

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΟΔΙΚΑΣΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
Διτης: Αν. Καθηγητής Μιχαλοδημητράκης Εμμανουήλ**

**ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΔΗΚΤΙΚΩΝ
ΤΡΑΥΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΚΩΣΕΩΝ
ΚΑΙ
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ ΤΩΝ
ΤΡΑΥΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΚΩΣΕΩΝ ΣΤΑ ΖΩΑ.**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΤΟΥ
ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ Ι. ΨΑΡΟΥΔΑΚΗ
ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΥ**

Επιβλέπων Καθηγητής: Αν. Καθηγητής Μιχαλοδημητράκης Εμμανουήλ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2002

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. ΜΙΧΑΛΟΔΗΜΗΤΡΑΚΗΣ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ, (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)
ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
2. ΤΣΑΤΣΑΚΗΣ ΑΡΙΣΤΕΙΔΗΣ
ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
3. ΔΕΛΙΔΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. ΜΙΧΑΛΟΔΗΜΗΤΡΑΚΗΣ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ
ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
2. ΤΣΑΤΣΑΚΗΣ ΑΡΙΣΤΕΙΔΗΣ
ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
3. ΔΕΛΙΔΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
4. ΚΑΦΑΤΟΣ ΑΝΤΩΝΙΟΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
5. ΣΠΑΝΤΙΔΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
6. ΤΖΑΝΑΚΑΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ
ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
7. ΣΤΑΘΟΠΟΥΛΟΣ ΕΥΣΤΑΘΙΟΣ
ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

“ έτερος εξ ετέρου σοφός, το τε πάλαι το τε νυν”

Βακχυλίδης

“ πας άνθρωπος ορέγεται του ειδέναι”

Αριστοτέλης

Αφιερώνεται

στους γονείς μου,

στη Λίτσα και στα παιδιά μου Φανή και Στέλλα.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: Κων/νος Ιωάννου Ψαρουδάκης.

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑ: Κτηνίατρος. (Αρ. Κτην/κου Μητρώου ΓΕΩΤΕΕ 3-01919).

ΕΤΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: 1959

ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: Ρέθυμνο, Ρεθύμνης.

ΤΟΠΟΣ ΚΑΤΟΙΚΙΑΣ: Δημητρακάκη 7, ΤΚ 74100, Ρέθυμνο.

ΤΗΛΕΦΩΝΟ: σπ.(0831) 52070, 29743, εργασία. 081- 260602, 315072, FAX 260602.

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ: Έγγαμος, πατέρας δύο παιδιών.

ΤΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ: ΕΛ.Γ.Α ,Οργανισμός Ελληνικών Γεωργικών Ασφαλίσεων Υποκ/μα Κρήτης, 62 Μαρτύρων 146 Ηράκλειο.

ΕΙΔΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ: Κτηνίατρος, επόπτης πραγματογνωμοσυνών, του Υποκίτος ΕΛ.Γ.Α Κρήτης.

ΣΤΡΑΤΙΩΤΙΚΕΣ ΥΠΟΧΡΕΩΣΕΙΣ: Εκπλήρωση των Στρατιωτικών υποχρεώσεων σαν ΔΕΑ στο Υγειονομικό Σώμα Κ.ΒΙ.Ε.Σ (Κέντρο Βιολογικών ερευνών Στρατού).

ΒΑΣΙΚΕΣ ΣΠΟΥΔΕΣ: Πτυχιούχος της Κτηνιατρικής Σχολής, του Α.Π.Θ. (Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης). Χρόνος αποφοίτησης: 20 Ιουλίου 1983.

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ: Ιταλικά (πολύ καλά), Αγγλικά (καλά), Γαλλικά (λίγα).

ΛΟΙΠΕΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ:

- Αντιπρόεδρος του Π.Κ. του Πανελλήνιου Κτηνιατρικού Συλλόγου.
- Εκλεγμένο μέλος των αντιπροσώπων του Π.Κ. του ΓΕΩ.Τ.Ε.Ε
- Μέλος της Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρίας.

ΜΕΤΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ.

1. Από 1-10-1986 έως 31-10-1987, μετεκπαίδευση στην εργαστηριακή και κλινική μελέτη των ασθενειών του χοίρου, στο INSTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DI PARMA - ITALIA, μετά από πρόσκλησή του.

2. Από τον Ιούλιο του 1996 , ως μεταπτυχιακός σπουδαστής στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικών Επιστημών της Ιατρικής Σχολής του Παν/ου Κρήτης, για εκπόνηση διδακτορικής διατριβής .

3. Μετεκπαίδευση στην κτηνιατρική διαγνωστική παθολογική ανατομική στις κτηνιατρικές σχολές Θεσ/νίκης και Καρδίτσας, από τον Σεπτέμβριο του 2000 έως τον Ιούνιο του 2001.

ΠΡΟΫΠΗΡΕΣΙΑ.

1. Από 1 Φεβρουαρίου 1988 έως 30 Απριλίου 1989.

Ειδικός Μεταπτυχιακός Υπότροφος (ΕΜΥ) στην Ανωτάτη Γεωπονική Σχολή Αθηνών, Τομέας Ζωικής Παραγωγής, Τμήμα Ανατομίας και Φυσιολογίας των ζώων, για την εκπόνηση ερευνητικών προγραμμάτων και παροχή εκπαιδευτικού έργου. (Υπεύθυνος καθηγητής κος Στοφόρος Ευθύμιος).

2. Από 4 Μαΐου 1989 έως σήμερα.

Κτηνίατρος - πραγματογνώμονας στον Οργανισμό Ελληνικών Γεωργικών Ασφαλίσεων (ΕΛ.Γ.Α), για την διενέργεια πραγματογνωμοσυμών (κτηνιατροδικαστικών διερευνήσεων), ενστάσεων και διαιτησιών, που αφορούν το ζωικό κεφάλαιο.

ΣΥΜΜΕΤΟΧΕΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ ΜΕ ΕΡΓΑΣΙΑ.

13^ο Εθνικό Συνέδριο Μικροβιολογίας.

10 – 13 Απριλίου 1988 (ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ).

Θέμα: «Η απομόνωση του αιμόφιλου της πλευροπνευμονίας των χοίρων για πρώτη φορά στην Ελλάδα». (Κ. Ψαρουδάκης, Ε. Μπιρμπίλη, Ε. Στοφόρος).

1^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αγροτικών Ασφαλίσεων.

10 – 11 Δεκεμβρίου 1992 (ΑΘΗΝΑ).

Θέμα: «Ο ρόλος του ΕΛ.Γ.Α στην ασφάλιση του ζωικού κεφαλαίου. Προοπτικές και δυνατότητες». (Κ. Ψαρουδάκης και συν.).

3. 1^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας.

19 – 20 Σεπτεμβρίου 1998. (ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ).

Θέμα: «Εισαγωγή στην κτηνιατροδικαστική». (Κ. Ψαρουδάκης, Μ. Μιχαλοδημητράκης).

4. Η Ασφάλιση του Ζωικού Κεφαλαίου. Ημερίδα διαμόρφωσης πολιτικής

16 Νοεμβρίου 1999. (ΝΑΟΥΣΑ).

Θέμα: « Αρχές και κανόνες εκτιμητικής πρακτικής » (Κ. Ι. Ψαρουδάκης).

5. Η κτηνοτροφία της Κρήτης και την διαχρονική αξία των προϊόντων της. Ημερίδα

11 Φεβρουαρίου 2000 (ΡΕΘΥΜΝΟ).

Διοργάνωση ΓΕΩΤΕΕ, Περιφέρεια Κρήτης.

Θέμα: «Η ασφάλιση του ζωικού κεφαλαίου από τον ΕΛ. Γ. Α.» (Κ. Ψαρουδάκης).

6. Παγκρήσιο Ιατρικό Συνέδριο.

Νοέμβριος 2000 (ΡΕΘΥΜΝΟ).

Διοργάνωση Ιατρική Εταιρεία Ρεθύμνου.

Θέμα: «Εφαρμογή των μεθόδων της ενζυμικής ιστοχημείας στον προσδιορισμό της ηλικίας των τραυματικών κακώσεων». (Κ. Ψαρουδάκης, Μ. Μιχαλοδημητράκης).

7. Η Ασφάλιση του Ζωικού Κεφαλαίου. Ημερίδα.

30 Μαρτίου 2001. (ΚΑΣΤΟΡΙΑ.)

Θέμα: « Ο ρόλος της ενεργητικής προστασίας στην ασφάλιση του ζωικού κεφαλαίου» (Κ. Ι. Ψαρουδάκης).

8. Η αξιοποίηση των ορεινών περιοχών της Κρήτης. Ημερίδα.

23 Νοεμβρίου 2001. (ΗΡΑΚΛΕΙΟ).

Διοργάνωση Πανεπιστήμιο Κρήτης – Μουσείο Φυσικής Ιστορίας.

Θέμα: “ Ο ρόλος των κτηνοτροφικών αποζημιώσεων στην ανάπτυξη των ορεινών περιοχών της Κρήτης”. (Κ. Ψαρουδάκης).

9. Το πρόβλημα των αδέσποτων ζώων. Προτάσεις για λύση. Ημερίδα.

25 Νοεμβρίου 2001. (ΗΡΑΚΛΕΙΟ).

Διοργάνωση Πανελλήνιος Κτηνιατρικός Σύλλογος – Π.Κ.

Θέμα: “ Οι οικονομικές επιπτώσεις των ζημιών που προκαλούν τα αδέσποτα σκυλιά στην Κρήτη”. (Κ. Ψαρουδάκης)

10. 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας.

6 – 10 Νοεμβρίου 2002. (ΗΡΑΚΛΕΙΟ).

Θέμα : «Προσδιορισμός της ηλικίας των δερματικών τραυμάτων με ιστοχημικές μεθόδους σε πειραματόζωα». (Κ. Ι. Ψαρουδάκης, Μ.Ν.Τζατζαράκης, Α. Μ. Τσατσάκης, Μ. Μιχαλοδημητράκης).

ΣΥΜΜΕΤΟΧΕΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ – ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

1) Νοέμβριος 1986 έως Απρίλιος 1987 (BRESCIA - ITALIA).

Σεμιναριακά μαθήματα με θέμα: «Ασθένειες των Αιγοπροβάτων και Θεραπεία αυτών.»

2) Οκτώβριος 1986 (MANDOVA - ITALIA).

Ημερίδα με θέμα: *«Θεραπεία των Νοσημάτων των Χοίρων.»*

3) Ιούνιος 1987 (SABIONETTA - ITALIA).

Ημερίδα με θέμα: *«Κτηνιατρική Ανοσολογία.»*

4) 10 – 13 Απριλίου 1988 (ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ).

ΔΙΟΡΓΑΝΩΣΗ: Ελληνική Μικροβιολογική Εταιρία.

13^ο Εθνικό Συνέδριο Μικροβιολογίας.

5) 28 – 30 Σεπτεμβρίου 1988 (ΑΘΗΝΑ).

ΔΙΟΡΓΑΝΩΣΗ: Ελληνική Μικροβιολογική Εταιρία.

Σεμινάριο 24 ωρών με θέμα: *«Παράσιτα και Μύκητες Ιατρικής Σημασίας για τον Ελλαδικό Χώρο.»*

6) 31 Οκτωβρίου έως 4 Νοεμβρίου 1988 (ΑΘΗΝΑ).

ΔΙΟΡΓΑΝΩΣΗ: Ελληνική Μικροβιολογική Εταιρία.

Σεμινάριο 30 ωρών με θέμα: *«Αναερόβια Μικρόβια.»*

7) 10-11 Δεκεμβρίου 1992 (ΑΘΗΝΑ).

ΔΙΟΡΓΑΝΩΣΗ: ΕΛΓΑ-Αγροτική Ασφαλιστική.

1^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Γεωργικών Ασφαλίσεων.

8) 19 – 21 Οκτωβρίου 1995 (ΧΕΡΣΟΝΗΣΟΣ ΚΡΗΤΗΣ).

ΔΙΟΡΓΑΝΩΣΗ: Διεθνής ομοσπονδία γάλακτος.

Διεθνές σεμινάριο με θέμα: *«Παραγωγή και Αξιοποίηση του Αιγοπρόβειου Γάλακτος» (Production and Utilization of Ewes and Goats Milk).*

9) 22 Οκτωβρίου 1995 (ΧΕΡΣΟΝΗΣΟΣ ΚΡΗΤΗΣ).

ΔΙΟΡΓΑΝΩΣΗ: Διεθνής ομοσπονδία γάλακτος.

Ημερίδα με θέμα: *«Το Παρόν και το Μέλλον της Ελληνικής Αιγοπροβατοτροφίας.»*

10) 16 Μαρτίου 1996 (ΗΡΑΚΛΕΙΟ).

ΔΙΟΡΓΑΝΩΣΗ: ΓΕΩΤΕΕ.

Ημερίδα με θέμα: *«Υγιεινή και Ασφάλεια Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης. Υγιεινή Εργοστασίων Παραγωγής Τροφίμων .»*

11) 15 Ιουνίου 1996 (ΡΕΘΥΜΝΟ).

ΔΙΟΡΓΑΝΩΣΗ: ΟΑΕΔ – SYSTEM ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ.

Σεμινάριο 8ωρών με θέμα: *«Βασικές Αρχές HACCP στα Εργοστάσια Παραγωγής Τροφίμων .»*

12) 19 – 20 Σεπτεμβρίου 1998. (ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ).

ΔΙΟΡΓΑΝΩΣΗ: Ελληνική τοξικολογική εταιρεία.

1^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας.

13) 11 Αυγούστου 1999. (ΧΑΝΙΑ).

ΔΙΟΡΓΑΝΩΣΗ: Δ/νση Γεωργίας Χανίων.

Ημερίδα με θέμα: « *Βιολογικά Προϊόντα Ζωικής και Φυτικής Προέλευσης*».

14) 30 Οκτωβρίου 1999 (ΗΡΑΚΛΕΙΟ).

ΔΙΟΡΓΑΝΩΣΗ: Πανελλήνιος Κτηνιατρικός Σύλλογος.

Ημερίδα με θέμα: «*Κτηνιατρικοί Υγειονομικοί Έλεγχοι*».

15) 3 – 5 Νοεμβρίου 1999 (ΧΑΝΙΑ).

ΔΙΟΡΓΑΝΩΣΗ: Ελληνική Ζωοτεχνική Εταιρία.

15^ο Πανελλήνιο συνέδριο της Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρίας.

16) 5 Νοεμβρίου 1999 (ΡΕΘΥΜΝΟ).

ΔΙΟΡΓΑΝΩΣΗ: Ελληνική Ζωοτεχνική Εταιρία – Α.Σ.Ε.Α.Ρ.

Ημερίδα με θέμα: «*Γενετική Βελτίωση και Διατροφή Αιγοπροβάτων*».

17) 14 Νοεμβρίου 1999 (ΧΑΝΙΑ).

ΔΙΟΡΓΑΝΩΣΗ: Κρητική Διατροφή Α.Ε

Σεμινάριο 6 ωρών με θέμα: « *Εσωτερικοί Έλεγχοι στα πλαίσια του Συστήματος Διασφάλισης της Ποιότητας*».

18) 11 Φεβρουαρίου 2000 (ΡΕΘΥΜΝΟ).

ΔΙΟΡΓΑΝΩΣΗ: ΓΕΩΤΕΕ, Περιφέρεια Κρήτης.

Ημερίδα με θέμα: «*Η Κτηνοτροφία της Κρήτης και την Διαχρονική Αξία των Προϊόντων της*».

19) 23 Απριλίου 2000 (ΡΕΘΥΜΝΟ).

ΔΙΟΡΓΑΝΩΣΗ: Πανελλήνιος Κτηνιατρικός Σύλλογος.

Παγκρήτιο Συμπόσιο Κτηνιατρικής.

20) 14 Ιουνίου 2000 (ΧΑΝΙΑ – ΜΑΙΧ).

ΔΙΟΡΓΑΝΩΣΗ: Μεσογειακό Αγρονομικό Ινστιτούτο Χανίων.

Ημερίδα με θέμα: «*Ποιότητα Αγροτικών Προϊόντων*».

21) 8 – 13 Νοεμβρίου 2000 (ΡΕΘΥΜΝΟ).

ΔΙΟΡΓΑΝΩΣΗ: Ιατρική Εταιρεία Ρεθύμνου.

Παγκρήτιο Ιατρικό Συνέδριο.

22) 10 Νοεμβρίου 2000 (ΡΕΘΥΜΝΟ).

ΔΙΟΡΓΑΝΩΣΗ: Εθνική Επιτροπή Γάλακτος – Δ/νση Γεωργίας Ρεθύμνης.

Ημερίδα με θέμα: « Παραδοσιακά Γαλακτοκομικά Προϊόντα της Κρήτης».

23) 12 Δεκεμβρίου 2000 (ΗΡΑΚΛΕΙΟ).

ΔΙΟΡΓΑΝΩΣΗ: Πανελλήνιος Κτηνιατρικός Σύλλογος.

Ημερίδα με θέμα «*Η Σπογγώδης Εγκεφαλοπάθεια των Βοοειδών*».

24) 24 – 26 Νοεμβρίου 2000. (ΠΕΙΡΑΙΑΣ).

ΔΙΟΡΓΑΝΩΣΗ: Ελληνική τοξικολογική εταιρεία.

2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας.

25) 30 Μαρτίου 2001. (ΚΑΣΤΟΡΙΑ).

ΔΙΟΡΓΑΝΩΣΗ: ΕΛΓΑ.

Ημερίδα με θέμα: «*Η Ασφάλιση του Ζωικού Κεφαλαίου*».

26) 8 Ιουνίου 2001 (ΡΕΘΥΜΝΟ).

ΔΙΟΡΓΑΝΩΣΗ: ΓΕΩΤΕΕ – Περιφέρεια Κρήτης.

Ημερίδα με θέμα: « *Ανασυγκρότηση της Υπαίθρου. Εφικτός Στόχος ή Ουτοπία*»

27) 23 Νοεμβρίου 2001. (ΗΡΑΚΛΕΙΟ).

ΔΙΟΡΓΑΝΩΣΗ: Πανεπιστήμιο Κρήτης – Μουσείο Φυσικής Ιστορίας.

Ημερίδα με θέμα: «*Η Αξιοποίηση των Ορεινών Περιοχών της Κρήτης*».

28) 25 Νοεμβρίου 2001. (ΗΡΑΚΛΕΙΟ).

ΔΙΟΡΓΑΝΩΣΗ: Πανελλήνιος Κτηνιατρικός Σύλλογος – Π.Κ.

Ημερίδα με θέμα: « *Το Πρόβλημα των Αδέσποτων Ζώων. Προτάσεις για λύση*».

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

1) Κ. Ψαρουδάκης, Ε. Μπιρμπίλη, Ε. Στοφόρος, 1989, «Μέθοδοι εργαστηριακής απομόνωσης και ταυτοποίησης του *Haemophilus pleuropneumoniae* των χοίρων», Δελτίο Ελληνικής Κτην/κής Εταιρίας.

2) Κ.Ψαρουδάκης, Μ.Μιχαλοδημητράκης,1996, «Κτηνιατροδικαστική διερεύνηση της κεραυνοπληξίας», Γεωτεχνικά Θέματα, 17.

3) Κ. Ψαρουδάκης, Ε. Μπιρμπίλη, Μ.Μιχαλοδημητράκης, 1996, «Αντοχή των ζώων στις υψηλές θερμοκρασίες», Γεωτεχνικά Θέματα, 18.

