

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/26117> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Boer, Hans Henk de

Title: Dry bone histology : technicalities, diagnostic value and new applications

Issue Date: 2014-06-18

Hoofdstuk 11

SAMENVATTING EN ALGEMENE DISCUSSIE

Fysische antropologie, forensische antropologie en paleopathologie

Fysische antropologie, ook wel biologische antropologie genoemd, bestudeert de mens als biologische soort. Deze wetenschap omvat een groot aantal deelgebieden, waarin de evolutie van de mens en de menselijke anatomische variabiliteit een centrale rol spelen. Het onderzoek in dit proefschrift richtte zich op twee deelgebieden van de fysische antropologie, namelijk de forensische antropologie en de paleopathologie.

De forensische antropologie gebruikt fysisch antropologische kennis om forensische vraagstukken te beantwoorden. Meestal betreft dit identificatieonderzoek van geskeletteerde of gecremeerde lichamen als de gebruikelijke identificatiemethoden niet meer uitvoerbaar zijn. Daarnaast worden forensisch antropologen regelmatig geconsulteerd door technisch rechercheurs en forensisch pathologen om de omstandigheden rond het overlijden van een individu te verduidelijken, bijvoorbeeld als er sprake is geweest van mechanisch letsel.

De paleopathologie houdt zich bezig met het diagnosticeren van ziekten in een archeologische context. Hierdoor wordt inzicht in de toenmalige (volks)gezondheidstoestand en informatie over de ontwikkeling van ziekten verkregen. Ook hierbij gaat het veelal om onderzoek aan lichamen in verregaande staat van ontbinding zoals skeletten, mummies of crematieresten. Hoewel de paleopathologie zich in principe ook bezighoudt met dierziekten, beperkt dit proefschrift zich tot menselijk materiaal.

Ook al verschilt de context waarin forensisch antropologen en paleopathologen werken, toch zijn er veel overeenkomsten in hun onderzoekswijzen. Beiden combineren anatomische kenmerken van leeftijd bij overlijden, lichaamslengte, geslacht en herkomst met kenmerken van ziekte, trauma en doodsoorzaak. Beiden werken veelal met (te) weinig achtergrondinformatie, bijvoorbeeld door het ontbreken van klinische gegevens. Bijgevolg staan forensisch antropologen en paleopathologen vaak voor dezelfde methodologische en diagnostische uitdagingen.

Dit proefschrift richt zich op een van die problemen, namelijk het nut van het microscopisch/histologisch onderzoek van geskeletteerde menselijke resten, het zogenoemd 'droog botweefsel'. Tot op heden wordt droog botweefselhistologie door forensisch antropologen en paleopathologen voornamelijk gebruikt om onderscheid

te maken tussen menselijk en dierlijk materiaal, om een schatting te maken van de leeftijd bij overlijden en om de staat van ontbinding vast te stellen. Behalve ten aanzien van deze toepassingen wordt de microscopie niet algemeen geaccepteerd als een betrouwbaar onderzoeksinstrument. In dit proefschrift werden de mogelijkheden van droog botweefselhistologie nader onderzocht.

Deel 1: Technische aspecten van het histologisch onderzoek van droog botweefsel

Hoofdstuk 1 introduceert de technische problematiek rond het onderzoek van droog botweefsel. Immers, ten behoeve van microscopisch onderzoek moet het te bestuderen materiaal verwerkt worden tot zeer dunne coupes. De standaardmethode voor 'vers' botweefsel bestaat uit decalcificatie van het materiaal, inbedding in paraffine of kunststof en het vervaardigen van coupes met een microtoom. Deze benadering is echter niet geschikt voor geskeletteerd droog botmateriaal, omdat dit niet meer voldoende boteiwit, met name collageen, bevat. Om dit bezwaar te overkomen werd in 2001 een simpele, snelle en goedkope methode geïntroduceerd voor de productie van ongekleurde, handgeslepen coupes (Maat *et al.*, 2001). Door zijn robuustheid en betrouwbaarheid werd deze methode gaandeweg toegepast door laboratoria over de gehele wereld (zie bijvoorbeeld Martiniakova *et al.*, 2006; Turner-Walker en Mays, 2008).

