określaniu liczby struktur budujących tkanki [4]. W przypadku oceny wieku na podstawie szkieletu ma ona na celu oszacowanie liczby elementów strukturalnych tkanki kostnej danego osobnika i przeliczenie ich na jednostkę powierzchni. Przy założeniu, że liczba badanych struktur wykazuje korelację z wiekiem, możliwe jest oszacowanie przybliżonej wartości tego parametru na podstawie odpowiednich równań regresji. Aby właściwie zrozumieć ideę histomorfometrycznej oceny wieku, należy przeanalizować procesy związane ze zjawiskiem przebudowy kości.

Ryc. 1. Schematyczne odwzorowanie cech istoty kostnej zbitiej. Objaśnienia: 1. pełny osteon; 2. kanał Haversa; 3. fragment osteonu; 4. kanał niehaversowski; 5. blaszki kostne, które nie uległy przebudowie. Fig. 1. Schematic presentation of compact bone features. Legend: 1. complete osteon; 2. Haversian canal; 3. fragmentary osteon; 4. non-Haversian canal; 5. unremodeled lamellar bone.



W efekcie procesów resorpcyjnych i następującej po nich syntezy nowej tkanki dochodzi w tkance kostnej do zmian strukturalnych. Wyrażają się one poprzez stałe powstawanie nowych osteonów w miejscu osteonów istniejących dotychczas. W obrazie mikroskopowym widocz-

ne są zatem osteony całkowite, nienaruszone przez proces resorpcji oraz fragmenty osteonów stanowiące pozostałości po tych, które temu procesowi uległy [4] (ryc. 1).

W wyniku przebudowy kości dochodzi również do zmian o charakterze ilościowym i to one leżą u podstawy histomorfometrycznych metod oceny wieku szkieletowego. Badania histologiczne wykazały, że liczba osteonów przypadających na jednostkę powierzchni przekroju kości wzrasta z wiekiem [5]. Zmiany ilościowe dotyczą również średniej liczby blaszek kostnych w osteonie oraz liczby kanałów niehaversowskich. Te ostatnie zostały w piśmiennictwie naukowym zdefiniowane jako struktury powstałe w okresie intensywnego rozwoju istoty zbitiej, kiedy to do kości wnikają niewielkie obwodowe naczynia krwionośne [3].

Ponadto zaobserwowano zachodzące z wiekiem zmiany o charakterze metrycznym. Dotyczy to przede wszystkim zmniejszania się średniej powierzchni kompletnych osteonów oraz powierzchni kanałów Haversa wchodzących w ich skład. Zmniejszeniu ulega również stosunek powierzchni obwodowych blaszek kostnych do całkowitej powierzchni przekroju istoty kostnej zbitiej [3, 6].

## TECHNIKA WYKONYWANIA PREPARATÓW

Procedura przygotowywania preparatów mikroskopowych z istoty kostnej zbitiej, bez względu na wybraną metodę, sprowadza się do sekwencji podobnych czynności. Różnice dotyczą szczegółów związanych z wykorzystanymi narzędziami i odczynnikami. Cechą wspólną większości technik jest wykorzystanie preparatów nieodwapnionych. Dzięki temu można poddać ilościowej analizie wszystkie dostępne elementy składowe tkanki. W przypadku kości odwapnionych, niektóre elementy uległyby zniszczeniu co ograniczyłoby zasób badanych cech.

Po ewentualnym usunięciu tkanek miękkich i okostnej, z kości pobierany jest wycinek [7] lub znacznie częściej poprzeczny pierścień o grubości ok. 0,5-1 cm. Następnie kość jest odfuszczana. Do tego celu najczęściej stosuje się aceton, chloroform lub detergenty. Po wypłukaniu i wysuszeniu pobranego fragmentu kości jest on zatapiający w substancji utwardzającej. W tym przypadku zastosowanie znajdują m.in. żywice poliestrowe takie jak polimetakrylan metylu [8] oraz żywice epoksydowe [9, 10]. Czynność ta pozwala na zachowanie integralności badanego materiału podczas szlifowania, które stanowi

następny etap wykonywania preparatu. Materiał poddawany jest wówczas szlifowaniu ręcznemu [6] lub częściej szlifowaniu przy pomocy specjalnych szlifierek mechanicznych [11]. Proces ten zostaje zakończony gdy grubość materiału kostnego zostanie zredukowana do rozmiaru pozwalającego na swobodną obserwację mikroskopową, czyli ok. 75-100 mikrometrów.