4) Κ. Ψαρουδάκης, 1997, «Αδέσποτα σκυλιά, προτάσεις για την αντιμετώπιση του προβλήματος», Κυνήγι στην Κρήτη, 19.

5) Κ. Ψαρουδάκης, Ε. Μπιρμπίλη, 1997, «Υγιεινή των θηραμάτων», Κυνήγι στην Κρήτη, 20.

6) Κ. Ψαρουδάκης, Σ. Τζανιδάκη ,1998, «Η οίστρωση των αιγοπροβάτων», Γεωτεχνικά Θέματα, 19.

7) Tsatsakis A M, Psaroudakis K, Tzatzarakis E, Michalodimitrakis M N, 1998, “*Pesticide Deposition in Hair. Preliminary Results of a Model Study of Methyl Incorporation into Rabbit Hair*”. Veterinary and Human Toxicology, 40.

8) Psaroudakis K, Tzatzarakis E, Tsatsakis A M, Michalodimitrakis M N, 2001, “*The Application of Histochemical Methods in the Age Evaluation of Skin Wounds – Experimental Study in Rabbits*”. The American Journal of Forensic Medicine and Pathology, 22 (4): 341-345.

ΣΥΓΓΡΑΦΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ.

1.Κ. Ψαρουδάκης ,Μ Μιχαλοδημητράκης, « Εισαγωγή στην Κτηνιατροδικαστική – Βιβλίο Εκτιμητικής Πρακτικής», 1999, Εκδόσεις ΕΛ.Γ.Α (Βιβλίο).

2.Κ.Ψαρουδάκης, Μ.Μιχαλοδημητράκης, Ε. Μπιρμπίλη, «Κτηνιατροδικαστική Διερεύνηση της Επίδρασης της Θερμοκρασίας του Περιβάλλοντος στους Ζωικούς Οργανισμούς», 1997 , Εκδόσεις ΕΛΓΑ (Φυλλάδιο).

3. Μ Μιχαλοδημητράκης, Κ. Ψαρουδάκης «Κτηνιατροδικαστική Διερεύνηση της Κεραυνοπληξίας και των Θανάτων από Πνιγμό» ,1995 , Εκδόσεις ΕΛΓΑ (Φυλλάδιο).

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	5-11
----------------------------	-------------

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	14-15
-----------------	--------------

ΚΕΦΑΛΑΙΟ I “Χαρακτηριστικά των δηκτικών κακώσεων στα ζώα”

1. ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΚΑΚΩΣΕΩΝ	16-22
1.1 Τραυματικές κακώσεις	16-20
1.2 Θλαστικές κακώσεις	20-22
2. ΑΝΑΤΟΜΙΚΑ ΚΑΙ ΣΩΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	23-28
2.1 Ανατομικά και σωματομετρικά στοιχεία των σκύλων – δραστών	23-26
2.2 Ανατομικά και σωματομετρικά στοιχεία των ζώων – θυμάτων	26-28
3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ ΤΩΝ ΔΗΚΤ. ΚΑΚΩΣΕΩΝ	28-70
3.1 Υλικά	28-31
3.2 Μεθοδολογία	31-37
3.3 Στοιχεία από την εξέταση, που αφορούν τους σκύλους – δράστες	38-45
3.4 Στοιχεία από την εξέταση, που αφορούν τα ζώα – θύματα	45-47
3.5 Στοιχεία από την εξέταση, που αφορούν τις δηκτικές κακώσεις	48-70

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II “Προσδιορισμός της ηλικίας των τραυματικών κακώσεων στα ζώα”

1. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ ΤΩΝ ΤΡΑΥΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΚΩΣΕΩΝ	70-76
1.1 Ιστολογικές μέθοδοι	70-72
1.2 Βιοχημικές μέθοδοι	72
1.3 Ιστοχημικές μέθοδοι	72-74
1.4 Ανισοιστοχημικές μέθοδοι	74-76
1.5 Μέθοδος ELISA	76
1.6 Μέθοδος ανοσοφθορισμού	76
1.7 Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο	76
2. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ	77-91
2.1 Γενικά	77-82
2.2 Ενζυμική ιστοχημεία	82-85
2.3 Φυσιογνωμία των εξεταζόμενων ενζύμων και αρχές της διερεύνησής τους	85-91

3. ΤΡΑΥΜΑΤΙΚΕΣ ΚΑΚΩΣΕΙΣ, ΙΑΣΗ ΤΩΝ ΔΕΡΜΑΤΙΚΩΝ ΤΡΑΥΜΑΤΩΝ	91-97
4. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ	98-99
4.1 Επιδερμίδα	98
4.2 Χόριο	98
4.3 Υποδόριος ιστός	99
4.4 Εξαρτήματα του δέρματος	99
5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	100-122
5.1 Υλικά και σχεδιασμός	100-105
5.2 Μέθοδοι ιστοχημικού προσδιορισμού της ενζυμικής δραστηριότητας	105-122
5.2.1 Μέθοδοι ιστοχημικού προσδιορισμού της αλκαλικής φωσφατάσης	105-110
5.2.2 Μέθοδοι ιστοχημικού προσδιορισμού της ΑΤΡασης	111-116
5.2.3 Μέθοδοι ιστοχημικού προσδιορισμού των μη ειδικών εστερασών	117-122
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	123-128
6.1 Αποτελέσματα των προθανάτιων τραυμάτων	123-127
6.2 Αποτελέσματα των μεταθανάτιων τραυμάτων	128
7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	129-177
7.1 Περί τραυμάτων και φλεγμονών	129
7.2 Μεταβολές της ενζυμικής δραστηριότητας στην τραυματική περιοχή	129-131
7.3 Προσδιορισμός της ηλικίας των τραυμ. κακώσεων (στη μελέτη μας)	131-134
7.4 Ιστοχημικές ενζυμικές μέθοδοι (επιλογή μεθόδων)	135-141
7.5 Άλλες μέθοδοι προσδιορισμού της ηλικίας των τραυματικών κακώσεων	141-147
8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	148-152
8.1 Από τα χαρακτηριστικά των δηκτικών κακώσεων	148-149
8.2 Από τον προσδιορισμό της ηλικίας των τραυματικών κακώσεων	150-152
9. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	153-157
10. SUMMARY	158-164
11. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	165-180
12. ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΕΝΘΕΤΟ	181

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ανάμεσα στα σοβαρά προβλήματα που απασχολούν σήμερα την ιατροδικαστική, συγκαταλέγεται και αυτό, του προσδιορισμού της ηλικίας των τραυματικών κακώσεων, καθώς και της διάκρισης αυτών σε προθανάτιες και μεταθανάτιες. Σοβαρό επίσης πρόβλημα αποτελούν οι δηκτικές κακώσεις, τόσο από βιολογικής (ιατρικής ή κτηνιατρικής) όσον και από οικολογικής άποψης.

Πρωταρχικός στόχος αυτής της μελέτης, είναι η συμβολή της στην επιστημονική διερεύνηση των παραπάνω προβλημάτων. Η μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικών Επιστημών και τη Μονάδα Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης, με την υποστήριξη και συμπαράσταση του Οργανισμού Ελληνικών Γεωργικών Ασφαλίσεων (ΕΛΓΑ), που αποτελεί και τον εργασιακό μου φορέα.

Από τη φύση του το αντικείμενο της μελέτης, επέβαλε, από την άποψη της διάρθρωσης και επεξεργασίας, την ανάγκη διαχωρισμού της ύλης σε δύο κεφάλαια-ενότητες.

Το πρώτο κεφάλαιο, αναφέρεται στα χαρακτηριστικά των δηκτικών τραυματικών κακώσεων, δηλαδή των κακώσεων που προκαλούνται από τις δήξεις σαρκοφάγων ζώων και συγκεκριμένα κυνοειδών. Οι δηκτικές αυτές κακώσεις αναφέρονται σε «ζώα θύματα», τα οποία στην συντριπτική τους πλειοψηφία ήταν αιγοπρόβατα. Στην ενότητα αυτή, όπως είναι λογικό, δεν θα μπορούσε να υπάρξει πειραματικό κομμάτι, με την έννοια της εργαστηριακής αναπαραγωγής του φαινομένου της δήξης. Υπήρξε όμως προσεκτική μελέτη σε βάθος ανάλυση και συστηματική επεξεργασία των στοιχείων που συλλέχτηκαν από τις περιπτώσεις πρόκλησης δηκτικών τραυματικών κακώσεων, όπως αυτές διαδραματίστηκαν στο φυσικό περιβάλλον. Οι περιπτώσεις αυτές αναγγέλθηκαν στο υποκατάστημα του ΕΛΓΑ Κρήτης, ο οποίος αποτελεί τον φορέα αποζημίωσης των ιδιοκτητών των ζώων θυμάτων, σε παρόμοιες περιπτώσεις. Η πρόκληση δήξεων από τους σκύλους, συνιστά ένα ευρύτατο για ανάλυση θέμα που έχει εκτός από τις βιολογικές (ιατρικές) και άλλες συνέπειες όπως οικολογικές και κοινωνικές. Γιαυτό το λόγο η αναζήτηση, επεξεργασία και ανάλυση των στοιχείων που συλλέξαμε, γινόταν σε πολλές κατευθύνσεις, ώστε να καλυφθεί σφαιρικά το θέμα. Στην συγκεκριμένη όμως εργασία, αναφέρονται κύρια τα στοιχεία που αφορούν την ιατροδικαστική και την κτηνιατροδικαστική.

Το δεύτερο κεφάλαιο, αναφέρεται στον προσδιορισμό της ηλικίας των τραυματικών κακώσεων, καθώς και στην διαφοροποίηση των προθανάτιων από τις μεταθανάτιες κακώσεις, με ιστοχημικές μεθόδους, και είναι καθαρά πειραματικό.

Χρησιμοποιήθηκαν πειραματόζωα (κουνέλια), στα οποία γινόταν δερματικά τραύματα σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα. Στη συνέχεια εφαρμόστηκαν επιλεγμένες μέθοδοι της ενζυμικής ιστοχημείας, για να προσδιοριστεί η ηλικία και να γίνει η διάκριση των προθανάτιων από τις μεταθανάτιες τραυματικές κακώσεις. Μελετήθηκαν έτσι οι μεταβολές της ενζυμικής δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης, των μη ειδικών εστερασών και της ATP ασης, στην τραυματική περιοχή.

Τελειώνοντας, θα ήθελα να εκφράσω της θερμές μου ευχαριστίες στους παρακάτω φορείς και πρόσωπα, των οποίων η συνδρομή για την δημιουργία αυτής της εργασίας, υπήρξε πολύτιμη:

Στον επιβλέποντα Καθηγητή μου, Αναπληρωτή Καθηγητή Εμμανουήλ Μιχαλοδημητράκη.

Στην τριμελή και στην επταμελή μου επιτροπή.

Στον ΕΛΓΑ, που σαν εργοδότης μου, μου συμπαραστάθηκε και με στήριξε.

Στον Αναπληρωτή Καθηγητή της Τοξικολογίας, Αριστείδη Τσατσάκη.

Στον Καθηγητή της Διαγνωστικής Παθολογικής Ανατομικής της Κτηνιατρικής Σχολής του Παν/ου Θεσσαλονίκης Σωτήριο Λεοντίδη, μέλος της τριμελούς επιτροπής μέχρι την συνταξιοδότησή του.

Στον Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Παν/ου Αθηνών, Νικόλαο Τσαβαρή.

Στον Μανόλη Τζατζαράκη, χημικό, διδάκτορα της Τοξικολογίας, του οποίου η συνδρομή υπήρξε διαρκής, πολύτιμη και καθοριστική.

Στους Θανάση Αλεγκάκη, φυσικό, διδάκτορα της Τοξικολογίας, Μαρία Τουτουδάκη, βιοχημικό και Μαρία Χρηστάκη, διδάκτορα της Βιολογίας.

Στο προσωπικό του εργαστηρίου της Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Παν/ου Κρήτης.

Στο προσωπικό του Εργαστηρίου της Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής του Παν/ου Κρήτης.

Στο προσωπικό του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικών Επιστημών της Ιατρικής Σχολής του Παν/ου Κρήτης.

Στη διοικητικό υπάλληλο του υποκαταστήματος Κρήτης του ΕΛΓΑ, Μαρία Παπαδάκη, για την συνδρομή της στην συγγραφή και επεξεργασία των κειμένων.

Σε όλους όσους με τις συμβουλές ή τις παρεμβάσεις τους, βοήθησαν στην εκπόνηση αυτής της εργασίας.

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2002

ΚΩΝ/ΝΟΣ Ι. ΨΑΡΟΥΔΑΚΗΣ

Κεφάλαιο I

“ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΔΗΚΤΙΚΩΝ ΚΑΚΩΣΕΩΝ ΣΤΑ ΖΩΑ”

1. ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΚΑΚΩΣΕΩΝ

1.1 ΤΡΑΥΜΑΤΙΚΕΣ ΚΑΚΩΣΕΙΣ

Τραύμα, σύμφωνα με τον κλασσικό ορισμό, ονομάζονται οι λύσεις της συνέχειας του δέρματος και των υποκείμενων ιστών, που προκαλούνται από την επίδραση μηχανικής βίας στην τραυματική περιοχή.

1.1.1 Τα συμπτώματα των τραυμάτων.

Τα συμπτώματα των τραυμάτων διακρίνονται σε γενικά και ειδικά. Σαν γενικά συμπτώματα θεωρούνται η αιμορραγία και το άλγος.

Η αιμορραγία, αντίθετα με την περίπτωση των θλάσεων, αποτελεί αναπόφευκτο επακόλουθο του τραύματος. Το εξαγγειούμενο αίμα ρέει προς τα έξω μέσω των χειλέων του τραύματος ή σε ορισμένες περιπτώσεις προς το εσωτερικό του σώματος, στις μεταξύ των ιστών περιοχές ή μέσα σε προσχηματισμένες φυσικές κοιλότητες (θωρακική , κοιλιακή κλπ).

Η αιμορραγία που προκαλείται μπορεί να είναι αρτηριακή, φλεβική, τριχοειδής ή μικτή. Στην αρτηριακή αιμορραγία το αίμα ρέει σφυγμοειδώς, έχει χροιά ζωηρή ερυθρή και σταματά δύσκολα. Στη φλεβική αιμορραγία το αίμα ρέει χωρίς να σφύζει, έχει χροιά σκοτεινή ερυθρή, σταματά ευκολότερα και η ποσότητά του είναι μικρότερη. Η τριχοειδής αιμορραγία είναι συνήθως διάχυτη και εμφανίζεται σε εκτεταμένες τραυματικές επιφάνειες. Η μικτή αιμορραγία εμφανίζεται τις περισσότερες φορές στην πράξη. Προκαλείται από την ταυτόχρονη ρήξη αρτηριών, φλεβών και τριχοειδών αγγείων. Η αιμορραγία που προκαλούν τα τραύματα, είναι μεγαλύτερη (αφθονότερη) από αυτήν που προκαλούν οι θλάσεις, κύρια λόγω της εύκολης και χωρίς εμπόδια ροής του αίματος προς το εξωτερικό περιβάλλον. Αυτό δικαιολογείται γιατί στην περίπτωση των τραυμάτων, δεν υπάρχει η ενεργητική επίδραση τόσο της πίεσης των γύρω ιστών, όσο και του πηγμένου εξαγγειωμένου αίματος που επιδρούν θετικά στην επίσχεση της αιμορραγίας. Παρόλα αυτά, η επίσχεση της αιμορραγίας προς το περιβάλλον που προκαλείται από τα τραύματα, γίνεται σχετικά εύκολα, με απλούς τρόπους όπως πίεση, περιδωση, απολίνωση κλπ. Η επούλωση των τραυματισμένων αγγείων και συνεπώς η επίσχεση της αιμορραγίας, γίνεται με θρόμβωση. Ο θρόμβος που σχηματίζεται, αποφράσσει το άνοιγμα του αγγείου και στη συνέχεια οργανώνεται και επουλώνει το τραύμα του αγγείου. (Μιχαλοδημητράκης Ε. 1997, Spitz W. et al 1980, Ηλιάκης Κ. 1964).

Το άλγος στις τραυματικές κακώσεις είναι εντονότερο από τις αντίστοιχες θλαστικές κακώσεις. Αλλά και μεταξύ των ειδών των τραυμάτων δημιουργείται διαφορετικό, όσον αφορά την έντασή του, αλγινό ερέθισμα, που εξαρτάται από την βλάβη που έχει προκληθεί στις νευρικές απολήξεις.

1.1.2 Ταξινόμηση των τραυμάτων.

Η μορφή και τα χαρακτηριστικά, δηλαδή η ταξινόμηση, των διαφόρων τραυμάτων εξαρτούνται συνήθως από το είδος των οργάνων που τα προκαλούν. Συγκεντρωτικά, τα όργανα που προκαλούν τραυματισμό διακρίνονται σε θλώντα, τέμνοντα, νύσσοντα και μικτά (τέμνοντα και θλώντα, νύσσοντα και θλώντα και νύσσοντα και τέμνοντα). Η σχηματική αυτή περιγραφή των τραυμάτων σπάνια συναντάται στην πραγματικότητα, όπου τόσο η εικόνα της απόλυτης διατομής όσο και η εικόνα της απόλυτης διάτρησης σπάνια εμφανίζεται. Εκείνο που συμβαίνει στην πράξη είναι ο τραυματισμός με όργανα που μπορεί να έχουν τέμνουσες, νύσσουσες και αμβλείες επιφάνειες, ώστε να παράγονται εκτός από τις τραυματικές και θλαστικές κακώσεις. (Μιχαλοδημητράκης Ε. 1997, Polson C.J 1973)

α. Τραύματα από θλώντα όργανα.

Τα τραύματα αυτά έχουν αφενός τραυματικά χαρακτηριστικά, δηλαδή λύση της συνέχειας του δέρματος, αφετέρου διατηρούν και χαρακτηριστικά των θλαστικών κακώσεων. Αποτελούν κατά κάποιον τρόπο τον ενδιάμεσο τύπο κακώσεων μεταξύ θλάσης και τραύματος. Προκαλούνται από όργανα με αμβλείες επιφάνειες, οι οποίες όπως αναφέρεται παραπάνω προκαλούν όχι μόνο λύσεις της συνέχειας του δέρματος δηλαδή τραύματα, αλλά και θλάσεις. Τα χείλη των τραυμάτων αυτών είναι ανώμαλα με αιμορραγικές διηθήσεις, το βάθος τους είναι μικρό, ο πυθμένας ανώματος και συνοδεύονται από μικρή σε ένταση αιμορραγία. Το τελευταίο οφείλεται στην σύνθλιψη των και στην ακανόνιστη τομή των αγγείων, στοιχεία που υποβοηθούν την γρήγορη θρόμβωση και επίσχεση της αιμορραγίας. Η επούλωση είναι πολύ αργή, γιατί προηγείται η καταστροφή και η απόπτωση των καταστρεμμένων ιστών και ακολουθεί ή αναγέννηση. Οι ουλές που σχηματίζονται είναι ανώμαλες και ο κίνδυνος των μικροβιακών επιπλοκών μεγάλος.

β. Τραύματα από τέμνοντα όργανα.

Τα τραύματα αυτά προκαλούνται από όργανα τα οποία κόβουν και διαιρούν τους ιστούς. Έχουν μεγάλο μήκος, βάθος σχετικά μικρό, ανάλογο με την ασκούμενη στο τέμνον όργανο δύναμη, χείλη ομαλά, συμμετρικά, λεία, λεπτά, χωρίς αιμορραγικές διηθήσεις πυθμένα ομαλό, και συνήθως προκαλούν άφθονη αιμορραγία.