Hoofdstuk 2 beschrijft een waardevolle uitbreiding van de 'methode Maat', namelijk de toepassing van histochemische kleuringen. Door middel van een trial-and-error onderzoek werd een protocol voor kleuring met haematoxyline en met haematoxyline én eosine ontwikkeld. Het gebruik van deze kleuringen verbeterde de zichtbaarheid van kenmerken die het onderscheid tussen weefbeen en lamellair botweefsel mogelijk maken en van de cementlijnen die de Haverse systemen omringen. Bovendien maakten zij destructie van botweefsel door microorganismen beter zichtbaar.

Hoewel de 'methode Maat' (2001) reeds snel coupes van fragiel materiaal kan produceren, wordt deze toch door sommigen minder geschikt geacht voor gecremeerd botmateriaal en trabeculair botweefsel (Beauchesne and Saunders, 2006). Vóór 2001 probeerde men dit probleem te omzeilen door gebruik te maken van een immersiemedium (zie bijvoorbeeld Schultz, 1988). Deze methode bleek echter tijdrovend, vereiste kostbare gespecialiseerde apparatuur en kon niet gebruikt worden in combinatie met histochemische kleuringen.

Hoofdstuk 3 presenteert hiervoor een eenvoudige en goedkope oplossing. Hierbij werd het botweefsel niet geïmpregneerd, maar omringd door inbedmedium. Na

uitharding werd een plak, met een dikte van circa 1 mm afgezaagd, die eenvoudig met de hand verder kon worden afgeslepen tot een dikte van ongeveer 80 micrometer. Op deze manier bleef het weefsel gelegen aan het oppervlak van de coupe geschikt voor histochemische kleuring. De coupe kon zowel voor als na kleuring en met of zonder polarisatiefilter worden onderzocht. De botweefselsamenhang bleef tijdens deze bewerking goed intact, onafhankelijk van de fragiliteit en van de staat van ontbinding van het bot. De inbedding beperkte de toepasbaarheid van een polarisatiefilter niet. Vergeleken met de bestaande inbeddingsmethoden verkortte de nieuwe methode het productieproces dramatisch, namelijk van zes weken naar twee dagen voor ongekleurde coupes.

Deel 2: De waarde van histologie voor het diagnosticeren van ziekten in droog botweefsel

In 'vers' botweefsel wordt een histologische diagnose gebaseerd op de cellulaire kenmerken van het botweefsel zelf en op die van de omringende 'weke delen'. In droog botweefsel zijn beiden niet meer aanwezig, waardoor de diagnostiek problematisch is. Vandaar dat de waarde van histologisch onderzoek van droog botweefsel een punt van discussie is onder paleopathologen.

In **hoofdstuk 4** wordt op deze controversie ingegaan. Hiervoor werd alle literatuur verzameld waarin de diagnostiek van botaandoeningen (mede) was gebaseerd op histologisch onderzoek van droog botweefsel. De gestelde diagnosen werden getoetst aan de huidige kennis omtrent de histomorfologie. Slechts bij een beperkt aantal aandoeningen bleek het resterende droge botweefsel een specifiek histologisch beeld te laten zien. Deze aandoeningen waren respectievelijk osteoporose, hyperparathyreoidie, de ziekte van Paget en mogelijk osteomalacie. In alle overige gevallen, zoals bij tumoren en infecties, kon een definitieve diagnose niet worden gesteld. In deze gevallen waren de histologische bevindingen wel van toegevoegde waarde voor het differentiaal diagnostisch proces, bijvoorbeeld voor het verwerpen van een diagnose of voor de ondersteuning van een waarschijnlijkheidsdiagnose.

Hoofdstuk 5 bespreekt enkele belangrijke histologische aspecten van de microscopische anatomie en de dynamiek van botweefsel voor diegene die daarmee niet vertrouwd zijn. Tevens wordt een aantal handzame methoden beschreven voor het vervaardigen van coupes van droog botweefsel, die ook uitvoerbaar zijn als de faciliteiten van een specifiek anatomisch/pathologisch laboratorium niet beschikbaar zijn. Om de dynamiek van het weefsel te illustreren wordt uiteengezet hoe de continue ombouw van botweefsel gedurende het leven een histologische bepaling van de leeftijd bij overlijden mogelijk maakt. De verschillende onderdelen van het

skelet waarop deze methode toepasbaar is worden besproken, alsmede de mogelijk versturende invloed van spieractiviteit tijdens het leven en van ontbindingsprocessen na de dood. Ook wordt aandacht besteed aan de reële, maar beperkte waarde die de droog botweefselhistologie heeft voor het diagnosticeren van botaandoeningen.