W dalszej kolejności materiał jest przyklejany za pomocą acetonu do szkiełka podstawowego i polerowany z wykorzystaniem specjalnych odczynników. Ostatecznie po oczyszczeniu przy pomocy ultradźwięków i nałożeniu szkiełka pokrywkowego, preparat jest gotowy do badań.

### NAJWAŻNIEJSZE METODY OCENY WIEKU

Na zjawisko ilościowych zmian w części korowej kości i możliwość wykorzystania ich do oceny wieku zwrócili po raz pierwszy uwagę Amprino i Bairatti [12] a następnie Jowsey [5] i Currey [13]. Pierwszą metodę określania wieku w oparciu o tę zależność opracował Kerley [3].

Materiał badawczy stanowiły nieodwapienne kości udowe, piszczelowe i strzałkowe, na których nie stwierdzono symptomów procesów patologicznych. Kości pochodziły od 126 osób obojga płci w wieku od 0 do 95 lat. Preparaty mikroskopowe wykonano z przekrojów poprzecznych przez środkową część trzonu. Badania histomorfometryczne przeprowadzono w obrębie czterech okrągłych pól o średnicy równej średnicy pola widzenia mikroskopu (1,62 mm). Pola znajdowały się w przeciwległych biegunach osi strzałkowej i osi poprzecznej przekroju kości, stycznie do jego zewnętrznej krawędzi (ryc. 2). Analiza ilościowa dotyczyła liczby całkowitych osteonów, liczby fragmentów zresorbowanych osteonów, powierzchni obwodowych blaszek kostnych oraz liczby kanałów niehaversowskich. Na podstawie wartości cech zsumowanych z wszystkich pól wyznaczono równania regresji, w których wiek jest zmienną zależną a liczba cech zmienną niezależną. Ponieważ autor badał liczebność 4 cech w preparatach z 3 typów kości, ogółem przedstawiono 12 równań regresji. Z uwagi na błędy metodyczne wskazane później przez Ubelakera, Kerley po skorygowaniu założeń metodycznych ponownie przebadał ten sam materiał i opublikował nowe, poprawione równania regresji do oceny wieku [14].

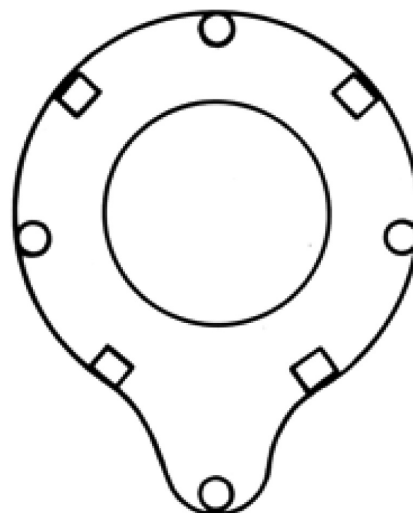
Modyfikację metody Kerleya zaproponowali Ahlqvist i Damsten [15]. Zdaniem tych autorów wykorzystanie do histomorfometrycznej oceny wieku różnych kości i różnych cech znacznie

komplikuje metodę nie zwiększając przy tym jej dokładności. W związku z tym w opracowanej przez nich technice pod uwagę brana jest wyłącznie kość udowa i analizowany tylko jeden parametr. Jest nim procentowy udział całkowitej powierzchni przebudowywanej w łącznej powierzchni czterech badanych pól. Poprzez powierzchnię przebudowywaną należy w tym wypadku rozumieć sumę powierzchni pełnych osteonów i fragmentów osteonów.

Kolejną zmianą w stosunku do metody Kerleya jest modyfikacja kształtu i umiejscowienia badanych pól. Ahlqvist i Damsten uznali, że kolista kształt pola utrudnia analizę struktur znajdujących się na jego krawędziach. Ich zdaniem lepsze rozwiązanie stanowią pola kwadratowe. Z kolei zaproponowane przez Kerleya umiejscowienie jednego z pól w bezpośrednim sąsiedztwie kresy chropawej może w opinii autorów prowadzić do błędnych wyników z powodu włączenia do analizy zmian nie związanych z wiekiem, powstałych w wyniku reakcji kości na czynniki mechaniczne w miejscu przyczepu mięśniowego. Dlatego też badane przez nich pola zostały przesunięte pod kątem 45 stopni w stosunku do pól badanych przez Kerleya (ryc. 2). Na podstawie analizy preparatów mikroskopowych z materiału pobranego od 20 osób autorzy wyprowadzili równanie regresji dla oceny wieku.