γ. Τραύματα από νύσσοντα όργανα.

Τα τραύματα αυτά που ονομάζονται και τραύματα διάτρησης παράγονται από όργανα που τρυπούν (νύσσοντα όργανα). Χαρακτηρίζονται από μεγάλο βάθος σε

σχέση με το επιφανειακό τους μήκος. Σαν νύσσοντα όργανα θεωρούνται ,όργανα λεπτά, συνήθως επιμήκη, οξύαιχμα, με μεγάλη ποικιλία μεγέθους και σχήματος. Για ευχερέστερη μελέτη τα κατατάσσουμε σε τρεις κατηγορίες:

Όργανα καθαρά νύσσοντα, δηλαδή επιμήκη, λεπτά και οξύαιχμα αντικείμενα, όπως βελόνες, λεπτά καρφιά κλπ.

Όργανα νύσσοντα και θλώντα, δηλαδή επιμήκη, όχι πολύ λεπτά, αλλά οξύαιχμα αντικείμενα, όπως χοντρά καρφιά, κέρατα ζώων, λόγχες κλπ.

Όργανα νύσσοντα και τέμνοντα, δηλαδή επιμήκη, οξύαιχμα, αλλά πλατιά αντικείμενα, με επιφάνεια που προκαλεί και τομή στους ιστούς. Παραδείγματα τέτοιων αντικειμένων είναι τα διάφορα είδη αμφίστομων ή μονόστομων μαχαιριών. (Μιχαλοδημητράκης Ε. 1997, Spitz W. et al 1980, Ηλιάκης Κ. 1964).

δ. Ειδικές κατηγορίες τραυμάτων.

Δηκτικές κακώσεις (τραύματα από δήξη).

Οι κακώσεις αυτές, που εντάσσονται στις ειδικές κατηγορίες των τραυματικών κακώσεων, προκαλούνται από δαγκώματα ζώων σε άλλα ζώα ή και στον άνθρωπο. Σπανιότερα την ιατροδικαστική απασχολούν δηκτικά τραύματα που προκαλούνται από ανθρώπους σε άλλους συνανθρώπους τους. Τα είδη των ζώων που προκαλούν δηκτικές κακώσεις, τόσο στον άνθρωπο, όσο και σε άλλα ζωικά είδη, είναι οι σκύλοι, οι γάτες, τα ιπποειδή, οι χοίροι, τα βοοειδή, διάφορα είδη άγριων θηλαστικών (αρκούδες, λύκοι, άγρια αιλουροειδή κλπ), τα ερπετά, τα έντομα και διάφορα είδη θαλάσσιων οργανισμών. Τέλος τα τρωκτικά και οι νυχτερίδες σε ορισμένες περιπτώσεις μπορούν να προκαλέσουν δήξη. (Shuman L. H. et al 2000, Leyhausen P., 1979). Η συχνότερη αιτία όμως των δηκτικών κακώσεων, είναι η δήξη από τους σκύλους και τους γάτες. (Shuman L.H, et al 2000, Clarence M.F 1998, Langley R.L 1994). Τα υπόλοιπα είδη των κατοικίδιων θηλαστικών, και ιδιαίτερα τα μεγαλόσωμα (χοίροι, ιπποειδή, βοοειδή κλπ), απασχολούν την ιατρική, κύρια λόγω των σοβαρών τραυμάτων που μπορούν να προκαλέσουν με τις οπλές, τις χηλές τα κέρατα και γενικά τα μέλη του σώματος τους, που χρησιμοποιούν για άμυνα. Βέβαια, μπορούν να προκαλέσουν και δηκτικές κακώσεις, αλλά με πολύ μικρότερη συχνότητα. Σε μελέτη που έχει γίνει στις Η.Π.Α. και ασχολείται μόνο με τις θανατηφόρες περιπτώσεις δηκτικών κακώσεων από διάφορα είδη ζώων στους ανθρώπους, προκύπτει ότι τα δήγματα των εντόμων κατέχουν την πρώτη θέση, και ακολουθούν αυτά των σκύλων, των γάτων, των αγρίων ζώων, των αλόγων των αγελάδων και των χοίρων. (Guy N.C et al 2001, Grant I. et al 2000).

Οι δηκτικές κακώσεις, εντάσσονται και κατέχουν εξέχουσα θέση στην κατηγορία των κακώσεων, που προκαλούν τα διάφορα ζωικά είδη στους ανθρώπους. Έχουν μεγάλη σημασία τόσο από την σκοπιά της δημιουργίας τραυματικών κακώσεων, πολλές φορές σοβαρών, όσον και από την άποψη της

μετάδοσης σοβαρών λοιμωδών νοσημάτων. (Zabel et al 2000, Greigo R.D 1995, Ettinger S.J 1995, Ηλιάκης Κ. 1964). Συνιστούν επίσης, ένα σοβαρό πρόβλημα, παγκόσμιας εμβέλειας το οποίο έχει μελετηθεί αρκετά, στις περιπτώσεις στις οποίες τα θύματα ήταν άνθρωποι. Απεναντίας, ελάχιστες είναι οι αναφορές σε περιπτώσεις δήξεων, όπου τα θύματα ήταν ζώα. Στις Η.Π.Α. υπολογίζεται ότι υπάρχουν περίπου 40 εκατομμύρια σκύλοι. Επίσης υπολογίζεται ότι κάθε χρόνο δημιουργούνται περίπου 1 εκατομμύριο κακώσεις από ζώα σε ανθρώπους. Το 40-50% από αυτές, προέρχονται από δήξεις σκύλων. Ευτυχώς το ποσοστό των θανατηφόρων περιπτώσεων των δήξεων σε ανθρώπους, είναι πολύ μικρό. Ενδεικτικά αναφέρουμε ότι, από το 1 εκατομμύριο των τραυματισμένων από ζώα ανθρώπων, περίπου 300 χιλιάδες επισκέπτονται τα νοσοκομεία, 10 χιλιάδες παραμένουν μετά τις πρώτες βοήθειες για νοσηλεία ενώ μόνο 120 περίπου άνθρωποι πεθαίνουν, από τους οποίους 20 είχαν υποστεί δηκτικές κακώσεις από σκύλους. (Talan D.A. 1999, Guy N.C et al 2001, Chang F.Y et al 1997, Langley R.L 1994). Στην Ισπανία και συγκεκριμένα στην μείζονα περιοχή της Βαλέντιας, σε σύνολο 164.000 παιδιών 0-14 ετών, 132 παιδιά δέχτηκαν επίθεση από σκύλους και διακομίστηκαν στο νοσοκομείο. Από αυτά τα 121 (91.7%) μετά τις πρώτες βοήθειες επέστρεψαν στο σπίτι τους, ενώ 11 παιδιά (8.3%), παρέμειναν για νοσηλεία. (Cassani M.C et al 2001). Στο Ηνωμένο Βασίλειο, περίπου 200.000 άνθρωποι τραυματίζονται από θηλαστικά ζώα κάθε χρόνο. Το 70% αυτών περίπου, φέρει δηκτικές κακώσεις από σκυλιά. (Aslam A. et al 1999).

Οι δηκτικές κακώσεις εμφανίζουν ποικίλα χαρακτηριστικά, που εξαρτώνται τόσο από το ζωικό είδος που τα προκαλεί, όσο και από τα σημεία τραυματισμού. Η πλειονότητα τους, κατατάσσεται στην κατηγορία των τραυμάτων διάτρησης, τραυμάτων δηλαδή που προκαλούνται από «νύσσοντα όργανα». Χαρακτηρίζονται από μεγάλο βάθος σε σχέση με την επιφάνειά τους. Βέβαια δεν μπορεί να αποκλεισθεί η συνύπαρξη διάφορου βαθμού θλαστικής κάκωσης, καθώς και η απόσχιση και απόσπασση τεμαχίων ιστών από την τραυματική περιοχή. (Eriksson A. 1991, Greigo R.D 1995, Μιχαλοδημητράκης Ε. 1997).

Η δηκτική κάκωση εξεταζόμενη συνολικά, είναι άμεσα συνδεδεμένη με τα των χαρακτηριστικά των δοντιών του “ζώου δράστη”, δηλαδή το μήκος, το εύρος, την αιχμηρότητα ή την αμβλύτητα και τον αριθμό τους. Έτσι οι κακώσεις αυτές προσλαμβάνουν χαρακτηριστικά άλλοτε θλάσεων (εκχυμώσεις, εκδορές, διασχίσεις, σκελετικές κακώσεις, θλαστικές κακώσεις σπλάχνων κλπ), άλλοτε τραυμάτων (θλαστικών ή νυσσόντων και θλαστικών ή αποσπαστικών τραυμάτων) και άλλοτε θλάσεων και τραυμάτων μαζί. Οι δηκτικές κακώσεις συμπερασματικά, συνιστούν κακώσεις που παράγονται από τα δόντια, τα οποία ανάλογα με την μορφολογία τους, δημιουργούν τραύματα τομής και διάτρησης (κυνόδοντες, κοπτήρες) ή θλαστικές

κακώσεις (γομφίοι και προγόμφιοι οδόντες) ή θλαστικές και τραυματικές κακώσεις από κοινού. (Aksu M.N et al 1996, Ettinger S.J 1995, Eriksson A. 1991, Spitz W. 1980).

Στη συγκεκριμένη μελέτη διερευνήθηκαν οι δηκτικές κακώσεις, οι οποίες προκλήθηκαν από σαρκοφάγα ζώα-δράστες και συγκεκριμένα από αδέσποτα σκυλιά. πάνω σε άλλα ζώα- θύματα και όχι στον άνθρωπο.

ε. Τραύματα που συνοδεύονται με αποσπάσεις ιστών.

Τα τραύματα αυτά δημιουργούνται όταν εφαρμόζεται έλξη σε ιστούς ή όταν η δύναμη που εφαρμόζεται σε κάποιο σημείο μιας επιφάνειας του σώματος, δρα λοξά στην συγκεκριμένη επιφάνεια. Τα χαρακτηριστικά των τραυμάτων αυτών ποικίλλουν ανάλογα με τον τρόπο δημιουργίας τους, με κοινό στοιχείο την απόσπαση και απομάκρυνση κομματιού από τους ιστούς. (Μιχαλοδημητράκης Ε. 1997).

1.2 ΘΛΑΣΤΙΚΕΣ ΚΑΚΩΣΕΙΣ.

Οι θλαστικές κακώσεις προκαλούνται από την απελευθέρωση κινητικής ενέργειας όπως φαίνεται στον τύπο της φυσικής: $E = \frac{1}{2} m \cdot v^2$, όπου m είναι η μάζα του θλαστικού οργάνου και v η ταχύτητα με την οποία προσπίπτει στο σώμα. Οι πιο συνηθισμένοι τρόποι πρόκλησης των θλαστικών κακώσεων είναι η πρόσκρουση ενός κινούμενου θλαστικού οργάνου, δηλαδή ενός αντικειμένου με αμβλείες επιφάνειες, στο σώμα. Παρά το γεγονός ότι τα περισσότερα θύματα θλαστικών κακώσεων εμφανίζουν εξωτερικά εμφανείς σωματικές βλάβες (αμυχές, εκδορές, εκχυμώσεις, διασχίσεις), σε αρκετές περιπτώσεις σοβαρών θλαστικών κακώσεων με ρήξεις σπλάχνων, οι εξωτερικές βλάβες είναι πολύ περιορισμένες. (Μιχαλοδημητράκης Ε. 1997).

Μορφολογικά οι θλαστικές κακώσεις της εξωτερικής επιφάνειας του σώματος εκδηλώνονται σαν εκχυμώσεις, εκδορές, διασχίσεις, σκελετικές κακώσεις και κακώσεις των σπλάχνων. Ανάλογα αν υπάρχει ελεύθερη επικοινωνία με το εξωτερικό περιβάλλον, οι θλαστικές κακώσεις διακρίνονται σε «κλειστές» (εκχυμώσεις, μώλωπες, αιματώματα, κατάγματα, ρήξεις σπλάχνων κλπ) ή σε «ανοικτές» θλαστικές κακώσεις (αμυχές, εκδορές, διασχίσεις, αποσπάσεις ιστών κλπ).

1. Εκχυμώσεις

Είναι αιμορραγίες εντός του δέρματος ή των οργάνων, χωρίς μακροσκοπικά ορατή λύση της συνέχειας του συγκεκριμένου ιστού. Προκαλούνται από την ρήξη των τοπικών αγγείων. Η αιμορραγία αρχίζει με την ρήξη του αγγειακού τοιχώματος και διηθεί το γειτονικό ιστό. Η αιμορραγική αυτή διήθηση μπορεί να είναι εντοπισμένη ή διάχυτη, πράγμα που εξαρτάται από την χαλαρότητα των ιστών που είναι γύρω από το σημείο της αιμορραγίας, από το βαθμό αγγείωσης της περιοχής, από την ευθραυστότητα των αγγείων και από ατομικούς παράγοντες. Όταν η αιμορραγία είναι

μεγάλη, τότε οι γειτονικοί ιστοί αποκολλούνται από το κέντρο της αιμορραγίας και δημιουργείται αιμορραγική συλλογή που ονομάζεται **αιμάτωμα**. Αν η εκχύμωση συνοδεύεται με εξοίδηση, συνήθως όταν κάτω από την πληγείσα περιοχή υπάρχει οστό, γίνεται λόγος για **μώλωπα**. (Μιχαλοδημητράκης Ε. 1997).

2. Εκδορές.

Σαν εκδορά θεωρείται η βίαιη απόσπαση των επιπολής στοιβάδων του δέρματος. Στο απογυμνωμένο χόριο σχηματίζεται εφελκίδα, λόγω της πήξης του εξερχόμενου ορώδους υγρού, το οποίο πολλές φορές περιέχει και έμμορφα συστατικά του αίματος. Οι εκδορές, αν και ανήκουν κανονικά στα τραύματα, διαφέρουν από αυτά στο ότι δεν προκαλούν καταστροφή ολόκληρου του πάχους του δέρματος, πράγμα το οποίο συμβαίνει εξ ορισμού στα τραύματα. Η έκταση η μορφή και το σχήμα των εκδορών εξαρτάται, όπως είναι φυσικό, από το είδος του οργάνου που τις προκαλεί. Άλλοτε μοιάζουν με λεπτές και περιορισμένες γραμμώσεις που ονομάζονται αμυχές και άλλοτε είναι πολύ εκτεταμένες. (Μιχαλοδημητράκης Ε. 1997, Αγιουτάντης Γ. 1980).

Τις περισσότερες φορές, οι κίνδυνοι για τη ζωή των ζώων είναι ανύπαρκτοι και μόνο άλγος και μικρού βαθμού αιμορραγία προκαλούν.

3. Διασχίσεις

Οι διασχίσεις συνιστούν ρήξεις (σχισίματα) του δέρματος, των βλεννογόνων και των παρεγχυματωδών οργάνων. Ιδιαίτερος τύπος διάσχισης αποτελεί η απόσπαση, δηλαδή η ρήξη και απομάκρυνση από το σώμα της τραυματικής επιφάνειας, με αποτέλεσμα να δημιουργηθεί έλλειψη ιστού στην περιοχή της βλάβης.

Ο μηχανισμός των διασχίσεων του δέρματος συνίσταται στην σύνθλιψη και υπερδιάταση του δέρματος και των υποδερμάτιων ιστών, ανάμεσα σε μια δύναμη που εφαρμόζεται εξωτερικά και σε μια σταθερή υποκείμενη οστέινη επιφάνεια. Το δέρμα ραγίζει σε όλο του το πάχος, όταν η δύναμη που ασκείται πάνω του υπερβαίνει τα όρια ελαστικότητάς του. Όταν η ρήξη του δέρματος προκαλείται από ένα οξύ αιχμηρό όργανο, χαρακτηρίζεται από χείλη ομαλά, χωρίς εκχυμώσεις και εκδορές και με διατομή ομοιογενή όλων των γεφυροποιών αγγείων και νεύρων. (Μιχαλοδημητράκης Ε. 1997, Αγιουτάντης Γ. 1980).

Οι διασχίσεις των παρεγχυματωδών οργάνων, είναι συνήθως αποτέλεσμα δυνάμεων που δρουν απότομα και συνθλιπτικά στα όργανα αυτά, τα οποία δεν έχουν ελαστικότητα (ήπαρ, σπλήνας κλπ).

4. Σκελετικές κακώσεις

Οι κακώσεις των οστών δεν είναι ικανές αφεαυτές να προκαλέσουν το θάνατο. Υποδηλώνουν όμως το μέγεθος της δύναμης που ασκήθηκε σε μια περιοχή και η

οποία μπορεί να μεταφέρθηκε σε άλλα ευαίσθητα όργανα (εγκέφαλος πνεύμονες κλπ.).

5. Θλαστικές κακώσεις των σπλάχνων

Οι θλαστικές κακώσεις των σπλάχνων περιλαμβάνουν ποικιλία βλαβών όπως ρήξεις, διασχίσεις, πολτοποιήσεις κλπ, με κοινό στοιχείο την εσωτερική αιμορραγία, που συχνά είναι θανατηφόρα.

Κακώσεις των θωρακικών σπλάχνων.

Στις θλάσεις του θωρακικού τοιχώματος, συνηθισμένα ευρήματα είναι τα κατάγματα των πλευρών και της σπονδυλικής στήλης. Αυτά με τη σειρά τους, μπορεί να προκαλέσουν ρήξη των πνευμόνων, διασχίσεις, αποσπάσεις και συνθλίψεις του πνευμονικού ιστού, ρήξη των αγγείων του πνεύμονα, αιμοθώρακα, πνευμοθώρακα και υποδόριο εμφύσημα, που ορισμένες φορές φτάνει μέχρι την περιοχή του τραχήλου και του λαιμού.

Οι θλαστικές κακώσεις της περιοχής του λαιμού, μπορεί να οδηγήσουν στον τραυματισμό του λάρυγγα και της τραχείας, με κάταγμα των χόνδρων και διάσχιση του βλεννογόνου, τα οποία μπορούν να οδηγήσουν γρήγορα σε ασφυκτικό θάνατο τόσο από το οίδημα που τοπικά αναπτύσσεται, όσο και από την εισρόφηση αίματος.

Οι θλαστικές κακώσεις της περιοχής του τραχήλου, μπορεί να προκαλέσουν εκδορές, εκχυμώσεις διασχίσεις και ρήξεις των μυϊκών ινών στα μαλακά μόρια, όπως επίσης κατάγματα σπονδύλων και κακοποίηση του νωτιαίου μυελού στη σπονδυλική στήλη.

Οι θλαστικές κακώσεις των μορίων της σπονδυλικής στήλης, μπορεί να προκαλέσουν στα μαλακά μόρια αιμορραγικές διηθήσεις και ρήξεις μυϊκών ινών και στα συμπαγή μόρια, κατάγματα σπονδύλων και τρώση του νωτιαίου μυελού.

Οι θλαστικές κακώσεις της καρδιάς, περιλαμβάνουν από εκχυμώσεις και διασχίσεις του μυοκαρδίου, μέχρι ρήξεις της καρδιάς και διασχίσεις των καρδιακών βαλβίδων, ρήξεις του περικαρδίου και αιμορραγίες του μεσοθωρακίου.