De toegevoegde waarde van droog botweefselhistologie in een archeologische context wordt geïllustreerd aan de hand van een casus in **hoofdstuk 6**. Enkele botfragmenten, afkomstig van leden van de beroemde en dramatisch verlopen Franklin-expeditie van 1845 (Mays et al., 2013) werden hiervoor onderzocht. De expeditie, die tot doel had om een noordelijke doorvaarroute van de Atlantische Oceaan naar de Grote Oceaan te vinden, verdween enkele maanden na vertrek in het niet in het poolijs ten noorden van Canada. Reconstructies suggereerden dat scheurbuik hierbij een belangrijke rol had gespeeld. Macroscopisch onderzoek van skeletelementen van enkele later gevonden expeditieleden leek dit te bevestigen. Doch bij het in het kader van dit proefschrift verrichte histologisch onderzoek werden geen tekenen van recent opgetreden scheurbuik gevonden. De combinatie van deze bevinding met kennis uit historische bronnen, leidde tot de conclusie dat scheurbuik hoogstwaarschijnlijk geen rol heeft gespeeld bij de teloorgang van de expeditie.

Deel 3: De toepassing van droog botweefselhistologie bij de bestudering van mechanisch letsel

Het laatste deel van dit proefschrift beschrijft het gebruik van droog botweefselhistologie bij het onderzoek van mechanisch trauma, zoals dat optreedt in het geval van botbreuken en amputaties. In het forensisch antropologische of paleopathologische onderzoek van traumata wordt traditioneel onderscheid gemaakt tussen letsels van voor en na het overlijden, dat wil zeggen tussen zogenaamde antemortem letsels. Als geen onderscheid gemaakt kan worden, wordt een letsel geclassificeerd als perimortem (dus van 'rond' het overlijden). Bij antemortem letsels is een specificering van de tijdsduur tussen het ontstaan van het letsel en het optreden van de dood van belang. Deze 'posttraumatische overlevingstijd' kan bijvoorbeeld gebruikt worden om te beoordelen in hoeverre het overlijden verband houdt met het trauma. Omdat genezingsprocessen volgens een vast patroon verlopen, kan door bepaling van de aangetroffen genezingsfase de posttraumatische overlevingstijd worden geschat.

Hoofdstuk 7 beschrijft in hoeverre de genezingsprocessen die het gevolg zijn van botfracturen en amputaties waarneembaar zijn in droog botweefsel, en of zij te stageren zijn. Dit werd gedaan aan de hand van een verzameling botmonsters die

radiologisch en microscopisch door drie waarnemers werden geanalyseerd. De resultaten bleken voldoende consistent om het gebruik van botgenezingskenmerken voor het schatten van de posttraumatische overlevingstijd te rechtvaardigen. Dit is een verbetering ten opzichte van de huidige praktijk, waarbij meestal slechts onderscheid wordt gemaakt tussen 'niet genezende', 'genezende' en 'gezezen' letsels. Vaststelling van de posttraumatische overlevingstijd is van praktisch belang voor het forensisch onderzoek, bijvoorbeeld bij verdenking op mishandeling voorafgaand aan de dood.

Hoofdstuk 8 illustreert de meerwaarde van deze benadering bij het onderzoek van traumata, aangetroffen in archeologisch skeletmateriaal. Het onderzoek betrof de overblijfselen van individuen opgegraven uit de Gladstone begraafplaats in Kimberley, Zuid-Afrika (Van der Merwe *et al.*, 2010). Aan het eind van 19^e eeuw werkten deze arbeiders in de diamantmijnen ter plekke. Door de bepaling van de posttraumatische overlevingstijd werden interessante trends zichtbaar. Zo bleken de eerste twee weken na het trauma voorspellend voor de levensverwachting. Ook werden eerdere, op historisch onderzoek gebaseerde conclusies met betrekking tot medische zorg en de vastgestelde doodsoorzaken bevestigd. In één individu met multipale letsels was het zelfs mogelijk om de volgorde waarin de letsels waren opgetreden vast te stellen. De methode bleek eveneens van waarde voor het maken van onderscheid tussen *ante-* en *perimortem* letsels.