Ryc. 2. Schemat przekroju przez środkową część trzonu kości udowej wg Ubelakera [11], z zaznaczonymi okrągłymi polami badanymi w metodzie Kerleya [3] oraz kwadratowymi analizowanymi w metodzie Ahlquista i Damstena [15].

Fig. 2. Schematic view of the femur midshaft cross section according to Ubelaker [11] with circular fields examined by the Kerley's method [3] and square fields analyzed by the Ahlquist and Damsten method [15].



Opisana wyżej metoda mimo, że znacznie łatwiejsza w zastosowaniu niż metoda Kerleya daleka jest od doskonałości. Ubelaker [11] zwraca uwagę na dwa ważne jej mankamenty. Po pierwsze: standardowy błąd estymacji jest większy niż w metodzie Kerleya a zatem ocena wieku jest mniej dokładna. Po drugie: równanie regresji zostało wyprowadzone na podstawie próby, której reprezentatywność jest wątpliwa. Autorzy przebadali materiał pochodzący jedynie od 20 osób, z których większość przekroczyła 50 rok życia. Nie można jednak wykluczyć, że metoda ta pozwoliłaby na rzetelną ocenę wieku, jeżeli równanie regresji zostałoby opracowane na podstawie dostatecznie licznej próby, złożonej z osobników reprezentujących w równym stopniu wszystkie grupy wiekowe.

Inne podejście metodyczne do histomorfometrycznej oceny wieku przyjęli Singh i Gunberg [8]. W swoich badaniach wykorzystali materiał pochodzący ze zwłok 52 mężczyzn w wieku od 39 do 87 lat, pobrany z trzonów kości udowych i piszczelowych oraz z ramion żuchwy. W celu sporządzenia preparatów mikroskopowych, z powierzchni badanych kości pobierano wycinek o wymiarach ok. 1 cm x 1 cm. Preparat obejmował zatem jedynie fragment przekroju poprzecznego o długości ok. 1 cm i szerokości wyznaczonej przez odległość pomiędzy zewnętrzną i wewnętrzną krawędzią kości. W przypadku 19 osób, u których dostępne były wyłącznie żuchwy, wykonano preparaty z kości nieodwapnionej. W pozostałych 40 przypadkach dokonano odwapnienia kości przy pomocy mieszaniny roztworów formaliny i kwasu mrówkowego a następnie wybarwienia preparatu przy pomocy barwnika na bazie fenolu i tioniny (karbol-thionin).

Badania morfometryczne każdego preparatu przeprowadzano w obrębie dwóch losowo wybranych pól widzenia mikroskopu, o średnicy 2 mm. Określano całkowitą liczbę osteonów w badanych polach, średnią liczbę blaszek kostnych przypadających na osteon oraz średnią najmniejszą średnicę kanału Haversa. Autorzy stwierdzili występowanie silnych korelacji badanych cech z wiekiem. W przypadku całkowitej liczby osteonów oraz średniej liczby blaszek na osteon otrzymano współczynniki dodatnie, a w przypadku średnicy kanału Haversa ujemne. Wyniki te pozwoliły na wyprowadzenie równań regresji wielokrotnej dla oznaczania wieku, z uwzględnieniem kombinacji wszystkich badanych cech jako zmiennych niezależnych.

Uzyskane przez Singh i Gunberg wartości standardowego błędu estymacji wskazują, że

ich metoda pozwala na dokładniejszą ocenę wieku niż zaproponowana przez Kerleya. Należy jednak pamiętać, że przy jej opracowywaniu autorzy nie dysponowali materiałem pochodzącym od osób w wieku poniżej 39 roku życia oraz, że wyłączyli próbki pochodzące od kobiet. Dlatego też nieuzasadnione jest wykorzystanie wyprowadzonych przez autorów równań regresji w odniesieniu do osób reprezentujących pominięte kategorie.

Ewaluacji tej metody dokonali między innymi Stout i Gehlert [9] wykorzystując materiał pobrany od 13 osób. Stwierdzone przez nich błędy w ocenie wieku zawierały się w zakresie od 12 do nawet 49 lat. Mimo to autorzy nie kwestionują przydatności metody a zaobserwowane rozbieżności tłumaczą różnicami metodycznymi. W oryginalnym opracowaniu wykorzystano preparaty o grubości około 10  $\mu\text{m}$ , wykonane z kości odwapnionej, podczas gdy Stout i Gehlert wykonali preparaty z kości nieodwapnionej, której grubość była około dziesięciokrotnie większa.