Οι θλαστικές κακώσεις των μεγάλων αγγείων, αφορούν κύρια την αορτή, η οποία υφίσταται διασχίσεις των χιτώνων και του τοιχώματός της μέχρι και πλήρη ρήξη. (Μιχαλοδημητράκης Ε. 1997, Αγιουτάντης Γ. 1980, Ηλιάκης Κ. 1964).

Κακώσεις των κοιλιακών σπλάχνων.

Οι θλαστικές κακώσεις που συνήθως δημιουργούνται για μεν τα συμπαγή όργανα (ήπαρ, σπλήνας, νεφροί) είναι εκχυμώσεις ή διασχίσεις, για δε τα κοίλα όργανα (καθλωμένα όργανα του γαστρεντερικού σωλήνα και ουροδόχος κύστης) ρήξεις.

2. ΑΝΑΤΟΜΙΚΑ ΚΑΙ ΣΩΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.

2.1 ΑΝΑΤΟΜΙΚΑ ΚΑΙ ΣΩΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΣΚΥΛΩΝ (ΣΚΥΛΟΙ – ΔΡΑΣΤΕΣ).

2.1.1. Οδοντικός τύπος του σκύλου.

Όπως είναι γνωστό, η μορφολογία των δοντιών βρίσκεται σε στενή σχέση με το είδος των ζώων, καθώς και τις διατροφικές τους συνήθειες. Γιαυτό το λόγο η μορφή τους ποικίλλει στα διάφορα είδη των θηλαστικών, όπου απαντιούνται 2 γενιές δοντιών, οι νεογιλοί (dentes decidui) και οι μόνιμοι (dentes permanentes). (EIK.17)

Τα δόντια, ανάλογα με την μορφή και την λειτουργία τους διακρίνονται σε τομείς, κυνόδοντες, προγόμφιους και γομφίους. (Emily P.P et al 1993, Ettinger S.J 1995, Μιχαήλ Σ. 1975). Παρακάτω θα αναφερθούν στοιχεία από τον οδοντικό τύπο των σκύλων.

Οι τομείς (dentes incisivi), έχουν τρίλοβη μύλη και το μέγεθός τους αυξάνει από τους μέσους προς τους ακραίους. Οι νεογιλοί τομείς ανατέλλουν από την 25^η έως την 30^η ημέρα της ζωής των σκύλων, ενώ οι μόνιμοι εμφανίζονται από τον 4^ο έως τον 5^ο μήνα.

Οι κυνόδοντες (dentes canini), έχουν μύλη με μια κορυφή, είναι πολύ καλά ανεπτυγμένοι τόσο στους νεογιλούς, όσο και στους μόνιμους και βρίσκονται κοντά τόσο στους ακραίους τομείς, όσο και στους πρώτους προγόμφιους. Οι νεογιλοί κυνόδοντες ανατέλλουν την 21^η περίπου ημέρα, ενώ οι μόνιμοι τον 5^ο μήνα της ζωής των σκύλων. (Harvey C. E., 1993).

Οι προγόμφιοι (dentes premolares) αυξάνουν σε μέγεθος από τον πρώτο στον τέταρτο, ενώ παρουσιάζονται σαφώς μεγαλύτεροι στην άνω από ότι στην κάτω γνάθο. Ο τέταρτος προγόμφιος της άνω γνάθου, συνιστά και το μεγαλύτερο δόντι της. Έχει δίλοβη μύλη, τρισχιδή ρίζα, και η μύλη του έρχεται σε επαφή με την αντίστοιχη του πρώτου γομφίου της κάτω γνάθου. Οι κορυφές των δυο τελευταίων προγομφίων είναι αμβλείς, ενώ των δυο πρώτων οξύτερες.

Οι γομφίοι (dentes molares) μειώνονται σε μέγεθος από τους πρώτους προς τους τελευταίους. Στην κάτω γνάθο παρουσιάζονται περισσότεροι (3 ζεύγη) από τους αντίστοιχους της άνω γνάθου (2 ζεύγη) και σαφώς μεγαλύτεροι. Μάλιστα, ο πρώτος γομφίος της κάτω γνάθου, με την τρίλοβη μύλη του, συνιστά το μεγαλύτερο σε όγκο δόντι της. Οι μόνιμοι γομφίοι ανατέλλουν το διάστημα μεταξύ 5^{ου} και 6^{ου} μήνα.

Νεογιλοί.

Τομείς : $2 \times 3/3 = 12$.

Κυνόδοντες : $2 \times 1/1 = 4$.

Προγόμφιοι : $2 \times 3/3 = 12$.

Γομφίοι : **0**.

Σύνολο νεογιλών δοντιών του σκύλου = **28**.

Μόνιμοι.

Τομείς : $2 \times 3/3 = 12$.

Κυνόδοντες : $2 \times 1/1 = 4$.

Προγόμφιοι : $2 \times 4/4 = 16$.

Γομφίοι : $2 \times 2/3 = 10$

Σύνολο μονίμων δοντιών του σκύλου = 42

ΠΙΝΑΚΑΣ 1 : Οδοντικός τύπος του σκύλου.

	ΤΟΜΕΙΣ	ΚΥΝΟΔΟΝΤΕΣ	ΠΡΟΓΟΜΦΙΟΙ	ΓΟΜΦΙΟΙ	ΣΥΝΟΛΟ
ΝΕΟΓΙΛΟΙ	12	4	12	0	28
ΜΟΝΙΜΟΙ	12	4	16	10	42

2.1.2 Ύψος των δοντιών των σκύλων.

Σαν ύψος των δοντιών θεωρείται, η απόσταση μεταξύ του υψηλότερου σημείου της μασητικής τους επιφάνειας και του σημείου εισόδου των δοντιών στα ούλα. Το ύψος των δοντιών των σκύλων, όπως άλλωστε και όλα τα σωματομετρικά τους χαρακτηριστικά, διαφέρουν ανάλογα με την φυλή στην οποία ανήκουν. Οι σκύλοι που προκάλεσαν τις δηκτικές κακώσεις, διαχωρίστηκαν σε 2 ομάδες, την ομάδα των μεγαλόσωμων και την ομάδα των μικρόσωμων σκύλων, των οποίων τα σωματομετρικά χαρακτηριστικά αναφέρονται αναλυτικά στο κεφάλαιο «3.3». Αυτός ακριβώς ο διαχωρισμός ακολουθήθηκε και στην περίπτωση του υπολογισμού του ύψους των δοντιών.

2.1.3 Αποστάσεις μεταξύ των δοντιών των σκύλων.

Σαν αποστάσεις μεταξύ των δοντιών θεωρήθηκαν οι αποστάσεις μεταξύ των υψηλότερων σημείων (κορυφών) της μασητικής τους επιφάνειας. Στη φυσιολογική σύγκλειση των γνάθων των σκύλων, οι κυνόδοντες της κάτω γνάθου συγκλείουν πιο μπροστά από τους αντίστοιχους της άνω γνάθου. Το γεγονός αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη μετατόπιση των υπολοίπων δοντιών της κάτω γνάθου (προγομφίων και γομφίων) προς τα εμπρός και βοηθά την τοποθέτηση και τρίτου ζεύγους γομφίων στην κάτω γνάθο. Έτσι ο τέταρτος προγόμφιος που συνιστά το μεγαλύτερο δόντι της άνω γνάθου, αντιστοιχεί με τον πρώτο γομφίο της κάτω γνάθου, που συνιστά και το μεγαλύτερο δόντι της.

2.1.4 Φυλές των σκύλων που κατά κύριο λόγο προκάλεσαν δηκτικές τραυματικές κακώσεις.

Η ζωολογική ταξινόμηση των σκύλων είναι η παρακάτω: Φύλο Chordata, Υποφύλο Gnathostomata, Κλάση Mamalia, Τάξη Carnivora, Οικογένεια Canidae, Γένος Canis, Είδος Canis familiaris.

Η ποικιλομορφία που παρουσιάζει το είδος Canis familiaris είναι τεράστια. Θεωρείται ότι είναι η μεγαλύτερη από όλα τα κατοικίδια θηλαστικά. Σήμερα, σε παγκόσμιο επίπεδο, έχουν δημιουργηθεί πάρα πολλές φυλές σκύλων, με τεράστιες σωματομετρικές διαφορές. Πολλές από τις φυλές αυτές υπάρχουν και στην Ελλάδα. Έχουν γίνει κατά καιρούς πολλές ταξινομήσεις στις φυλές των σκύλων, χρησιμοποιώντας σαν κριτήρια άλλοτε τα σωματομετρικά χαρακτηριστικά, άλλοτε την παραγωγική τους κατεύθυνση, τη γενεαλογική τους προέλευση κλπ. (Pugnetti G. 1990, Presutti R.J 2001, Gershman K.A. et al 1994, Wright J.C 1985). Στη συγκεκριμένη εργασία, η ταξινόμηση των σκύλων δραστών έγινε με κριτήριο τα σωματομετρικά τους χαρακτηριστικά. Έτσι χωρίστηκαν σε 2 ομάδες, την ομάδα των μεγαλόσωμων και την ομάδα των μικρόσωμων σκύλων. Σε κάθε ομάδα εντάχθηκαν φυλές των σκύλων που αποδεδειγμένα είχαν προκαλέσει δηκτικές τραυματικές κακώσεις, συνελήφθηκαν επαυτοφώρω και αναφέρονται αμέσως παρακάτω.

Σκύλοι μεγαλόσωμων φυλών . (Βάρος > 25 κιλών, Ύψος >50 εκ.).

1. Γερμανικοί ποιμενικοί (Λυκόσκυλα). German shepherd.

Ύψος καθαρόαιμων : Αρσενικών 60-65 εκ. Θηλυκών 55-60 εκ.

Βάρος καθαρόαιμων : 35-40 κιλά.

Χρήση φυλής : Ποιμενικός, φύλακας.

2. Βελγικοί ποιμενικοί (Βελγικά λυκόσκυλα). Belgian shepherd.

Ύψος καθαρόαιμων : Αρσενικών 60 εκ. Θηλυκών 55 εκ.

Βάρος καθαρόαιμων : 30 κιλά.

Χρήση φυλής : Ποιμενικός, φύλακας.

3. Λοιποί μεγαλόσωμοι σκύλοι.

Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται μεγαλόσωμοι σκύλοι διάφορων φυλών όπως Κόλτσι, Μπόξερ, Ροντβάιλερ, Χάσκυ, κλπ, κύρια ημίαιμοι, αλλά και σε ορισμένες περιπτώσεις καθαρόαιμα, τουλάχιστον φαινοτυπικά.

Ύψος : Αρσενικών 60-65 εκ. Θηλυκών 50-60 εκ.

Βάρος : 25-40 κιλά.

Χρήση φυλής : Ποιμενικοί, φύλακες, ζώα συντροφιάς.

Σκύλοι μικρόσωμων φυλών . (Βάρος < 25 κιλών, Ύψος <50 εκ.).

1. Κυνηγετικοί σκύλοι.

Στην κατηγορία αυτή, περιλαμβάνονται σκύλοι κυνηγετικών φυλών, που συνελήφθησαν ενώ προκαλούσαν ζημιές, ανεξάρτητα αν χρησιμοποιούνταν για κυνήγι, από τους ιδιοκτήτες τους.

Ύψος : Αρσενικών 45-52 εκ. Θηλυκών 40-50 εκ.

Βάρος : 17-25 κιλά.

Χρήση φυλής : Κυνηγόσκυλα.

2. Λοιπά μικρόσωμα σκυλιά.

Ύψος : Αρσενικών 25-45 εκ. Θηλυκών 20-40 εκ.

Βάρος : 10-25 κιλά.

Χρήση φυλής : Διάφορες χρήσεις.

2.2 ΑΝΑΤΟΜΙΚΑ ΚΑΙ ΣΩΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΑΙΓΟΠΡΟΒΑΤΩΝ (ΖΩΑ –ΘΥΜΑΤΑ).

Τα πρόβατα που εκτρέφονται σήμερα σε παγκόσμιο επίπεδο ανήκουν στο υποείδος *Ovis ammon aries*. Συγκεκριμένα, η ταξινόμησή τους κατά τον Crzimerk είναι η παρακάτω: Φύλο Chordata, Υποφύλο Gnathostomata, Κλάση Mamalia, Τάξη Artiodactyla, Υποτάξη Ruminantia, Οικογένεια Bovidae, Γένος *Ovis*, Είδος *Ovis ammon*, Υποείδος *Ovis ammon aries*.

Τα πρόβατα που εκτρέφονται στην Κρήτη και κατά συνέπεια απασχόλησαν την εργασία αυτή, χωρίστηκαν βάσει των σωματομετρικών τους χαρακτηριστικών σε δύο κατηγορίες, οι οποίες αναφέρονται αμέσως παρακάτω:

2.2.1 Μικρόσωμα Εγχώρια πρόβατα. (Σωματικό Βάρος ενηλίκων <50 κιλών, Ύψος 50-70 εκατοστών).

Ανήκουν στον Ορεινό τύπο των Λεπτόουρων αναμικτόμαλλων προβάτων. Είναι πρόβατα που προέρχονται από διασταυρώσεις, διάφορου βαθμού και χωρίς συγκεκριμένο γενετικό σχήμα, των εγχώριων φυλών της Κρήτης, όπως των Σφακίων, των Αστερουσίων, του Ψηλορείτη και της Σητείας. (Ζωιόπουλος Π 2000, Χατζημηνάογλου Ι. 1999, Κατσαούνης Ν. 1980).

Το σωματικό βάρος των ενηλίκων ανέρχεται σε :

Για τα αρσενικά σε 40-50 κιλά.

Για τα θηλυκά σε 30-45 κιλά.

Το ύψος ακρωμίου των ενηλίκων ανέρχεται σε :

Για τα αρσενικά σε 55-70 εκ.

Για τα θηλυκά σε 50-65 εκ.

Ο μέσος όρος του ύψους κατά τη γέννηση σε 25-35 εκ

Ο μέσος όρος του ύψους σε ηλικία 30-45 ημερών σε 35-45 εκ.

Ακρώμιο στην ζωοτεχνία ονομάζεται, η θέση που προσδιορίζεται ανατομικά, από τις ακανθώδεις αποφύσεις των πρώτων θωρακικών σπονδύλων, τους ωμοπλαιοειδείς χόνδρους και τους μεταξύ των χόνδρων και αποφύσεων μύες και συνδέσμους που υπάρχουν. (Κατσαούνης Ν. 1980).

2.2.2. Μεγαλόσωμα Εγχώρια πρόβατα. (Σωματικό Βάρος ενηλίκων >50 κιλών, Ύψος 70-85 εκατοστών).

Προέρχονται από διασταυρώσεις διάφορου βαθμού, των εγχώριων φυλών της Κρήτης, με μεγαλόσωμες Ελληνικές φυλές (Χίου, διασταύρωση Άρτας κλπ) ή ξένες φυλές (κύρια Φρισιλανδίας και σε ορισμένες περιοχές Γαλλίας-Λακούν). Εκτρέφονται σε ημιορεινές (λοφώδεις) και πεδινές περιοχές. Παρά το γεγονός ότι στην Κρήτη υπάρχουν κάποιες εκτροφές καθαρόαιμων μεγαλόσωμων προβάτων (κύρια φυλών του εξωτερικού), τα σωματομετρικά τους χαρακτηριστικά ήταν παρόμοια με της κατηγορίας «Μεγαλόσωμα Εγχώρια πρόβατα» και έτσι περιλήφθηκαν στην κατηγορία αυτή. (Ζωιόπουλος Π 2000, Χατζημηνάογλου Ι. 1999, Κατσαούνης Ν. 1980).

Το σωματικό βάρος των ενηλίκων ανέρχεται σε :

Για τα αρσενικά σε 50-70 κιλά.

Για τα θηλυκά σε 50-65 κιλά.

Το ύψος ακρωμίου ανέρχεται σε :

Για τα αρσενικά σε 70- 85 εκ.

Για τα θηλυκά σε 65-75 εκ.

Ο μέσος όρος του ύψους κατά τη γέννηση σε 35-40 εκ.

Ο μέσος όρος του ύψους σε ηλικία 30-45 ημερών σε 40-50 εκ.

Η ζωολογική ταξινόμηση των αιγοειδών κατά τον Crzimerk είναι η παρακάτω:
Φύλο Chordata, Υποφύλο Gnathostomata, Κλάση Mamalia, Τάξη Artiodactyla, Υποτάξη Ruminantia, Οικογένεια Bovidae, Γένος Capra, Είδος C. Hircus.

Τα αιγοειδή που εκτρέφονται στην Κρήτη και μας απασχόλησαν στην εργασία αυτή, χωρίστηκαν όπως και τα προβατοειδή, βάσει των σωματομετρικών τους χαρακτηριστικών σε δύο κατηγορίες, οι οποίες αναφέρονται αμέσως παρακάτω:

2.2.3 Μικρόσωμα Εγχώρια αιγοειδή. (Σωματικό Βάρος ενηλίκων <50 κιλών, Ύψος 50-70 εκατοστών).

Είναι ζώα που προέρχονται από διασταυρώσεις, διάφορου βαθμού και χωρίς συγκεκριμένο γενετικό σχήμα, των εγχώριων αιγών της Κρήτης, οι οποίες αντίθετα με τα πρόβατα, δεν συγκροτούν κάποια τοπική φυλή . Παρατηρείται μεγαλύτερο

εύρος στις τιμές του βάρους και του ύψους των μικρόσωμων αιγοειδών από τις αντίστοιχες των προβατοειδών. Τα μικρόσωμα εγχώρια αιγοειδή εκτρέφονται εκτατικά (ελεύθερα) στους ορεινούς όγκους και μόνο τους χειμερινούς μήνες εκτρέφονται ημιεκτατικά, με την κατασκευή στεγάστρων συγκέντρωσης των ζώων. (Ζωιόπουλος Π. 2000, Ζυγογιάννης και συν. 1994).

Το σωματικό βάρος των ενηλίκων ανέρχεται σε :

Για τα αρσενικά σε 40-50 κιλά.

Για τα θηλυκά σε 25-45 κιλά.

Το ύψος ακρωμίου των ενηλίκων ανέρχεται σε :

Για τα αρσενικά σε 55-70 εκ.

Για τα θηλυκά σε 50-65 εκ.

Ο μέσος όρος του ύψους κατά τη γέννηση σε 25-35 εκ

Ο μέσος όρος του ύψους σε ηλικία 30-45 ημερών σε 35-45 εκ.

2.2.4 Μεγαλόσωμα Εγχώρια αιγοειδή. (Σωματικό Βάρος ενηλίκων >45 κιλών, Ύψος 70-85 εκατοστών).

Προέρχονται από διασταυρώσεις διάφορου βαθμού, των εγχώριων αιγών της Κρήτης, με μεγαλόσωμες Ελληνικές αίγες ή ξένες φυλές αιγοειδών (κύρια Ζάνεν και Αλπίνες). Εκτρέφονται ημιενσταυλισμένες σε ημιορεινές (λοφώδεις) περιοχές. Στην Κρήτη βέβαια, υπάρχουν ορισμένες εκτροφές ενσταυλισμένων αιγών (κύρια φυλής Αλπίν), οι οποίες όμως δεν μας απασχόλησαν καθόλου. (Ζωιόπουλος Π. 2000, Ζυγογιάννης και συν. 1994).

Το σωματικό βάρος των ενηλίκων ανέρχεται σε :

Για τα αρσενικά σε 50-70 κιλά.

Για τα θηλυκά σε 50-60 κιλά.