Hoofdstuk 9 beschrijft de toepassing van paleopathologisch onderzoek van traumata bij soldaten van het leger van Napoleon, die deelnamen aan de Russische veldtocht in 1812. Deze individuen werden in 2006 opgegraven in Kaliningrad (voorheen Koeningsberg): het eindstation van de voor Napoleon desastreus verlopen campagne (Buzhilova *et al.*, 2009). Vanwege de historische/museale waarde van de menselijke resten, werd invasief histologisch onderzoek niet toegestaan. Radiologische onderzoek was wel geoorloofd en werd bovendien uitgebreid met computed tomography-scanning. De resultaten lieten zien dat bij toepassing van uitsluitend macroscopisch en radiologisch onderzoek een, weliswaar minder nauwkeurige, maar toch redelijke schatting van de posttraumatische overlevingstijd mogelijk was. Zo konden ook in deze populatie verbanden tussen letsels en overlijden worden gelegd. Daarnaast werd inzicht verkregen in de militair geneeskundige besluitvorming omtrent amputaties.

Conclusie

In dit proefschrift wordt een technisch eenvoudige, snelle en goedkope aanvulling beschreven op de droog botweefselhistologie volgens de 'methode Maat' (Maat *et al.*, 2001). Met behulp van deze methode kunnen zeer dunne botcoupes histochemisch gekleurd worden, waardoor het weefsel beter beoordeelbaar wordt. Voorts wordt een nieuwe, eenvoudige methode gepresenteerd, die het mogelijk maakt om ook fragiel droog botweefsel te bewerken tot al dan niet histochemisch gekleurde coupes voor histologisch onderzoek.

Aangetoond wordt, dat deze techniek in het geval van enkele botaandoeningen een histologische diagnose mogelijk maakt dan wel ondersteunt. Tenslotte blijkt dat bij de bestudering van mechanische traumata droog botweefselhistologie van waarde is om in combinatie met macroscopisch en radiologisch onderzoek een schatting te maken van de posttraumatische overlevingstijd.

Literatuur

Beauchesne, P., Saunders, S., 2006. A test of the revised Frost's 'rapid manual method' for the preparation of bone thin sections. *International Journal of Osteoarchaeology* 16, 82-87.

Buzhilova, A.P., Rigeade, C., Shvedchikova, T., Ardagna, Y., Dutour, O., 2009. The discovery of a mass grave of Napoleon's great army in Kaliningrad (formerly Königsberg), Russian federation: preliminary results and interpretations. 9e Journées d'Anthropologie de Valbonne.

Maat, G.J.R., Van den Bos, R.P., Aarents, M.J., 2001. Manual preparation of ground sections for the microscopy of natural bone tissue: update and modification of Frost's 'rapid manual method'. *International Journal of Osteoarchaeology* 11, 366-374.

Martiniakova, M., Vondrakova, M., Radoslav, O., 2006. Manual Preparation of thin sections from historical human skeletal material. *Timisoara Medical Journal* 56(1), 15-17.

Mays, S., Maat, G.J.R., De Boer, H.H., 2013. Scurvy as a factor in the loss of the 1845 Franklin expedition to the Arctic: a reconsideration. *International Journal of Osteoarchaeology* (in press).

Van der Merwe, A.E., Steyn, M. and L'Abbé, E.N., 2010. Trauma and amputations in 19th century miners from Kimberley, South Africa. *International Journal of Osteoarchaeology* 20, 291-306.

Schultz, M., 1988. Methoden der Licht- und Elektronenmikroskopie. In: *Handbuch der vergleichenden Biologie des Menschen*. Knussmann, R., (Ed.). Gustav Fischer Verlag: Stuttgart.

Turner-Walker, G. and Mays, S., 2008. Histological studies on ancient bone. In: *advances in human palaeopathology*. Pinhasi, R. and Mays, S., (Eds.). John Wiley and Sons: Sussex