Omówione wyżej metody wymagają znacznego naruszenia kości w celu pobrania odpowiedniego materiału. W przypadkach kiedy czynność ta budzi wątpliwości etyczne lub kiedy kość stanowi ważne znalezisko archeologiczne, zastosowanie inwazyjnych metod oceny wieku może być utrudnione lub niemożliwe. Mając te problemy na uwadze Thompson [7] opracował histomorfometryczną metodę oceny wieku, wykorzystującą wycinki kości o średnicy zaledwie 4 mm. Wycinki te pobiera się z przedniej powierzchni środkowej części trzonów kości udowych, z przyśrodkowych powierzchni środkowej części trzonów piszczelowych i ramiennych oraz z bocznej powierzchni dystalnego końca kości łokciowej. Autor analizował liczebność aż 19 cech, w tym m.in.: grubość, masę i gęstość istoty zbitą (warstwy korowej), stopień mineralizacji kości, wskaźnik mineralizacji kości, odsetek powierzchni zajmowanej przez blaszki kostne osteonów, odsetek powierzchni zajmowanej przez kanały Haversa, łączny procentowy udział osteonów i kanałów Haversa w polu widzenia mikroskopu, liczbę osteonów wtórnych, liczbę kanałów Haversa, stosunek powierzchni osteonów do ich liczby, stosunek powierzchni kanałów Haversa do ich liczby, łączną średnicę osteonów, łączną średnicę kanałów Haversa. Efektem analizy zależności liczby wymienionych cech i wieku było wyprowadzenie kilkudziesięciu równań regresji służących do oceny tego parametru.

Analizując przydatność tej metody Stout [16] wskazuje, że wykorzystanie wyłącznie pojedynczego, niewielkiego wycinka kości, może być przyczyną znacznego błędu próbkowania. Wada ta jego zdaniem przewyższa zalety wynikające z niskiej inwazyjności. Zwraca on również uwagę, że pobieranie tak małych fragmentów, może skutkować wykonywaniem skośnych preparatów. To, z kolei przyczynia się do błędnego odczytu liczby badanych cech.

Opisane wyżej metody wykorzystują w głównej mierze materiał pobrany z kości kończyn, a zwłaszcza z kończyny dolnej. Nie ulega wątpliwości, że wykorzystanie do oceny wieku metod ograniczonych do określonego typu materiału nie będzie w wielu przypadkach możliwe. Na przykład, gdy określone kości nie zachowały się, gdy są dotknięte stanami patologicznymi lub gdy są w znacznym stopniu uszkodzone na skutek intensywnego działania czynników fizyko-chemicznych środowiska lub aktywności zwierząt. Ponadto w piśmiennictwie naukowym zwraca się uwagę na istotny wpływ czynników mechanicznych na mikrostrukturę kości kończyn dolnych, co z kolei rzutuje na dokładność oceny wieku [17, 18].

W celu uniknięcia opisanych problemów opracowano metody oceny wieku w oparciu o cechy histologiczne tych kości, które nie podlegają naciskom mechanicznym, dostatecznie często zachowują się w materiale szkieletowym oraz są łatwo dostępne w materiale sekcyjnym.

Stout i Paine [17] zaproponowali wykorzystanie żeber i obojczyka. Materiał, który posłużył do wykonania badań stanowiły trzecie i czwarte lewe żebra oraz lewe obojczyki pobrane podczas sekcji 40 osób w wieku 13-62 lata. Badana próba składała się z 7 kobiet, 32 mężczyzn i jednej osoby o płci nieustalonej. Z przekrojów środkowej części trzonu każdego żebra i obojczyka wykonywano po 2 preparaty. Analizowano wielkość powierzchni istoty zbitej, gęstość całkowitych osteonów, gęstość fragmentów osteonów oraz całkowitą widoczną gęstość osteonów. Ostatnia z wymienionych cech jest równoważna gęstości zsumowanych osteonów całkowitych i fragmentów osteonów. Badania powierzchni i gęstości przeprowadzano w obrębie całego przekroju. Efektem badań było wyprowadzenie prostych równań regresji do oceny wieku dla żeber i obojczyka oraz równania regresji wielokrotnej dla danych z obydwu typów kości. Autorzy wykonali również serię badań testowych. Stwierdzono, że średni rzeczywisty wiek badanych osób nie różnił się istotnie od wieku oszacowanego na

podstawie otrzymanych równań regresji. Wynik ten wskazuje, że metodę można z powodzeniem stosować w praktyce identyfikacji osobniczej, zwłaszcza jeżeli wykorzystuje się rekomendowaną przez twórców formułę grupującą współczynniki wyliczone dla obydwu kości.