Το ύψος ακρωμίου ανέρχεται σε :

Για τα αρσενικά σε 70- 85 εκ.

Για τα θηλυκά σε 65-75 εκ.

Ο μέσος όρος του ύψους κατά τη γέννηση σε 35-40 εκ.

Ο μέσος όρος του ύψους σε ηλικία 30-45 ημερών σε 40-50 εκ.

3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ ΤΩΝ ΔΗΚΤΙΚΩΝ ΚΑΚΩΣΕΩΝ.

3.1 ΥΛΙΚΑ.

Τα υλικά της εργασίας αυτής, προερχόταν από «ζώα θύματα», που είχαν υποστεί δηκτικές κακώσεις από σκύλους. Οι ζημιές που προκαλούντο στα «ζώα θύματα» αναγγέλλονταν από τους κτηνοτρόφους, στο υποκατάστημα Κρήτης του Οργανισμού Ελληνικών Γεωργικών Ασφαλίσεων (ΕΛΓΑ), που εδρεύει στο Ηράκλειο. Πρέπει να σημειωθεί ότι ο ΕΛΓΑ, σύμφωνα με τον ιδρυτικό του νόμο 1790 \ 1988 καλύπτει ασφαλιστικά και αποζημιώνει μεταξύ των άλλων και τις ζημιές στο ζωικό

κεφάλαιο των κτηνοτρόφων, από άγρια ζώα, (λύκους, αρκούδες κλπ), συμπεριλαμβανομένων και των αδέσποτων σκυλιών. Οι αναγγελίες, όπως προβλέπεται από την αντίστοιχη νομοθεσία, γινόταν αμέσως μετά την επέλευση του ζημιογόνου αιτίου και οι πραγματογνωμοσύνες από μέρους του ΕΛΓΑ πραγματοποιούταν αυθημερόν. Επίσης, μεταξύ των συμβατικών υποχρεώσεων του κτηνίατρου-πραγματογνώμονα, ήταν η σύσταση θεραπευτικής αγωγής και η παρακολούθηση των τραυματισμένων «ζώων θυμάτων», τουλάχιστον για 8 ημέρες. Στις περισσότερες όμως περιπτώσεις, η παρακολούθηση και ιατρική φροντίδα των τραυματισμένων ζώων, γινόταν για πολύ μεγαλύτερο διάστημα, προκειμένου να διαπιστωθεί η εξέλιξη και η τελική τους απόληξη (ίση, αναπηρία, θάνατος).

3.1.1 Αριθμός και είδος των εξετασθέντων ζώων.

Συνολικά εξετάστηκαν **3.992 παραγωγικά ζώα**, το είδος και ο αριθμός των οποίων αναφέρεται στον πίνακα 2. Όλα τα εξετασθέντα ζώα είχαν υποστεί δηκτικές κακώσεις, οι οποίες είχαν επιφέρει θάνατο ή διάφορου βαθμού τραυματισμό (βαρύ ή ελαφρότερο). Στα ελαφρότερα τραυματισμένα ζώα, εφαρμόστηκε θεραπευτική αγωγή.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Αριθμός και είδος των εξετασθέντων ζώων με δηκτικές τραυματικές κακώσεις.

ΕΙΔΟΣ	ΝΕΚΡΑ ΖΩΑ	ΒΑΡΕΙΑ ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΕΝΑ	ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΕΝΑ-ΘΕΡΑΠΕΙΑ	ΣΥΝΟΛΟ
ΑΙΓΟΕΙΔΗ	445	53	93	591
ΠΡΟΒΑΤΟΕΙΔΗ	2515	369	322	3206
ΚΟΥΝΕΛΙΑ	47	0	0	47
ΟΡΝΙΘΕΣ	148	0	0	148
ΣΥΝΟΛΟ	3.155	422	415	3.992

3.1.2 Ηλικία των εξετασθέντων ζώων.

Η ηλικία των ζώων που είχαν υποστεί δηκτικές τραυματικές κακώσεις και εξετάστηκαν από εμάς, αναφέρεται σε αντιστοιχία με το είδος των ζώων, στον παρακάτω πίνακα. Τα πρόβατα και οι αίγες, που αποτελούν και το μεγαλύτερο ποσοστό των εξετασθέντων ζώων, χωρίστηκαν ανάλογα με την ηλικία τους σε τέσσερις κατηγορίες. Η πρώτη περιλαμβάνει αιγοπρόβατα ηλικίας μέχρι 3^{ωv} μηνών (αμνοερίφια), η δεύτερη 3^{ωv} έως 12 μηνών (πτώση των 2 μέσων νεογιλών τομέων

οδόντων και έναρξη ανατολής των αντιστοίχων μονίμων), η τρίτη 1^{ος} έως 4^{ωv} ετών ενώ η τέταρτη περιλαμβάνει τα υπόλοιπα αιγοπρόβατα 4^{ωv} έως 6 ετών .

ΠΙΝΑΚΑΣ 3. Ηλικία των εξετασθέντων ζώων.

ΕΙΔΟΣ	ΣΥΝΟΛΟ
ΑΙΓΕΣ ΗΛΙΚΙΑΣ 1-4 ΕΤΩΝ	200
ΑΙΓΕΣ ΗΛΙΚΙΑΣ 4-6 ΕΤΩΝ	209
ΕΡΙΦΙΑ ΗΛΙΚΙΑΣ ΕΩΣ 3 ΜΗΝΩΝ	108
ΕΡΙΦΙΑ ΗΛΙΚΙΑΣ 3-12 ΜΗΝΩΝ	74
ΠΡΟΒΑΤΑ ΗΛΙΚΙΑΣ 1-4 ΕΤΩΝ	985
ΠΡΟΒΑΤΑ ΗΛΙΚΙΑΣ 4-6 ΕΤΩΝ	1285
ΑΡΝΙΑ ΗΛΙΚΙΑΣ ΕΩΣ 3 ΜΗΝΩΝ	652
ΑΡΝΙΑ ΗΛΙΚΙΑΣ 3-12 ΜΗΝΩΝ	284
ΚΟΥΝΕΛΙΑ ΗΛΙΚΙΑΣ 1-24 ΜΗΝΩΝ	47
ΟΡΝΙΘΕΣ ΗΛΙΚΙΑΣ 2-6 ΜΗΝΩΝ	148

3.1.3 Είδος των εξετασθέντων ζώων ανά έτος (από 1996 έως 2000).

Το είδος των εξετασθέντων ζώων (αιγοειδή, προβατοειδή, όρνια και κουνέλια), ανά έτος (από το 1996 έως το 2000), αναφέρεται στον πίνακα 4 που ακολουθεί. Στον πίνακα αυτό έγινε διαχωρισμός των εξετασθέντων ζώων σε νεκρά, βαριά τραυματισμένα και τραυματισμένα ελαφρότερα ζώα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4 : Συγκεντρωτικός πίνακας εξετασθέντων ζώων ανά είδος, για τα έτη 1996, 1997, 1998, 1999, 2000.

ΕΤΗ	ΑΙΓΟΕΙΔΗ				ΠΡΟΒΑΤΟΕΙΔΗ				ΛΟΙΠΑ ΕΙΔΗ ΖΩΩΝ		ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΕΝΑ	
	ΑΙΓΕΣ>1 έτ.		ΕΡΙΦΙΑ<1 έτ.		ΠΡΟΒΑΤΑ>1έτ.		ΑΡΝΙΑ<1 έτ.		N. Z		ΠΡ.	ΑΙΓ.
	NZ	BT	NZ	BT	NZ	BT	NZ	BT	ΚΟΥ.	ΟΡ.		
1996	51	17	77	5	254	45	123	5	0	0	21	11
1997	48	11	25	2	368	72	164	25	0	57	47	16
1998	110	18	32	0	449	63	208	24	47	28	115	39
1999	36	0	0	0	323	55	156	13	0	0	76	15
2000	28	0	38	0	288	56	182	11	0	63	63	12
ΣΥΝ	273	46	172	7	1682	291	833	78	47	148	322	93

ΕΤΗ 1996, 1997, 1998, 1999, 2000.

(Ν.Ζ.) αριθμός Νεκρών Ζώων.

(Β.Τ.), αριθμός Βαριά Τραυματισμένων ζώων τα οποία υπέκυψαν στα τραύματά τους.

Αριθμός τραυματισμένων ζώων στα οποία συστήθηκε θεραπευτική αγωγή.

3.2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.

Όλη η διαδικασία της πραγματογνωμοσύνης διενεργούταν στον χώρο του συμβάντος, στον χώρο δηλαδή όπου τα «ζώα-θύματα», είχαν υποστεί της δηκτικές κακώσεις από τα σκυλιά ή όπως τα ονομάζουμε «ζώα- δράστες». Ο τρόπος εξέτασης των δηκτικών κακώσεων περιλάμβανε τα παρακάτω στάδια.

3.2.1 Λήψη ιστορικού.

Λαμβανόταν λεπτομερές ιστορικό, με ιδιαίτερη έμφαση στα παρακάτω σημεία:

- Στην ημερομηνία επέλευσης της ζημιάς.
- Στο χρονικό διάστημα επίδρασης του ζημιογόνου αιτίου στα «ζώα θύματα».
- Στον αριθμό το είδος και την ηλικία των ζημιωμένων ζώων.
- Στις ενέργειες που έχουν γίνει από τον παραγωγό μέχρι τη στιγμή της πραγματογνωμοσύνης.(Συλλογή διασκορπισμένων πτωμάτων, θεραπευτικές παρεμβάσεις στα τραυματισμένα ζώα κ.λ.π).

3.2.2 Εξέταση του χώρου του συμβάντος (Αυτοψία).

Εξεταζόταν λεπτομερειακά ο χώρος στον οποίο βρισκόταν τα «ζώα θύματα», και συλλεγόταν όλα τα ευρήματα που θα μπορούσαν να υποβοηθήσουν την πραγματογνωμοσύνη. Ο χώρος του συμβάντος ορισμένες φορές ταυτιζόταν με κάποιο σημείο των κτιριακών εγκαταστάσεων της κτηνοτροφικής εκμετάλλευσης, (σε εκτροφές εντατικής μορφής) ή βρισκόταν στην περιοχή βόσκησης των ζώων (σε εκτροφές εκτατικής μορφής).

3.2.3 Εξέταση των «ζώων θυμάτων».

Αποτέλεσε αναμφισβήτητο το κεντρικό σημείο της πραγματογνωμοσύνης και απαιτούσε, εκτός από εξειδικευμένη γνώση και μεγάλη εμπειρία από τον πραγματογνώμονα. Βασικά στοιχεία της εξέτασης των «ζώων θυμάτων» αποτελούν η νεκροψία και η νεκροτομή για τα νεκρά ζώα και η κλινική εξέταση για τα τραυματισμένα ζωντανά ζώα. Οι παραπάνω διαδικασίες επικουρούνται από τις εργαστηριακές εξετάσεις, όπου και όταν αυτές είναι εφικτές.

Τα «ζώα θύματα», χωριζόταν σε **2 ομάδες**, στην **1^η ομάδα ή ομάδα των νεκρών ζώων** και στην **2^η ομάδα ή ομάδα των τραυματισμένων ζώων**.

3.2.3.1 Ομάδα των νεκρών ζώων ή 1^η ομάδα.

Η ομάδα αυτή περιλάμβανε, αριθμό πληγέντων ζώων μεγαλύτερο από την 2^η ομάδα στο 93% των περιπτώσεων. Τα ζώα της ομάδας αυτής ήταν όλα νεκρά. Ο τρόπος εξέτασης των ζώων της 1^{ης} ομάδας, για την συλλογή των στοιχείων που αφορούν και ενδιαφέρουν τη μελέτη μας, γινόταν όπως είναι προφανές με την διαδικασία της νεκροψίας και της νεκροτομής. Η νεκροψία και η νεκροτομή εφαρμοζόταν πάντοτε με ενιαίο μεθοδολογικά τρόπο, για να έχουμε αποτελέσματα από τα οποία να είναι δυνατόν να προκύψουν συγκρίσεις, συσχετισμοί και στατιστικά στοιχεία.

Η νεκροψία.

Συνίσταται στην εξωτερική εξέταση του πτώματος. Στα ζώα πραγματοποιείται κύρια με επισκόπηση και ψηλάφηση. Αποσκοπεί στην ανεύρεση και εξακρίβωση από το πτώμα στοιχείων όπως:

- Είδος, φυλή, φύλλο, ηλικία και σωματική διάπλαση του νεκρού ζώου.
- Έλεγχος των μεταθανάτιων αλλοιώσεων του πτώματος και συμπεράσματα από αυτόν.
- Ανεύρεση και καταγραφή τυχόν τραυματικών, θλαστικών ή οποιασδήποτε φύσης κακώσεων, όπως επίσης και τυχόν δυσπλασιών, δυσμορφιών και άλλων ανωμαλιών του πτώματος.

Πραγματοποιείται, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, με συστηματική παρατήρηση των ανατομικών μορίων του πτώματος, με κατεύθυνση από την περιοχή της κεφαλής προς τα οπίσθια τμήματα του σώματος, χωρίς να μετακινηθεί το πτώμα του ζώου. Στη συνέχεια το πτώμα περιστρέφεται, ώστε να γίνει ορατή η πλευρά που βρισκόταν σε επαφή με το έδαφος. Η σημασία της νεκροψίας στην εξέταση του πτώματος είναι μεγάλη. Υποστηρίζεται χωρίς υπερβολή ότι στα περιστατικά ιατροδικαστικής τραυματολογίας, η αξία της είναι μεγαλύτερη από αυτή της νεκροτομής. (Μιχαλοδημητράκης Ε. 1997, Τσαγκάρης Θ. 1997, Ψαρουδάκης και συν. 1999, King 1989).

Η νεκροτομή.

Συνίσταται στην συστηματική διάνοιξη και παρατήρηση του πτώματος του ζώου. Αποσκοπεί στην ανεύρεση και καταγραφή όλων των παθολογοανατομικών αλλοιώσεων, που υπάρχουν στο πτώμα. Τόσον η νεκροψία όσον και η νεκροτομή, οφείλουν να ακολουθούν συστηματική πορεία, ώστε να αποφεύγονται λάθη και παραλήψεις. Ειδικά στην διερεύνηση των δηκτικών τραυματικών κακώσεων των ζώων, κρίθηκε απαραίτητη και εφαρμόστηκε, σαν πρώτο βήμα της νεκροτομής, η εκδορά του νεκρού ζώου, αμέσως μετά την διαδικασία της νεκροψίας. (Τσαγκάρης Θ. 1997, Ψαρουδάκης και συν. 1999, King 1989).. Στη συνέχεια προχωρούσαμε στη

διάνοιξη του πτώματος και στη συστηματική εξέταση των οργανικών συστημάτων, ώστε να γίνουν ορατές και να αξιολογηθούν οι τραυματικές κακώσεις ή οι συνέπειες που είχαν στο νεκρό ζώο. (Μιχαλοδημητράκης Ε. 1997, King 1989, Lee K.A 1992). Αναλυτικά με την διαδικασία της νεκροψίας και της νεκροτομής στις δηκτικές τραυματικές κακώσεις, διερευνούσαν τα παρακάτω σημεία:

1. Το είδος και η ηλικία των νεκρών «ζώων θυμάτων» : Καταγραφόταν το είδος και την ηλικία των πληγέντων ζώων, νεκρών και βαριά τραυματισμένων (βλ. πίνακες 2, 3).

2. Ο αριθμός των νεκρών «ζώων θυμάτων» : Καταγραφόταν ο αριθμός των νεκρών και των βαριά τραυματισμένων από δηκτικές τραυματικές κακώσεις ζώων, μιας συγκεκριμένης αναγγελίας ζημιές (ενός συμβάντος) (βλ. πίνακα 2).

3. Σωματομετρικά χαρακτηριστικά των «ζώων θυμάτων» : Τα νεκρά ζώα, διαχωριζόταν ανάλογα με τα σωματομετρικά τους χαρακτηριστικά σε μικρόσωμα και μεγαλόσωμα.

4. Το φύλλο των «ζώων θυμάτων» : Αναζητήθηκε και καταγράφηκε το φύλλο των νεκρών ζώων. Η καταγραφή και ο διαχωρισμός αυτός έγινε, για να δούμε αν το φύλλο των ζημιωθέντων ζώων, διαδραματίζει κάποιο ρόλο τόσο στην πρόκληση δηκτικών τραυματικών κακώσεων, όσον και στην βαρύτητα αυτών.

5. Ο αριθμός των δηκτικών κακώσεων : Αναζητήθηκαν τόσο τα τραύματα που ήταν ορατά εξωτερικά με απλή επισκόπηση κατά την διαδικασία της νεκροψίας, όσο και αυτά που αποκαλύφθηκαν στην συνέχεια κατά την νεκροτομή. Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί ότι τόσο στα αιγοπροβατοειδή όσον και σε άλλα είδη ζώων με μεγάλη εριοκάλυψη ή \ και έγχρωμο δέρμα, ελάχιστα «κλειστά» τραύματα είναι ορατά με απλή επισκόπηση κατά την διάρκεια της νεκροψίας (ΕΙΚ.1,2) . Εξαιρούνται βέβαια τα «ανοικτά» τραύματα, στα οποία υπάρχουν αποσχίσεις ή απώλεια τμήματος τόσο του δέρματος όσο και των υποκείμενων ιστών. Τα τραύματα αυτά, παρά την εριοκάλυψη και το έγχρωμο του δέρματος, είναι ορατά κατά την επισκόπηση.

6. Οι θέσεις τραυμάτων των δηκτικών κακώσεων.

Εξετάστηκαν αρχικά οι θέσεις με την μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης των δηκτικών κακώσεων. Στην συνέχεια με την διαδικασία της νεκροτομής και την συστηματική διερεύνηση των οργανικών συστημάτων των «ζώων θυμάτων», καταγραφόταν όλες οι θέσεις των τραυματικών κακώσεων και οι συνέπειες που οι τελευταίες είχαν για την ζωή και την υγεία των ζώων. Στη συνέχεια οι θέσεις των κακώσεων ομαδοποιήθηκαν, όπως αναφέρεται αμέσως παρακάτω:

A. Περιοχή της κεφαλής.

Τόπος: Κυρίως στο προσωπικό κρανίο (Μύες: μετωπιαίος, δακρυϊκός, ανελκτήρας του άνω χείλους και της ρινός, μασητήρας, σφιγκτήρας του στόματος),

B. Περιοχή του τραχήλου και του λαιμού.

Τόπος: Λαιμός και τράχηλος (Μύες: αυχενική μοίρα του τραπεζοειδούς, βραχιονοκεφαλικός, ωμοτραχηλοκός, στερνοκεφαλικός).

Γ. Περιοχή του θώρακα.

Τόπος: Κύρια στη ραχιαία επιφάνεια του θώρακα (Μύες: πλατύς ραχιαίος, ραχιαία μοίρα του τραπεζοειδούς).

Δ. Περιοχή του κύτους της κοιλίας.

Τόπος: Κύρια στην περιοχή των κενεώνων και στη νεφρική χώρα (Μύες: έξω λοξός κοιλιακός, έσω λοξός κοιλιακός, τείνων την πλατεία περιτονία).

Ε. Περιοχή των γλουτών, των μηρών και του περινέου.

Τόπος: Κύρια στην περιοχή των μυών ημιτενοντώδους, ημιυμενώδους και δικέφαλου μηριαίου.

ΣΤ. Περιοχή των πρόσθιων άκρων.

Τόπος: Κύρια στην περιοχή των μυών τρικέφαλου βραχιόνιου, πρόσθιου βραχιόνιου, πρόσθιου εκτείνοντος τον καρπό εκτείνων τον έσω δάκτυλο και ωλένιο.

Ζ. Περιοχή των οπίσθιων άκρων.

Τόπος: Κύρια στην περιοχή των μυών που βρίσκονται μεταξύ της άρθρωσης του γόνατου και του ταρσού (γαστροκνήμιος, μακρός περνιαίος, εκτείνων τον έξω δάκτυλο, έξω καμπτήρας των δακτύλων).

7. Διαχωρισμός των προθανάτιων από τις μεταθανάτιες δηκτικές κακώσεις.

Με την διαδικασία της νεκροψίας - νεκροτομής, είναι δυνατός ο διαχωρισμός των προ από τις μεταθανάτιες δηκτικές κακώσεις, μελετώντας τα μακροσκοπικά χαρακτηριστικά αυτών. Βέβαια εκτός από τα μακροσκοπικά χαρακτηριστικά, υπάρχουν εργαστηριακές μέθοδοι για την διαφορική διάγνωση των προ από τις μεταθανάτιες κακώσεις. Οι μέθοδοι αυτές αναλύονται με λεπτομέρεια στα επόμενα κεφάλαια.

8. Η βαρύτητα των δηκτικών κακώσεων.

Διερευνούταν η βαρύτητα των δηκτικών κακώσεων, καθώς και η αιτιώδης συνάφεια που αυτές είχαν με το θάνατο των ζώων. Πιο απλά εξεταζόταν αν οι κακώσεις αυτές είχαν όντως προκαλέσει το θάνατο των ζώων που εξεταζόταν.

3.2.3.2 Ομάδα των τραυματισμένων ζώων ή 2^η ομάδα.

Η ομάδα αυτή περιλάμβανε «ζώα θύματα» τα οποία ήταν ακόμα ζωντανά. Βέβαια, υστερούσε αριθμητικά από την 1^η ομάδα των νεκρών ζώων. Μόνο στο 7% των περιπτώσεων η 2^η ομάδα υπερετέρουσε της 1^{ης}.

Τα ζώα της ομάδας αυτής έφεραν δηκτικές κακώσεις, σε διάφορα σημεία του σώματος. Ο τρόπος εξέτασης των ζώων της 2^{ης} ομάδας, για την συλλογή των στοιχείων που μας ενδιαφέρουν τη μελέτη μας, ήταν πάντοτε ενιαίος και γινόταν με

κλινική εξέταση των τραυματισμένων ζώων. Δυστυχώς στην κτηνιατρική πράξη και ειδικά στις περιπτώσεις εξέτασης των παραγωγικών ζώων, είναι πολύ δύσκολο να πραγματοποιήσουμε εργαστηριακές εξετάσεις, (ακτινολογικές, υπερήχους, ενδοσκοπήσεις κλπ) εκτός βέβαια από μικροβιολογικές. Έτσι μεθοδεύτηκε η κλινική εξέταση των τραυματισμένων ζώων, ώστε αφενός μεν να γίνεται όμοια σε όλες τις περιπτώσεις, αφετέρου δε λεπτομερειακά, για την πληρέστερη μελέτη των δηκτικών τραυματικών κακώσεων. Συμπερασματικά, μπορούμε να πούμε, ότι η κλινική εξέταση στα τραυματισμένα ζώα, διερευνούσε τα σημεία τα οποία διερευνούσε η νεκροψία και η νεκροτομή στα νεκρά από δηκτικές τραυματικές κακώσεις ζώα (ζώα της 1^{ης} ομάδας).

Κλινική Εξέταση.

Οι μέθοδοι της κλινικής εξέτασης, που κύρια χρησιμοποιήθηκαν ήταν η επισκόπηση η ψηλάφηση η ακρόαση και η θερμομέτρηση.

Η επισκόπηση, δηλαδή η αναζήτηση και διαπίστωση των συμπτωμάτων με «γυμνό μάτι». Είναι γνωστό στην κτηνιατρική, πόσο σημαντικός είναι ο έλεγχος της εξωτερικής εμφάνισης του ζώου, καθώς επίσης και οι ανωμαλίες στάσης, θέσης, κίνησης και συμπεριφοράς των πασχόντων ζώων. Το ίδιο ίσχυσε και στην δική μας έρευνα. Η απομάκρυνση των μαλλιών της περιοχής γινόταν οσάκις εκρίνετο σκόπιμο. Με την μέθοδο της επισκόπησης, σε ζώα που είχαν υποστεί δηκτικές τραυματικές κακώσεις μπορούσαν να διαπιστωθούν τα παρακάτω:

- Ανωμαλίες στη θέση και στάση των άκρων και της κεφαλής του ζώου, σε θέση κατάκλισης.
- Αδυναμία ανέγερσης.
- Ανέγερση με δυσκολία και μόνο μετά από πίεση του ζώου.
- Αδυναμία στήριξης των οπίσθιων άκρων (το οπίσθιο τμήμα του ζώου σύρεται στο έδαφος κατά την μετακίνηση).
- Χωλότητες σε ένα ή περισσότερα άκρα με τις συνεπαγόμενες ανωμαλίες στην κίνηση των ζώων.
- Κάμψη διάφορου βαθμού του αυχένα δεξιά ή αριστερά.
- Αλλαγή της συμπεριφοράς των ζώων (φόβος, πανικός).
- Εντόπιση τραυμάτων, εκδορών, οιδημάτων, παθολογικών εκκρίσεων κλπ.
(Clarence M. F 1998, Weiss H.B 1998, Σπαής Α. 1974)

Η ψηλάφηση, δηλαδή η συλλογή συμπτωμάτων με την αφή. Με την μέθοδο της ψηλάφησης, σε ζώα που είχαν υποστεί δηκτικές τραυματικές κακώσεις μπορούσαν να διαπιστωθούν τα παρακάτω:

- Η ευαισθησία μιας ανατομικής περιοχής
- Η σύσταση, όγκος και το σχήμα μιας υποδόριας συλλογής (αιμάτωμα, πυώδης συλλογή κλπ).

- Η κινητικότητα και η θερμοκρασία μιας περιοχής του σώματος.
- Εντοπισμός τραυμάτων, εκδορών, οιδημάτων κλπ.(Σπαής Α. 1974, Weiss H.B 1998)

Η ακρόαση, δηλαδή η συλλογή των συμπτωμάτων με την ακοή. Με την μέθοδο αυτή στα τραυματισμένα ζώα αναζητούσαμε:

- Τις μεταβολές των φυσιολογικών ήχων.
- Την εμφάνιση νέων ήχων, που δηλώνουν συνήθως λειτουργικές ανωμαλίες.

Η θερμομέτρηση, δηλαδή ο προσδιορισμός της σωματικής θερμοκρασίας. Με την μέθοδο αυτή στα τραυματισμένα ζώα διερευνούσαμε την ύπαρξη λοίμωξης μετατραυματικής αιτιολογίας.

Η κλινική εξέταση των τραυματισμένων ζώων, ήταν καθοριστικής σημασίας για την ταυτοποίηση των παρακάτω στοιχείων:

1. Είδος και ηλικία των ζωντανών «ζώων θυμάτων» : Τα ζωντανά ζημιωθέντα ζώα, διαχωρίστηκαν ανάλογα με το είδος και την ηλικία τους. (βλ. πίνακες 2,3 στη στήλη «τραυματισμένα ζώα»).

2. Αριθμός των ζωντανών «ζώων θυμάτων» : Αναφέρεται ο αριθμός των ζώων μιας συγκεκριμένης αναγγελίας ζημιές (ενός συμβάντος), που είχαν υποστεί δηκτικές τραυματικές κακώσεις και τα οποία δεν υπέκυψαν σε αυτές. (βλ. πίνακα 1 στη στήλη «τραυματισμένα ζώα»).

3. Σωματομετρικά χαρακτηριστικά: Αναφέρονται τα σωματομετρικά χαρακτηριστικά των τραυματισμένων ζώων, βάσει των οποίων τα κατατάσσουμε σε μικρόσωμες ή μεγαλόσωμες φυλές.

4. Φύλο : Αναφέρεται το φύλο των τραυματισμένων ζώων.

5. Αριθμός των δηκτικών κακώσεων : Αναφέρονται μόνο οι κακώσεις που ήταν ορατές εξωτερικά.

6. Θέσεις των δηκτικών κακώσεων σε ζωντανά «ζώα θύματα».

Στα ζωντανά «ζώα θύματα», παρατηρήθηκαν δηκτικές κακώσεις στις θέσεις που αναφέρονται αμέσως παρακάτω:

A. Περιοχή της κεφαλής.

Τόπος: Κυρίως στο προσωπικό κρανίο.

B. Περιοχή του τραχήλου και του λαιμού.

Τόπος: Λαιμός και τράχηλος.

Γ. Περιοχή του θώρακα.

Τόπος: Κύρια στη ραχιαία επιφάνεια του θώρακα .

Δ. Περιοχή του κύτους της κοιλίας.

Τόπος: Κύρια στην περιοχή των κενεώνων και στη νεφρική χώρα.

Ε. Περιοχή των γλουτών, των μηρών και του περινέου.

Τόπος: Κύρια στην περιοχή των μυϊκών μαζών των γλουτών και των μηρών.

ΣΤ. Περιοχή των πρόσθιων άκρων.

Τόπος: Κύρια στην περιοχή των μυϊκών μαζών της περιοχής.

Ζ. Περιοχή των οπίσθιων άκρων.

Τόπος: Κύρια στην περιοχή των μυϊκών μαζών, που βρίσκονται μεταξύ της άρθρωσης του γόνατου και του ταρσού.

8. Η βαρύτητα των δηκτικών κακώσεων και η πρόγνωση που έβγαίνει για την υγεία και τη ζωή των ζώων.

Ένας από τους βασικούς στόχους της κλινικής εξέτασης των τραυματισμένων ζώων είναι να εξαγάγει μια πρόγνωση, για το αν το συγκεκριμένο ζώο θα μπορέσει να αντεπεξέλθει με τη βοήθεια βέβαια θεραπευτικών μέσων ή αν η κατάληξη θα είναι μοιραία γιαυτό.

3.3 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΚΑΙ ΑΦΟΡΟΥΝ ΤΟΥΣ «ΣΚΥΛΟΥΣ ΔΡΑΣΤΕΣ».

Συνολικά συνελήφθησαν στον χώρο της ζημιάς και εξετάστηκαν, **225 «σκύλοι δράστες»**, οι οποίοι είχαν προκαλέσει τις δηκτικές κακώσεις σε «ζώα θύματα» (αιγοπρόβατα). Πρέπει να αναφερθεί ότι από τις 296 περιπτώσεις πρόκλησης ζημιών από σκύλους που εξετάσαμε, στις 107 (36%) είχαν συλληφθεί επαυτοφόρω οι “σκύλοι δράστες”, ενώ στις υπόλοιπες 189 (64%) περιπτώσεις, οι “σκύλοι δράστες” είχαν εξαφανιστεί.

3.3.1 Αριθμός, φύλο, φυλή και σωματομετρικά χαρακτηριστικά των «σκύλων δραστήων».

1. Γερμανικοί ποιμενικοί (Λυκόσκυλα). German shepherd.

Αριθμός συλληφθέντων : 36. Αρσενικά 27. Θηλυκά 9.

Καθαρόαιμα (βάσει φαινοτυπικών χαρακτηριστικών) : Αρσενικά 3. Θηλυκά 3

Ύψος καθαρόαιμων : Αρσενικών 60-65 εκ. Θηλυκών 55-60 εκ.

Βάρος καθαρόαιμων : 35-40 κιλά.

Ημίαιμα : Αρσενικά 24. Θηλυκά 6.

Ύψος ημιαίμων : Αρσενικών 55 εκ. Θηλυκών 50 εκ.

Βάρος ημιαίμων : 30-35 κιλά.

Χρήση φυλής : Ποιμενικός, φύλακας.

2. Βελγικοί ποιμενικοί (Βελγικά λυκόσκυλα). Belgian shepherd.

Αριθμός συλληφθέντων : 18. Αρσενικά 11. Θηλυκά 7.

Καθαρόαιμα (βάσει φαινοτυπικών χαρακτηριστικών) : Αρσενικά 3. Θηλυκά 3.

Ύψος καθαρόαιμων : Αρσενικών 60 εκ. Θηλυκών 55 εκ.

Βάρος καθαρόαιμων : 30 κιλά.

Ημίαιμα : Αρσενικά 8. Θηλυκά 4.

Ύψος ημιαίμων : Αρσενικών 55 εκ. Θηλυκών 50 εκ.

Βάρος ημιαίμων : 30 κιλά.

Χρήση φυλής : Ποιμενικός, φύλακας.

3. Λοιποί μεγαλόσωμοι σκύλοι.

Αριθμός συλληφθέντων : 22. Αρσενικά 17. Θηλυκά 5.

Ύψος : Αρσενικών 60-65 εκ. Θηλυκών 50-60 εκ.

Βάρος : 25-40 κιλά.

Χρήση φυλής : Ποιμενικοί, φύλακες, ζώα συντροφιάς.

4. Σκύλοι κυνηγετικών φυλών.

Αριθμός συλληφθέντων : 48. Αρσενικά 26. Θηλυκά 22.

Ύψος : Αρσενικών 45-52 εκ. Θηλυκών 40-50 εκ.

Βάρος : 17-25 κιλά.

Χρήση φυλής : Κυνηγόσκυλα.

5. Λοιπά μικρόσωμα σκυλιά.

Αριθμός συλληφθέντων : 101. Αρσενικά 75. Θηλυκά 26.

Ύψος : Αρσενικών 25-45 εκ. Θηλυκών 20-40 εκ.

Βάρος : 10-25 κιλά.

Χρήση φυλής : Διάφορες χρήσεις.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5: Κατάταξη των «σκύλων δραστών» των δηκτικών κακώσεων, ανάλογα με τα σωματομετρικά τους χαρακτηριστικά (φυλή) και το φύλο τους.

ΣΩΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΡΣΕΝΙΚΩΝ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΘΗΛΥΚΩΝ	ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ
ΓΕΡΜΑΝΙΚΟΣ ΠΟΙΜΕΝΙΚΟΣ	27	9	36 (16%)
ΒΕΛΓΙΚΟΣ ΠΟΙΜΕΝΙΚΟΣ	11	7	18 (8%)
ΛΟΙΠΟΙ ΜΕΓΑΛΟΣΩΜΟΙ ΣΚΥΛΟΙ	17	5	22 (9.8%)
ΣΚΥΛΟΙ ΚΥΝΗΓΕΤΙΚΩΝ ΦΥΛΩΝ	26	22	48 (21.4%)
ΛΟΙΠΑ ΜΙΚΡΟΣΩΜΑ ΣΚΥΛΙΑ	75	26	101 (44.8%)
ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΝΑ ΦΥΛΟ	156 (69%)	69 (31%)	225

3.3.2 Ύψος των δοντιών των “σκύλων δραστών”.

1. Κυνόδοντες.

Κάτω γνάθος.

Μικρόσωμες φυλές: 1.7 cm.

Μεγαλόσωμες φυλές: 2,5 cm.

Άνω γνάθος.

30 – 35 % μεγαλύτερο από το αντίστοιχο ύψος των κυνοδόντων της κάτω γνάθου.

2. Μέσοι τομείς.

Κάτω γνάθος.

Μικρόσωμες φυλές: 0.5 cm.

Μεγαλόσωμες φυλές: 0.8 cm.

Άνω γνάθος.

10 % μεγαλύτερο από το αντίστοιχο ύψος των μέσων τομέων της κάτω γνάθου.

3. Παράμεσοι τομείς.

Κάτω γνάθος.

Μικρόσωμες φυλές: 0.7 cm.

Μεγαλόσωμες φυλές: 1.2 cm.

Άνω γνάθος.

10 % μεγαλύτερο από το αντίστοιχο ύψος των παράμεσων τομέων της κάτω γνάθου.

4. Ακραίοι τομείς.

Κάτω γνάθος.

Μικρόσωμες φυλές: 0.9 cm.

Μεγαλόσωμες φυλές: 1.4 cm.

Άνω γνάθος.

10 % μεγαλύτερο από το αντίστοιχο ύψος των ακραίων τομέων της κάτω γνάθου.

ΠΙΝΑΚΑΣ 6: Μήκος των δοντιών των σκύλων σε εκατοστά (cm).

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΟΔΟΝΤΩΝ	ΜΕΓΑΛΟΣΩΜΕΣ ΦΥΛΕΣ		ΜΙΚΡΟΣΩΜΕΣ ΦΥΛΕΣ	
	ΚΑΤΩ ΓΝΑΘΟΣ	ΑΝΩ ΓΝΑΘΟΣ	ΚΑΤΩ ΓΝΑΘΟΣ	ΑΝΩ ΓΝΑΘΟΣ
ΚΥΝΟΔΟΝΤΕΣ	~ 2.5	< 30%	~ 1.7	< 30%
ΤΟΜΕΙΣ ΜΕΣΟΙ	~ 0.8	< 10%	~ 0.5	< 10%
» ΠΑΡΑΜΕΣΟΙ	~ 1.2	< 10%	~ 0.7	< 10%
» ΑΚΡΑΙΟΙ	~ 1.5	< 10%	~ 0.9	< 10%

3.3.3 Αποστάσεις μεταξύ των δοντιών των “σκύλων δραστών”.

1. Αποστάσεις μεταξύ των τομέων.

Μικρόσωμες φυλές: 0.5 – 0.6 cm.

Μεγαλόσωμες φυλές: 0.6 - 1.0 cm.

2. Αποστάσεις μεταξύ των ακραίων τομέων και των κυνοδόντων.

Μικρόσωμες φυλές: 0.5 – 0.6 cm.

Μεγαλόσωμες φυλές: 0.6 - 1.0 cm.

3. Αποστάσεις μεταξύ των κυνοδόντων και των πρώτων προγομφίων.

Μικρόσωμες φυλές: 1.5 cm.

Μεγαλόσωμες φυλές: 2.5 cm.

4. Αποστάσεις μεταξύ πρώτων – δευτέρων και δευτέρων - τρίτων προγομφίων.

Μικρόσωμες φυλές: 1 cm.

Μεγαλόσωμες φυλές: 1.5 cm.

5. Αποστάσεις μεταξύ των τρίτων και τετάρτων προγομφίων.

Μικρόσωμες φυλές: 1.5 cm.

Μεγαλόσωμες φυλές: 2.5 cm.

6. Αποστάσεις μεταξύ των τετάρτων προγομφίων και των πρώτων γομφίων.

Μικρόσωμες φυλές: 1.2 cm.

Μεγαλόσωμες φυλές: 1.5 cm.

7. Αποστάσεις μεταξύ των γομφίων.

Μικρόσωμες φυλές: 1.2 cm.

Μεγαλόσωμες φυλές: 1.5 cm.

8. Εγκάρσια απόσταση μεταξύ των ακραίων τομέων.

Μικρόσωμες φυλές: 2.5 cm.

Μεγαλόσωμες φυλές: 3.5 cm

9. Εγκάρσια απόσταση μεταξύ των κυνοδόντων.

Μικρόσωμες φυλές: 3.0 cm.

Μεγαλόσωμες φυλές: 5.0 cm

10. Εγκάρσια απόσταση μεταξύ των πρώτων προγομφίων.

Μικρόσωμες φυλές: 2.2 cm.