Poza opisanymi wyżej najważniejszymi histomorfometrycznymi technikami oceny wieku opracowano szereg metod stanowiących ich mniej lub bardziej rozbudowane modyfikacje [6]. Metody te poszerzają zakres analizowanych cech, m.in. o wielkość średnicy kanału Haversa, przeciętną średnicę osteonu lub współczynniki opisujące relacje pomiędzy różnymi typami badanych cech. Różnice metodyczne dotyczą również sposobu oraz miejsca pobierania materiału. Ogólny model określania wieku jest jednak zachowany i sprowadza się do wyznaczenia równań regresji na podstawie związków pomiędzy liczebnością cechy a wiekiem.

#### CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA RZETELNOŚĆ BADAŃ

Szereg publikacji naukowych poświęconych omawianemu zagadnieniu wskazuje, że antropolog lub lekarz sądowy przystępujący do badań identyfikacyjnych dysponuje szerokim zakresem gotowych metod i formuł matematycznych, dających możliwość oszacowania wieku w chwili śmierci, po uprzedniej analizie stanu tkanki kostnej. Jednak każde z zaproponowanych rozwiązań należy traktować z dużą ostrożnością i liczyć się z możliwością popełnienia błędu. Trzeba bowiem wziąć pod uwagę szereg czynników, które mają wpływ na precyzję oceny wieku.

Pierwszym z nich jest biologiczna zmienność międzypopulacyjna. Występujące pomiędzy populacjami różnice genetyczne oraz dotyczące środowiska i trybu życia, mają odzwierciedlenie w modelu przebudowy istoty kostnej zbitej [19]. W związku z tym równania regresji dla oznaczania wieku, wyprowadzone na podstawie badań określonej populacji, mogą być nieadekwatne do stanu biologicznego innej populacji, z której pochodzi identyfikowana osoba. Dlatego zanim dana metoda zostanie zastosowana w praktyce konieczne jest opracowanie nowych równań w oparciu o materiał specyficzny dla badanej populacji. Spostrzeżenie to potwierdzają wyniki badań ewaluacyjnych prowadzonych, m.in. przez Ubelakera oraz Stouta i wsp. [19].

Ważnym czynnikiem decydującym o korelacjach pomiędzy wiekiem a liczbą składników tkanki kostnej jest również stan zdrowia bada-

nych osób. Stout [19] wskazuje na istnienie szeregu zależnych od zdrowia czynników oddziałujących na przebieg procesu przebudowy kości. Mogą one mieć charakter ogólnoustrojowy i oddziaływać na cały szkielet lub też wykazywać aktywność wyłącznie lokalną, modyfikując przebudowę określonych kości lub ich części. Autor podkreśla jednak, że wpływ tych czynników na stan tkanki kostnej jest widoczny dopiero po ich długotrwałym działaniu, nawet wtedy, jeśli jest ono bardzo intensywne.

Do stanów patologicznych, powodujących modyfikację przebiegu procesu przebudowy tkanki kostnej, zalicza się przede wszystkim zaburzenia metaboliczne związane z przemianami wapnia. Np. wtórna nadczynność przytarczyc powoduje istotny wzrost gęstości osteonów. Z kolei w przypadku osteoporozy stwierdzono zarówno spadek, jak i wzrost tempa przebudowy kości. Podobne zmiany towarzyszą również osteomalacji i chorobie Pageta. Modyfikacje modelu przebudowy kości mogą również występować u osób cierpiących na choroby nie związane z metabolizmem wapnia. Przykładowo, mniejszą liczbę osteonów w stosunku do typowej w danym wieku odnotowano analizując przypadki osób chorych na cukrzycę [19].

Mając na uwadze możliwość zmian struktury tkanki kostnej pod wpływem chorób i zaburzeń metabolicznych, autorzy opisanych wyżej metod wykorzystali do badań wyłącznie te kości, na których nie stwierdzono żadnych patologii. Jednak w praktyce identyfikacji osobniczej niejednokrotnie ma się do czynienia ze szczątkami osób, które doświadczyły opisanych zaburzeń. W tej sytuacji wykorzystanie techniki histomorfometrycznej wiąże się z możliwością popełnienia istotnego błędu. W związku z tym podejmowanie takich badań nie jest wówczas wskazane. Jednak w przypadku gdy przyczyna zaburzeń jest dobrze poznana a ich wpływ na tkankę kostną gruntownie przebadany, można podjąć się oceny wieku, wprowadzając odpowiednie poprawki zgodnie z kierunkiem i stopniem nasilenia zmian wywołanych zaburzeniami.

Poza zmianami patologicznymi o charakterze metabolicznym, pośredni wpływ na odchylenia od typowego modelu przebudowy tkanki kostnej mają także przypadki paraliżu lub niedowładu kończyn. Jest to związane z bezpośrednią zależnością stanu istoty kostnej zbitiej od czynników mechanicznych. Badania Stouta [20] wykazały, że kości kończyn pozbawionych aktywności w wyniku paraliżu charakteryzują się mniejszą całkowitą liczbą osteonów. Spostrzeżenie to

potwierdzają wyniki badań wpływu obciążeń mechanicznych lub ich braku na tempo procesu przebudowy kości [18, 21]. Z kolei według Chan i wsp. [18], którzy badali kości udowe, istotne różnice tempa procesu przebudowy, stwierdzone w różnych miejscach tych samych kości, są konsekwencją odmiennych obciążeń mechanicznych. A zatem stan istoty kostnej zbitiej jest odzwierciedleniem jej reakcji na naciski i naprężenia. Jeżeli dana kość lub jej część nie doświadcza takich obciążeń, wówczas całkowita liczba osteonów jest mniejsza w porównaniu do części stawiających większy opór czynnikom mechanicznym.

Lokalna zmienność liczby osteonów, widoczna zarówno w aspekcie całego szkieletu jak i w obrębie pojedynczych kości, stanowi kolejny problem związany z rzetelnością oceny wieku na podstawie cech tkanki kostnej. Badania histologiczne [18, 22] wykazały, że gęstość mikrostruktur tkanki kostnej jest zróżnicowana nie tylko pomiędzy różnymi częściami tej samej kości, ale również pomiędzy różnymi polami w obrębie jednego przekroju poprzecznego. Opisane wcześniej metody opracowane przez takich autorów jak Kerley [3], Alqvist i Damsten [15], Singh i Gunberg [8] oraz Thompson [7] charakteryzują się znacznymi ograniczeniami w zakresie liczby i umiejscowienia pól poddawanych analizie. Metody te nie biorą pod uwagę zmienności histologicznej w całym przekroju oraz nie analizują więcej niż jednego przekroju z danego obszaru kości. Należy więc przypuszczać, że metody te mogą być obciążone znacznym błędem próbkowania.

Według Pfeiffera i wsp. [21] proces przebudowy kości udowej wzdłuż osi mechanicznych wykazuje znacznie mniejszą zmienność regionalną niż wzdłuż osi anatomicznych. A zatem tam powinny być umiejscowione pola, w których zlicza się osteony. W przeciwnym wypadku można spodziewać się, że wiek oznaczony z różnych preparatów pobranych z tej samej kości może się istotnie różnić. Aby uniknąć błędu próbkowania można też posłużyć się rozwiązaniem jakie przyjęli Stout i Paine [17] w badaniach żeber i obojczyków. Pomimo, że kości te nie podlegają intensywnemu działaniu czynników mechanicznych, autorzy wykonywali po dwa preparaty z całych przekrojów poprzecznych i analizowali całą widoczną powierzchnię istoty zbitiej.

Ponieważ proces przebudowy kości u kobiet i mężczyzn ma nieco odmienny charakter [19] należy przypuszczać, że płeć jest jeszcze jednym czynnikiem istotnym dla histomorfome-

trycznej oceny wieku. Hipoteza ta nie ma jednak jednoznacznego potwierdzenia w wynikach badań. Analizując to zagadnienie Stout [19] wskazuje na uzyskane przez różnych autorów różnice standardowego błędu metody pomiędzy próbami mężczyzn i kobiet. Jego zdaniem dotyczą one przede wszystkim osób w starszym wieku i są spowodowane spadkiem wydzielania estrogenów u kobiet po menopauzie. Podobne wnioski przedstawia Ericksen [23] wskazując, że zjawisko to wyraża się zwłaszcza w zatrzymaniu stabilnego wzrostu gęstości osteonów u kobiet w szóstej dekadzie życia. Z drugiej jednak strony opublikowano szereg doniesień naukowych, których autorzy nie stwierdzili wyraźnych różnic związanych z płcią lub wyrażają przekonanie, że różnice te są statystycznie nieistotne i nie mają wpływu na ocenę wieku [3, 8, 17].