Μεγαλόσωμες φυλές: 3.2 cm

11. Εγκάρσια απόσταση μεταξύ των δευτέρων προγομφίων.

Μικρόσωμες φυλές: 2.5 cm.

Μεγαλόσωμες φυλές: 3.5 cm

12. Εγκάρσια απόσταση μεταξύ των τρίτων προγομφίων.

Μικρόσωμες φυλές: 3.0 cm.

Μεγαλόσωμες φυλές: 4.0 cm

13. Εγκάρσια απόσταση μεταξύ των τέταρτων προγομφίων.

Μικρόσωμες φυλές: 5.0 cm.

Μεγαλόσωμες φυλές: 6.5 cm

14. Εγκάρσια απόσταση μεταξύ των πρώτων γομφίων.

Μικρόσωμες φυλές: 5.3 cm.

Μεγαλόσωμες φυλές: 7.0 cm

15. Εγκάρσια απόσταση μεταξύ των δεύτερων γομφίων.

Μικρόσωμες φυλές: 4.5 cm.

Μεγαλόσωμες φυλές: 5.5 cm

16. Απόσταση (σε ευθεία γραμμή) μεταξύ κυνόδοντα και τετάρτου προγομφίου της άνω γνάθου.

Μικρόσωμες φυλές: 5.0 cm.

Μεγαλόσωμες φυλές: 6.0 cm

17. Απόσταση (σε ευθεία γραμμή) μεταξύ κυνόδοντα και πρώτου γομφίου της κάτω γνάθου.

Μικρόσωμες φυλές: 6.0 cm.

Μεγαλόσωμες φυλές: 7.0 cm

18. Απόσταση (σε ευθεία γραμμή) από το ύψος του μέσου τομέως έως το ύψος του τελευταίου πρώτου γομφίου της άνω γνάθου.

Μικρόσωμες φυλές: 9.0 cm.

Μεγαλόσωμες φυλές: 11.0 cm

19. Απόσταση (σε ευθεία γραμμή) από το ύψος του μέσου τομέως έως το ύψος του τελευταίου πρώτου γομφίου της κάτω γνάθου (με ένα επιπλέον γομφίο).

Μικρόσωμες φυλές: 10.5 cm.

Μεγαλόσωμες φυλές: 13.0 cm.

ΠΙΝΑΚΑΣ 7: Αποστάσεις μεταξύ των δοντιών των σκύλων σε εκατοστά (cm).

ΑΠΟΣΤΑΣΕΙΣ	ΜΕΓΑΛΟΣΩΜΟΙ	ΜΙΚΡΟΣΩΜΟΙ
ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΜΕΩΝ	~ 0.6 – 1.0	~ 0.5 – 0.6
ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΜΕΩΝ – ΚΥΝΟΔΟΝΤΩΝ	~ 0.6 – 1.0	~ 0.5 – 0.6
ΜΕΤΑΞΥ ΚΥΝΟΔΟΝΤΩΝ – ΠΡΟΓΟΜΦΙΩΝ	~ 2.5	~ 1.5
ΜΕΤΑΞΥ 1 ^{ΩΝ} - 2 ^{ΩΝ} - 3 ^{ΩΝ} ΠΡΟΓΟΜΦΙΩΝ	~ 1.5	~ 1.0
ΜΕΤΑΞΥ 3 ^{ΩΝ} - 4 ^{ΩΝ} ΠΡΟΓΟΜΦΙΩΝ	~ 2.5	~ 1.5
ΜΕΤΑΞΥ 4 ^{ΩΝ} ΠΡΟΓΟΜ. – 1 ^{ΩΝ} ΓΟΜΦΙΩΝ	~ 2.5	~ 1.5
ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΓΟΜΦΙΩΝ	~ 1.5	~ 1.2
ΕΓΚΑΡΣΙΑ ΑΠΟΣΤΑΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΑΚΡΑΙΩΝ ΤΟΜΕΩΝ	~ 3.5	~ 2.5
ΕΓΚΑΡΣΙΑ ΑΠΟΣΤΑΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΚΥΝΟΔΟΝΤΩΝ	~ 5.0	~ 3.0
ΕΓΚΑΡΣΙΑ ΑΠΟΣΤΑΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ 1 ^{ΩΝ} ΠΡΟΓΟΜΦΙΩΝ	~ 3.2	~ 2.2
ΕΓΚΑΡΣΙΑ ΑΠΟΣΤΑΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ 2 ^{ΩΝ} ΠΡΟΓΟΜΦΙΩΝ	~ 3.5	~ 2.5
ΕΓΚΑΡΣΙΑ ΑΠΟΣΤΑΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ 3 ^{ΩΝ} ΠΡΟΓΟΜΦΙΩΝ	~ 4.0	~ 3.0
ΕΓΚΑΡΣΙΑ ΑΠΟΣΤΑΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ 4 ^{ΩΝ} ΠΡΟΓΟΜΦΙΩΝ	~ 6.5	~ 5.0
ΕΓΚΑΡΣΙΑ ΑΠΟΣΤΑΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ 1 ^{ΩΝ} ΓΟΜΦΙΩΝ	~ 7.0	~ 5.3
ΕΓΚΑΡΣΙΑ ΑΠΟΣΤΑΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ 2 ^{ΩΝ} ΓΟΜΦΙΩΝ	~ 5.5	~ 4.5
ΑΠΟΣΤΑΣΗ ΣΕ ΕΥΘΕΙΑ ΜΕΤΑΞΥ ΚΥΝΟΔΟΝΤΩΝ ΚΑΙ 4 ^{ΩΝ} ΠΡΟΓΟΜΦΙΩΝ ΤΗΣ ΑΝΩ ΓΝΑΘΟΥ	~ 6.0	~ 5.0
ΑΠΟΣΤΑΣΗ ΣΕ ΕΥΘΕΙΑ ΜΕΤΑΞΥ ΚΥΝΟΔΟΝΤΩΝ ΚΑΙ 1 ^{ΩΝ} ΓΟΜΦΙΩΝ ΤΗΣ ΚΑΤΩ ΓΝΑΘΟΥ	~ 7.0	~ 6.0
ΑΠΟΣΤΑΣΗ ΣΕ ΕΥΘΕΙΑ ΜΕΤΑΞΥ ΜΕΣΟΥ ΤΟΜΕΑ ΚΑΙ ΤΕΛΕΥΤΑΙΩΝ ΓΟΜΦΙΩΝ ΤΗΣ ΑΝΩ ΓΝΑΘΟΥ	~ 11.0	~ 9.0
ΑΠΟΣΤΑΣΗ ΣΕ ΕΥΘΕΙΑ ΜΕΤΑΞΥ ΜΕΣΟΥ ΤΟΜΕΑ ΚΑΙ ΤΕΛΕΥΤΑΙΩΝ ΓΟΜΦΙΩΝ ΤΗΣ ΚΑΤΩ ΓΝΑΘΟΥ	~ 13.0	~ 10,5

3.3.4 Συμπεριφορά των σκύλων, επιθετικότητα, δήξη.

Οι σκύλοι, όπως είναι γνωστό, είναι ζώα σαρκοφάγα και κατά συνέπεια έχουν το ένστικτο του διώκτη (του κυνηγού). Σήμερα, χρησιμοποιούνται σαν κατοικίδια ζώα με δύο βασικές κατευθύνσεις:

- Σαν ζώα συντροφιάς.
- Σαν ζώα εργασίας . (Φύλακες, συνοδοί ατόμων ή ζώων, ανιχνευτές θηραμάτων, βοηθοί σε κτηνοτροφικές εργασίες, ανιχνευτές επικίνδυνων αντικειμένων και απαγορευμένων ουσιών κλπ). (Reisner I.L 1997, Pugnetti G. 1990)

Όσο ο σκύλος, οποιαδήποτε και αν είναι η κατεύθυνση χρησιμοποίησής του, έχει ιδιοκτήτη, δηλαδή κάποιιο άνθρωπο που να τον επιτηρεί και να τον φροντίζει σωστά, παραμένει ένα πολύ χρήσιμο κατοικίδιο ζώο, χωρίς να δημιουργεί κανένα απολύτως πρόβλημα. Όταν απεναντίας, ο σκύλος εγκαταλειφθεί ελεύθερος στο περιβάλλον ή επιτηρείται χαλαρά, αφυπνίζονται τα αρχέγονα ένστικτα που βρίσκονται χρόνια σε λανθάνουσα κατάσταση και το ζώο γίνεται επικίνδυνο. (Reisner I.L. et al 1994, Lauridson J.R. et al 1993).

Οι ερευνητές που ασχολήθηκαν με την συμπεριφορά των σκύλων κατέληξαν ότι η επιθετικότητα των σκύλων συναρτάται άμεσα με τους παρακάτω παράγοντες:

- Τον φόβο που αισθάνεται ο σκύλος για κάποιιο πρόσωπο ή αντικείμενο.
- Το αίσθημα της πείνας, πράγμα που συμβαίνει όταν το ζώο εγκαταλειφθεί.
- Την εκπαίδευση που έχει λάβει.
- Το αίσθημα της απειλής για κάποιιο πρόσωπο ή αντικείμενου το οποίο ο σκύλος θεωρεί προσφιλές.
- Το αίσθημα της απειλής της ζωής ή η κακομεταχείριση του ίδιου του ζώου.
- Την υποχώρηση ή την φυγή του προσώπου ή του ζώου, τα οποία ο σκύλος θεωρεί σαν αντίπαλο.
- Την αρπαγή της τροφής ή των αντικειμένων που θεωρεί σαν ιδιοκτησία του ο σκύλος.
- Το μητρικό ένστικτο, πράγμα που συμβαίνει όταν ο σκύλος έχει μικρά.
- Το αίσθημα της υπεροχής για την αρχηγία, πράγμα που συμβαίνει όταν τα αδέσποτα σκυλιά αγελοποιούνται ή την εποχή του ζευγαρώματος.

(Cassani M.C et al 2001, Guy N.C. 2001, Hunthausen W. 1997, Neilson J.C 1997, Patronek G.J, et al 1996, Beaver B.V. 1994, Gershman K.A. 1994).

Στις περιπτώσεις που απασχόλησαν την έρευνα, αυτή η επιθετικότητα των “σκύλων δραστήων” και κατά συνέπεια οι δήξεις που αυτοί προκαλούσαν οφειλόταν κύρια στους παρακάτω λόγους:

- Στο αίσθημα της πείνας και στην ανάγκη επιβίωσης που αισθάνεται κάθε αδέσποτο ζώο.
- Στην εκπαίδευση που έχει λάβει, καθώς και στην υποχώρηση και τον πανικό που προκαλεί στα “ζώα θύματα” η θέα των σκύλων.
- Στο αίσθημα της υπεροχής για την αρχηγία, πράγμα που συμβαίνει όταν τα αδέσποτα σκυλιά αγελοποιούνται ή την εποχή του ζευγαρώματος.

3.3.5 Σχέση των σωματομετρικών χαρακτηριστικών των “σκύλων δραστών και των δηκτικών κακώσεων που αυτοί προκάλεσαν.

Τα σωματομετρικά χαρακτηριστικά των «σκύλων δραστών» και η εκπαίδευση που έχουν πάρει, (ποιμενικοί σκύλοι, κυνηγετικοί σκύλοι, κλπ), έχουν άμεση σχέση, τόσο με τα χαρακτηριστικά των δηκτικών τραυματικών κακώσεων όσο και με το μέγεθος των ζημιών που προκαλούν. (Guy N.C 2001.b, Podberscek A.L et al 1997, Kucan J.O 1989). Από τις παρατηρήσεις μας, οι οποίες, όπως προαναφέρθηκε, έγιναν σε επαυτοφώρω συλληφθέντες σκύλους-δράστες πρόκλησης δηκτικών κακώσεων, προκύπτουν τα παρακάτω στοιχεία:

1. Σχέση των σωματομετρικών χαρακτηριστικών των σκύλων και των θέσεων των δηκτικών κακώσεων που προκάλεσαν.

Οι μεγαλόσωμοι σκύλοι, προκαλούσαν δηκτικές κακώσεις στα ψηλότερα σημεία του σώματος των θυμάτων τους (κρανίο, τράχηλο, λαιμό, ράχη, οσφύ κ.λ.π.). Αντίθετα οι μικρόσωμοι σκύλοι προκαλούσαν δηκτικές κακώσεις σε χαμηλότερα σημεία (μαστούς, μηρούς, άκρα). Η θέση βέβαια της δηκτικής κάκωσης έχει σχέση και με το μέγεθος και κυρίως με το ύψος, του ζώου-θύματος (αν δηλαδή αυτό είναι αρνί ή ενήλικο πρόβατο και μεταξύ των προβάτων αν είναι μεγαλόσωμο ή μικρόσωμο). Η θέση επίσης της δηκτικής κάκωσης, έχει άμεση σχέση με την εκπαίδευση που έχει πάρει ο σκύλος. Έτσι για παράδειγμα, οι κυνηγετικοί σκύλοι, προκαλούν σταθερά βαθιές κακώσεις στη νεφρική χώρα, ενώ οι ποιμενικοί που έχουν εκπαιδευτεί στη σύλληψη των αιγοπροβάτων, προκαλούν αντίστοιχες κακώσεις στην περιοχή της κνήμης του ταρσού και των μεταταρσίων.

2. Σχέση των σωματομετρικών χαρακτηριστικών των σκύλων και του βάθους των δηκτικών κακώσεων που προκάλεσαν.

Οι δηκτικές κακώσεις που προκαλούσαν οι μεγαλόσωμοι σκύλοι δράστες ήταν βαθύτερες και οι βλάβες που είχαν προκληθεί στις τραυματικές περιοχές ήταν σοβαρότερες και μεγαλύτερης έκτασης. Όλα τα παραπάνω συνέβαιναν γιατί τόσο η ασκούμενη δύναμη από τις σιαγόνες των μεγαλόσωμων σκύλων ήταν μεγαλύτερη όσο και γιατί το μέγεθος των δοντιών τους (ύψος, εύρος), ήταν σαφώς μεγαλύτερο.

3. Σχέση των σωματομετρικών χαρακτηριστικών των σκύλων δραστών και του αριθμού των δηκτικών κακώσεων που προκάλεσαν.

Διαπιστώθηκε ότι ο αριθμός των δηκτικών κακώσεων που προκαλούσαν οι μεγαλόσωμοι σκύλοι σε κάθε ζώο θύμα, ήταν μικρότερος από τον αντίστοιχο τον οποίο προκαλούσαν οι μεγαλόσωμοι σκύλοι. Αυτό πιστεύουμε ότι συνέβαινε γιατί οι κακώσεις που προκαλούσαν οι μεγαλόσωμες φυλές είχαν μεγαλύτερο βάθος, γινόταν σε υψηλότερα και συνεπώς πιο ζωτικά σημεία και γενικά η ζημιογόνος δράσης τους ήταν μεγαλύτερη. Έτσι η αντίσταση των ζώων θυμάτων μπορούσε να καμφθεί με λιγότερες δηκτικές κακώσεις.

3.4 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΠΟΥ ΑΦΟΡΟΥΝ ΤΑ ΖΩΑ ΘΥΜΑΤΑ.

Αριθμός, είδος και ηλικία των ζημιωθέντων ζώων, νεκρών και τραυματισμένων.

Παρατηρώντας τον πίνακα 2, που αναφέρεται στον αριθμό και το είδος των ζημιωθέντων ζώων, συμπεραίνουμε ότι ο αριθμός των νεκρών «ζώων θυμάτων» (συμπεριλαμβανόμενων και των βαριά τραυματισμένων), είναι πολύ μεγαλύτερος από αυτό των τραυματισμένων. Αυτό σημαίνει ότι οι επιθέσεις και οι δήξεις από σκύλους σε αιγοπρόβατα, προκαλούν το θάνατο των τελευταίων στις περισσότερες περιπτώσεις. Το αντίθετο ακριβώς συμβαίνει στις περιπτώσεις επιθέσεων και δήξεων από σκύλους σε ανθρώπους, όπου ο αριθμός των θυμάτων που υποκύπτουν είναι κατά πολύ μικρότερος. Το γεγονός αυτό αποδίδεται σε πολλούς παράγοντες, μεταξύ των οποίων σπουδαιότεροι είναι:

- Ο άνθρωπος διαθέτει λογική η οποία τον βοηθά να ανακαλύψει τρόπους άμυνας και διαφυγής σε δύσκολες περιστάσεις, όπως αυτές της επίθεσης από σκύλους.
- Ο άνθρωπος, λόγω της όρθιας στάσης του σώματός του, έχει τις ευαίσθητες και ζωτικές του περιοχές (λαιμός, τράχηλος, κεφάλι, κλπ), πολύ ψηλότερα από το ύψος των σκύλων. Συνεπώς, οι δηκτικές κακώσεις στις ευαίσθητες περιοχές αυτές, προκαλούνται δυσκολότερα και παρατηρούνται σπανιότερα, από τις αντίστοιχες σε ζώα με σωματομετρικά μεγέθη αντίστοιχα των αιγοπροβάτων. (Burt J.D. et al 2000, Calkins C.M. et al 2001)
- Ο άνθρωπος διαθέτει ισχυρούς και ευέλικτους αμυντικούς μηχανισμούς όπως τα χέρια και τα πόδια, τα οποία μπορούν με επιτυχία να προστατεύσουν τα ζωτικά σημεία του σώματος από τις δήξεις. (Aslam A. 1999, Brandenburg M.A et al 2000).

Επανερχόμενοι στις δηκτικές κακώσεις των ζώων και εξετάζοντας την αντίσταση των «ζώων θυμάτων», όταν δεχθούν επίθεση από «ζώα δράστες»,

παρατηρούμε ότι αυτή είναι συνάρτηση πολλών παραγόντων, οι σπουδαιότεροι από τους οποίους είναι η ηλικία και τα σωματομετρικά χαρακτηριστικά.

1. Η ηλικία.

Τα ενήλικα ζώα προβάλλουν μεγαλύτερη αντίσταση από τα νεαρότερα του ίδιου είδους. Στη συγκεκριμένη μελέτη ο αριθμός των ενηλίκων «ζώων-θυμάτων» είναι πολύ μεγαλύτερος από αυτόν των νεότερης ηλικίας. Αυτό βέβαια εξηγείται γιατί τα περισσότερα νεαρά ζώα μένουν κλεισμένα σε σταυλικές εγκαταστάσεις, ενώ τα ενήλικα ζουν στο ύπαιθρο. Εκείνο που με σίγουρα προκύπτει από την εξέταση ανά ηλικία των «ζώων θυμάτων», είναι ότι, τα νεαρά ζώα υποκύπτουν σε υψηλό ποσοστό στα τραύματά τους, ενώ στα μεγαλύτερης ηλικίας ζώα, παρουσιάζεται μεγάλος αριθμός που καταφέρνουν και επιβιώνουν.

Από την επεξεργασία στοιχείων που αφορούν την πρόκληση δηκτικών κακώσεων από σκύλους σε ανθρώπους, προκύπτει ότι τα περισσότερα θύματα των δήξεων είναι παιδιά ή άτομα νεαρής ηλικίας. Σε μελέτη που έγινε σε περιοχή των Η.Π.Α., το 89% των περιστατικών που διακομίστηκαν σε νοσοκομεία ήταν νεαρά άτομα ηλικίας 8 μηνών έως 17 ετών. Παρόμοια αποτελέσματα έδειξε και έρευνα στην περιοχή της Βαλέντσιας, στην Ισπανία. Σαν αιτία αυτού του φαινομένου θεωρείται η χωρίς ιδιαίτερη σκέψη προσέγγιση των σκύλων από παιδιά μικρής ηλικίας, πράγμα που δεν συμβαίνει με τους ενήλικες, οι οποίοι φροντίζουν να τηρούν κάποια τουλάχιστον μέτρα προφύλαξης. (Calkins C. et al 2001, Presutti R.J. 2001, Cassani M.C. et al 2001, Avner J.R et al 1991).