Powyższa analiza czynników wpływających na rzetelność badań histomorfometrycznych, nasuwa szereg wniosków dotyczących metodyki badań.

O ile istnieje możliwość stwierdzenia populacyjnej przynależności identyfikowanej osoby, określanie wieku powinno być dokonywane z uwzględnieniem modelu przebudowy tkanki kostnej specyficznego dla właściwej populacji. Analogiczne wskazanie dotyczy kwestii płci. Pomimo, iż dane na temat różnic w procesie przebudowy kości u kobiet i mężczyzn nie są spójne, właściwą praktyką przy ocenie wieku wydaje się korzystanie z oddzielnych wzorców.

Aby zminimalizować błąd próbkowania wskazane jest wykorzystanie metod, w których bierze się pod uwagę co najmniej kilka pełnych przekrojów przez całą powierzchnię istoty kostnej zbitej. Rekomendowane jest również pobieranie do badań materiału z wszystkich zachowanych miejsc szkieletu, dla których opracowano histomorfometryczne metody oceny wieku.

Zanim zostaną wykorzystane konkretne formuły służące do oszacowania wieku, należy dokładnie zapoznać się z charakterystyką materiału, na bazie którego zostały one wyprowadzone. Jeżeli rozkład wieku badanych osobników był równomierny, można przyjąć, że metoda kwalifikuje się do oceny tego parametru we wszystkich kategoriach. Jednak w przypadku niektórych metod [8, 15] materiał wyjściowy obejmował ograniczony zakres wieku lub charakteryzował się jego nierównomierną dystrybucją. Rozkład może być wówczas prawoskośny co oznacza, że próba składała się głównie z osobników młodych. Wykorzystanie równania regresji otrzyma-

nego z tej próby może prowadzić do błędnych wniosków przy określaniu wieku osób starszych. Z drugiej strony, jeżeli dystrybucja wieku w badanej serii jest lewoskośna, czyli z przewagą osobników starszych, wówczas ryzykowne jest odnoszenie stwierdzonych korelacji do osób młodszych.

Istotne znaczenie ma także kwestia właściwego wykonania preparatów mikroskopowych. W celu zminimalizowania uszkodzeń badanego materiału oraz utraty części istotnych cech, rekomendowane jest wykorzystanie kości nieodwapnionych. Korzystając z danej metody należy przestrzegać procedur opublikowanych przez jej autorów. Nie chodzi tu jednak o wykorzystanie dokładnie tych samych narzędzi i odczynników do pobierania, szlifowania i utrwalania materiału, ale o przygotowanie preparatu charakteryzującego się identycznymi właściwościami optycznymi. Dlatego należy przestrzegać zaleceń dotyczących miejsca i sposobu pobrania próbki oraz jej ostatecznej grubości.

## PODSUMOWANIE

Podobnie jak inne metody określania wieku człowieka, również techniki histomorfometryczne wymagają stałego doskonalenia. Analiza piśmiennictwa naukowego poświęconego temu zagadnieniu wykazała, że rzetelność oceny wieku na podstawie stanu tkanki kostnej jest uzależniona od licznych czynników natury zarówno biologicznej, jak i metodycznej. Dodatkowo, z uwagi na różnorodność metod, porównanie wyników badań nasyca wiele problemów. Nie wypracowano również jednolitych standardów i procedur dotyczących zastosowania metod histomorfometrycznych w praktyce.

Jednak pomimo wymienionych trudności, opisane metody stanowią istotną część zasobu technik identyfikacji człowieka. Podstawową ich zaletą jest ilościowy a nie jakościowy charakter badanych cech. Daje to możliwość obiektywnego i precyzyjnego określenia stanu cechy oraz pozwala na dokładną weryfikację wyników badań. Metody histomorfometryczne pozwalają również na dokonanie oceny wieku na podstawie bardzo małych fragmentów szkieletu. Ma to szczególne znaczenie w przypadku bardzo źle zachowanych lub zdekompletowanych szczątków. Dlatego też techniki te mogą stanowić nie tylko uzupełnienie, ale również w wielu przypadkach alternatywę względem powszechnie stosowanych metod morfologicznych.

## PIŚMIENICTWO

1. Raszeja S., Nasiłowski W., Markiewicz J.: *Medycyna sądowa. Podręcznik dla studentów*. PZWL, Warszawa, 1993.
2. Piontek J.: *Biologia populacji pradziejowych*. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza, Poznań, 1996.
3. Kerley E. R.: The microscopic determination of age in human bone. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 1965, 23, 149-164.
4. Stout S. D.: *Histomorphometric Analysis of Human Skeletal Remains.*, w: Iscan MY., Kennedy K.A.R (ed.), *Reconstruction of Life From the Skeleton*, Wiley-Liss, 1989, 41-52.
5. Jowsey J.: Age changes in human bone. *Clinical Orthopaedics*, 1960, 17, 210-217.
6. Kim Y. S., Kim D. I., Park D. K., Lee J. H., Chung N. E., Lee W. T., Han S. H.: Assessment of histomorphological features of the sternal end of the fourth rib for age estimation in Koreans. *J. Forensic Sci.*, 2007, 52, 6, 1237-1242.
7. Thompson D. D.: The core technique in the determination of age at death in skeletons. *J. Forensic Sci.*, 1979, 24, 4, 902-915.
8. Singh U., Gunberg D. L.: Estimation of age at death in human males from quantitative histology of bone fragments. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 1970, 33, 373-382.
9. Stout S. D., Gehlert S. J.: The relative accuracy and reliability of histological aging methods. *Forensic Sci. Int.*, 1980, 15, 181-190.
10. Dudar J. C., Pfeiffer S., Saunders S. R.: Evaluation of morphological and histological adult skeletal age-at-death estimation techniques using ribs. *J. Forensic Sci.* 1993, 38, 3, 677-85.
11. Ubelaker D.: *Human Skeletal Remains. Excavation, Analysis, Interpretation*. Taraxacum, Washington, 1989, Appendix 2.
12. Amprino R., Bairatti E. A.: *Processi di ricostruzione e di riassorbimento nella sostanza compatta delle ossa dell'uomo. Ricerche su cento soggetti dalla nascita sino a tarda età*. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 1936, 24, 439-511.
13. Currey J. D.: Some effects of ageing in human Haversian systems, *J. Anat.*, 1964, 98(1), 69-75.
14. Kerley E. R., Ubelaker D. H.: Revisions in the microscopic method of estimating age at death in human cortical bone. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 1978, 49, 545-546.
15. Ahlqvist J., Damsten O.: Modification of Kerley's method for the microscopic determination of age in human bone. *J. Forensic Sci.*, 1969, 14, 205-212.
16. Stout S. D.: The use of histomorphology to estimate age. *J. Forensic Sci.*, 1988, 33, 121-125.
17. Stout S. D., Paine R. R.: Brief communication: histological age estimation using rib and clavicle. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 1992, 87, 1, 111-115.
18. Chan A. H., Crowder C. M., Rogers T. L.: Variation in cortical bone histology within the human femur and its impact on estimating age at death. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 2007, 132, 1, 80-88.
19. Stout S. D.: The application of histological techniques for age at death estimation., w: Reichs K J. (ed.), Bass W.M. (ed.), *Forensic Osteology: Advances in the Identification of Human Remains*. Charles C Thomas Publisher, 1997, 237-252.
20. Stout S. D.: The effects of long-term immobilization on the histomorphology of human cortical bone., 1982, *Calcif Tissue Int.* 34, 337-342.
21. Pfeiffer S., Lazenby R., Chiang J.: Brief Communication: Cortical remodeling data are affected by sampling location. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 1995, 96, 89-92.
22. Drusini A.: Refinements of two methods for the histomorphometric determination of age in human bone. *Z. Morphol. Anthropol.*, 1987, 77, 167-176.
23. Ericksen M. F.: Histologic estimation of age at death using the anterior cortex of the femur. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 1991, 84(2), 171-179.

Adres do korespondencji:

Jarosław Bednarek

Katedra Medycyny Sądowej UMK w Toruniu

Collegium Medicum w Bydgoszczy

ul. Marii Skłodowskiej-Curie 9

85-094 Bydgoszcz

e-mail: bednarek@cm.umk.pl