2. Σωματομετρικά χαρακτηριστικά των ζημιωθέντων ζώων.

Τα σωματομετρικά χαρακτηριστικά των ζώων, διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο τόσο στην δυνατότητα πρόκλησης των δηκτικών κακώσεων, όσον και στην βαρύτητα αυτών. Δυσκολότερα οι σκύλοι προκαλούν δήξεις στα βοοειδή από ότι στα αιγοπρόβατα. Επίσης μεταξύ «ζώων θυμάτων» του ίδιου είδους, οι μεγαλόσωμες φυλές προσβάλλονται δυσκολότερα. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην σχέση της άμυνας που αναπτύσσει ένα ζώο και του μεγέθους του, σχέση ευθέως ανάλογη. Ανάλογη είναι και η σχέση της βαρύτητας των δηκτικών κακώσεων και των σωματομετρικών χαρακτηριστικών των ζώων, γιατί στα μεγαλόσωμα είδη ζώων, τα όργανα ζωτικής σημασίας (λαιμός, τράχηλος, κεφάλι, κλπ), βρίσκονται όπως προαναφέραμε σε μεγαλύτερο ύψος και κατά συνέπεια είναι δυσκολότερο να υποστούν δήξεις από σκύλους. Αυτός είναι ένας από τους λόγους που στον άνθρωπο, λόγω της όρθιας στάσης του σώματός του, προκαλούνται δυσκολότερα δηκτικές κακώσεις μεγάλης βαρύτητας, σε σχέση με άλλα είδη ζώων. (Burt J.D. et al 2000, Calkins C.M. et al 2001).

Αμέσως παρακάτω αναφέρουμε το ποσοστό των μεγαλόσωμων και των μικρόσωμων αιγοειδών και προβατοειδών, που είχαν υποστεί δηκτικές τραυματικές

κακώσεις. Στην κατηγορία λοιπόν των μικρόσωμων προβατοειδών, ανήκει το 86% των εξετασθέντων περιστατικών πρόκλησης δηκτικών τραυματικών κακώσεων σε προβατοειδή. Στην κατηγορία των μεγαλόσωμων προβατοειδών, ανήκει το 14% των εξετασθέντων περιστατικών πρόκλησης δηκτικών τραυματικών κακώσεων σε προβατοειδή. Στην κατηγορία των μικρόσωμων αιγοειδών, ανήκει το 91% των εξετασθέντων περιστατικών πρόκλησης δηκτικών τραυματικών κακώσεων σε αιγοειδή. Στην κατηγορία των μεγαλόσωμων αιγοειδών, ανήκει το 9% των εξετασθέντων περιστατικών πρόκλησης δηκτικών τραυματικών κακώσεων σε αιγοειδή. Όλα τα παραπάνω συνηγορούν στο ότι, τα αιγοειδή και τα προβατοειδή των μεγαλόσωμων φυλών, πέφτουν δυσκολότερα θύματα δηκτικών κακώσεων, γιατί προβάλλουν σαφώς μεγαλύτερη αντίσταση εναντίων των σκύλων δραστών.

ΠΙΝΑΚΑΣ 8 : % ποσοστό των ζώων θυμάτων που είχαν υποστεί δηκτικές κακώσεις.

Είδος ζώων- θυμάτων	Μικρόσωμα (%)	Μεγαλόσωμα (%)
Προβατοειδή	86	14
Αιγοειδή	91	9

3.5 ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΠΟΥ ΑΦΟΡΟΥΝ ΤΙΣ ΔΗΚΤΙΚΕΣ ΚΑΚΩΣΕΙΣ.

3.5.1 Μηχανισμός πρόκλησης των δηκτικών κακώσεων.

1. Δημιουργία των δηκτικών κακώσεων.

Η επαφή και σύγκληση των γνάθων των σκύλων δραστών, στο σώμα των αιγοπροβάτων, έχει σαν αποτέλεσμα την βύθιση των δοντιών των πρώτων στο σώμα των δευτέρων. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργούνται τραυματικές και θλαστικές κακώσεις, οι οποίες συνιστούν τις λεγόμενες δηκτικές κακώσεις. Το βάθος των δηκτικών κακώσεων και συνεπώς η ζημιογόνος δράση των πάνω στους ιστούς, είναι ανάλογα με το μέγεθος των δοντιών και τη δύναμη σύγκλησης των γνάθων, παράμετροι που συναρτούνται ευθέως με τα σωματομετρικά χαρακτηριστικά των σκύλων. Όταν το αποτύπωμα των δοντιών των ζώων δραστών είναι ευκρινές, τότε είναι δυνατόν μετά από προσεκτική παρατήρησή του (μέτρηση των μεσοδόντιων διαστημάτων και του βάθους, των τραυμάτων ή των θλάσεων που έχουν δημιουργηθεί), να προσδιοριστούν τα σωματομετρικά χαρακτηριστικά του «ζώου δράστη», δηλαδή αν είναι μεγαλόσωμος ή μικρόσωμος.(Tsokos M. et al 1999, Sacks J.J ,(a), 1996, Rossi M.L. et al 1994, Thomas H.F. et al 1991). Βέβαια, η ευκρίνεια της εικόνας που δίνει μια δηκτική κάκωση στα ζώα, είναι συνάρτηση της εριοκάλυψης του σώματος καθώς και του χρώματος του δέρματος, του «ζώου θύματος». Είναι

λοιπόν εύκολη η λεπτομερειακή παρατήρηση των δηκτικών κακώσεων σε ζώα με μικρή εριοκάλυψη και ανοιχτόχρωμο δέρμα, (πχ χοίρος), ενώ γίνεται δυσκολότερη σε ζώα με μεγάλη εριοκάλυψη και σκουρόχρωμο δέρμα (πχ αιγοπρόβατα).

2. Στάδιο προσέγγισης του «ζώου θύματος» από «το ζώο δράστη».

Αρχικά, το «ζώο δράστης» (σκύλος), προσεγγίζει το «ζώο θύμα» (αιγοπρόβατο). Η προσέγγιση αυτή, τις περισσότερες φορές είναι βίαιη και γίνεται μετά από διάφορου βαθμού καταδίωξη. Η ένταση και ο χρόνος της καταδίωξης εξαρτάται από τους παράγοντες που αναφέρονται αμέσως παρακάτω.

- Από τα σωματομετρικά χαρακτηριστικά του «ζώου θύματος». Τα μεγαλόσωμα «ζώα θύματα» προκειμένου να συλληφθούν, καταπονούν περισσότερο τα «ζώα δράστες», από τα αντίστοιχα μικρόσωμα.
- Από τον χώρο όπου διαβιώνουν τα «ζώα θύματα». Όσο μεγαλύτερος είναι ο χώρος αυτός, τόσο η καταδίωξη διαρκεί περισσότερο χρόνο και η διανυόμενη απόσταση από τα ζώα (δράστες και θύματα) είναι μεγαλύτερη. Τους χειμερινούς μήνες όπου τα αιγοπρόβατα ζουν σε μικρό και περιφραγμένο χώρο, τα «ζώα θύματα» συλλαμβάνονται ευκολότερα από τα «ζώα δράστες» και συνεπώς οι ζημιές που προκαλούνται μεγαλύτερες.
- Από την ηλικία των «ζώων θυμάτων». Τα πολύ νεαρά και τα πολύ ηλικιωμένα «ζώα θύματα», συλλαμβάνονται μετά από μικρότερη καταδίωξη, σε σχέση με τα υπόλοιπα.
- Από το είδος του «ζώου θύματος». Τα αιγοειδή απαιτούν για την προσέγγιση και την σύλληψή τους από τους σκύλους, μεγαλύτερη καταδίωξη, σε σχέση με τα προβατοειδή.
- Από το φύλο του «ζώου θύματος». Τα αρσενικά «ζώα θύματα», όταν βρίσκονται και ηγούνται του κοπαδιού στο οποίο ανήκουν, σταματούν και αντιστέκονται εναντίον των επιθέσεων που δέχονται από τους σκύλους. Γιαυτό η προσέγγισή τους γίνεται μεν σε συντομότερο χρόνο, αλλά όπως έχει προαναφερθεί η αντίσταση που προβάλλουν είναι πολύ σθεναρή.
- Από την κατάσταση υγείας του «ζώου θύματος». Ασθενή «ζώα θύματα» συλλαμβάνονται ευκολότερα από τα αντίστοιχα υγιή.
- Από τον αριθμό των «ζώων δραστών» που καταδιώκουν ένα «ζώο θύμα». Είναι φυσικό ότι όταν περισσότερα από ένα «ζώα δράστες» κυνηγούν ένα «ζώο θύμα», το τελευταίο θα συλληφθεί ευκολότερα.

3. Στάδιο σύλληψης και συγκράτησης του «ζώου θύματος» από το «ζώο δράστη». Δημιουργία των “τραυμάτων συγκράτησης”.

Στο στάδιο αυτό, οι σκύλοι δράστες στην προσπάθειά τους να συγκρατήσουν τα ζώα θύματα, δημιουργούν τα “τραύματα συγκράτησης”. Έχουν δημοσιευθεί αρκετές έρευνες για την κυνηγετική συμπεριφορά των σαρκοφάγων ζώων, κύρια δε

των κυνοειδών και των αιλουροειδών. Σε όλες αυτές τις έρευνες και ανεξάρτητα από τις κυνηγετικές ιδιορρυθμίες του κάθε είδους, κοινό χαρακτηριστικό θεωρείται η προσπάθεια συγκράτησης του «ζώου θύματος» από το «ζώο δράστη». Η συγκράτηση του θύματος, γίνεται με την πρόκληση του πρώτου συνήθως δηκτικού τραύματος, του τραύματος δηλαδή που προκαλείται την χρονική στιγμή που το «ζώο-δράστης», έρθει σε επαφή με το σώμα του υποψήφιου «ζώου- θύματος». Οι τραυματικές κακώσεις συγκράτησης προκαλούνται στην προσπάθεια του σκύλου, να συγκρατήσει το θύμα του. Επειδή δε το τραύμα αυτό, ουσιαστικά επιβραδύνει (συγκρατεί) το «ζώο-θύμα», εκτός από τα διατηρητικά χαρακτηριστικά του, προκαλεί και διάφορου βαθμού διασχίσεις, αποσπάσεις ιστών και εκτεταμένους μώλωπες στην τραυματική περιοχή.

Όπως είναι φυσικό, οι τραυματικές κακώσεις συγκράτησης γίνονται κατά την διάρκεια της κίνησης (καταδίωξης) και των δύο ζώων (δράστη και θύματος) και η θέση τους υποδεικνύει περίπου το ύψος της κεφαλής του σαρκοφάγου «ζώου-δράστη». Θεωρείται λοιπόν, ότι μπορούν να αποτελέσουν, σε συνδυασμό με τη θέση των υπόλοιπων δηκτικών κακώσεων, ενδεικτικό στοιχείο για την περιγραφή των σωματομετρικών χαρακτηριστικών του δράστη. Οι “σκύλοι δράστες” των μεγαλόσωμων φυλών, προσπαθούν να προκαλέσουν τα τραύματα αυτά, κατευθείαν στην περιοχή του λαιμού και του τραχήλου των αιγοπροβάτων, πράγμα εφικτό αφού το ύψος της παραπάνω περιοχής, είναι αντίστοιχο με το δικό τους ύψος. Απεναντίας οι “σκύλοι δράστες” των μικρόσωμων φυλών, στο στάδιο της συγκράτησης, προκαλούν δήξεις σε μικρότερου ύψους θέσεις του σώματος των “ζώων θυμάτων”.

Η σοβαρότητα των τραυματικών κακώσεων συγκράτησης, εξαρτάται από την γενική αντίσταση που προβάλλει το «ζώο θύμα», η οποία είναι όπως προαναφέρθηκε συνάρτηση του ζωικού είδους, της ηλικίας, του φύλλου και της γενικής τους κατάστασης τους. Από την αντίσταση του “ζώου θύματος” εξαρτάται και η ταχύτητα που θα αναπτύξει στην προσπάθεια διαφυγής του. Και βέβαια, όσο μεγαλύτερη είναι η ταχύτητα που αναπτύχθηκε από το «ζώο-θύμα», τόσο πιο σοβαρές και εκτεταμένες θα είναι και οι βλάβες που προκαλούνται κατά την συγκράτησή του. Στη μελέτη αυτή, σαφή εικόνα τραύματος συγκράτησης των ζώων θυμάτων είχαμε σε ποσοστό 67% στα ενήλικα ζώα (ζώα μεγαλύτερα των 6 μηνών), ενώ μόλις 11% σε ζώα μικρότερης ηλικίας.

4. Προσπάθεια κατάρριψης του «ζώου θύματος» και δημιουργία και άλλων δηκτικών κακώσεων από το «ζώου δράστη».

Στο στάδιο αυτό, το ζώο δράστης, έχοντας συλλάβει και συγκρατήσει το ζώο θύμα, προσπαθεί να το καταρρίψει και να του προκαλέσει δηκτικές κακώσεις σε σημαντικά για την ζωή του σημεία, κύρια στον λαιμό και τον τράχηλο, αν δεν έχει ήδη συλληφθεί από τα σημεία αυτά. Έτσι εξηγείται το γεγονός, ότι ορισμένες φορές

μικρόσωμοι σκύλοι, μπορούν να προκαλέσουν δήξεις σε θέσεις του σώματος, που βρίσκονται πολύ πιο ψηλά από το ύψος τους. Το στάδιο αυτό σε ορισμένες περιπτώσεις δεν υπάρχει, κύρια όταν το “ζώο θύμα”, μετά την σύλληψη και συγκράτηση από το “ζώο δράστη”, ξεφεύγει και απομακρύνεται τραυματισμένο.

3.5.2 Το είδος των κακώσεων που προκαλούνται από τη δήξη.

Το είδος των κακώσεων που δημιουργούνται από τη δήξη περιγράφονται αμέσως παρακάτω.

- **Τραυματικές κακώσεις από νύσσοντα όργανα.** Οι κακώσεις αυτές προκαλούνται από τους κυνόδοντες (οι βαθύτερες) και από τους τομείς (αυτές που έχουν μικρότερο βάθος).
- **Τραυματικές κακώσεις από νύσσοντα και θλώντα όργανα.** Οι κακώσεις αυτές προκαλούνται από τους προγόμφιους και γομφίους. Νύξη προκαλούν οι κορυφές των προγομφίων και των γομφίων, ενώ η υπόλοιπη μασητική επιφάνεια προκαλεί θλαστικά τραύματα.
- **Τραυματικές κακώσεις που συνοδεύονται από αποσπάσεις τεμαχίων ιστών.** Οι κακώσεις αυτές δημιουργούνται κύρια σε περιοχές όπου μεγάλες μυϊκές μάζες όπως η περιοχή των γλουτών, των μηρών και του περινέου είτε σε περιοχές όπου υπάρχουν όργανα που εξέχουν από το σώμα, όπως οι μαστοί η ουρά και τα αυτιά.
- **Θλαστικές κακώσεις.** Αυτές δημιουργούνται κύρια από τους προγόμφιους και γομφίους, χωρίς να αποκλείονται και οι τομείς ιδίως σκύλων προχωρημένης ηλικίας των οποίων η μασητική επιφάνεια γίνεται αμβλεία. Τέτοιου είδους θλαστικές κακώσεις είναι οι εκχυμώσεις, οι εκδορές, οι διασχίσεις, τα αιματώματα και οι αιμορραγικές διηθήσεις των υποδόριων ιστών, οι οποίες πολλές φορές είναι εκτεταμένες.
- **Σκελετικές κακώσεις.** Εντοπίζονται στην τραχηλική και τη θωρακική χώρα, καθώς επίσης και στα άκρα κύρια τα οπίσθια. Αφορούν κατάγματα των αυχενικών, των θωρακικών σπονδύλων και των πλευρών, κύρια σε νεαρά ζώα, καθώς επίσης των οστών κερκίδας, ωλένης, κνήμης περόνης, των μεταταρσίων, των μετακαρπίων και οστών των δακτύλων.

Τα παραπάνω είδη των δηκτικών κακώσεων σχεδόν πάντα συνυπάρχουν στο ίδιο «ζώο θύμα».

Το είδος των κακώσεων που δημιουργούνται από τη δήξη εξαρτώνται από τους παρακάτω παράγοντες

1. Το μέγεθος των δοντιών των ζώων δραστών, δηλαδή τα σωματομετρικά χαρακτηριστικά τους.(Cohle S.D 1990)

2. Την αντίσταση του ζώου θύματος, κυρίως για τη δημιουργία διασχίσεων και αποσπάσεων ιστών.(Cummins J.M. et al 2000)
3. Το σημείο στο οποίο γίνεται η δηκτική κάκωση. Σαν παράδειγμα αναφέρουμε την δήξη στο προσωπικό κρανίο, όπου δεν υπάρχουν μεγάλες μυϊκές μάζες ενώ απεναντίας υπάρχουν πολλά οστά. Το είδος λοιπόν των δηκτικών κακώσεων που θα δημιουργηθούν είναι διαφορετικό από αυτό που δημιουργείται στους γλουτούς. (Wakili N. et al 2001, Burt J.D. et al 2000, Cluroe A.D. 1995, Clark M.A et al 1991, Mottonen M. et al 1977).

3.5.3 Το σχήμα (η μορφολογία) των δηκτικών κακώσεων.

Όταν αναφερόμαστε στο σχήμα ή στη μορφολογία μιας δηκτικής κάκωσης, ουσιαστικά εννοούμε το αποτύπωμα των δοντιών του «ζώου δράστη», στο σώμα του «ζώου θύματος». Λαμβάνοντας λοιπόν υπόψη τα στοιχεία που έχουν ήδη παρατεθεί και που αναφέρονται στο μέγεθος των δοντιών και την μεταξύ τους απόσταση, μπορούμε να αποφανθούμε σε γενικές γραμμές, για τα σωματομετρικά χαρακτηριστικά των σκύλων που έχουν προκαλέσει την δήξη. (Tsokos M. et al 1999, Aksu M.N. 1996, Linklater K.A. et al 1996, Whittaker D.K. 1989) Μεγάλα εμπόδια στην προσπάθειά μας αυτή συνιστούν, το πυκνό τρίχωμα των περισσότερων ζωικών ειδών και οπωσδήποτε των αιγοπροβάτων, καθώς και το έγχρωμο δέρμα που συχνά έχουν. Γι αυτούς τους λόγους, σε πολλές περιπτώσεις, κατά την διάρκεια της επισκόπησης του σώματος ενός νεκρού ή τραυματισμένου από δήξη ζώου, μπορεί να μη γίνονται εμφανείς οι τραυματικές και οι θλαστικές κακώσεις που υπάρχουν. (ΕΙΚ.1,3). Παρεμποδίζεται λοιπόν ο προσδιορισμός του σχήματος των κακώσεων αυτών, δηλαδή η ανεύρεση του οδοντικού αποτυπώματος των ζώων δραστών. Βέβαια, κατά την διενέργεια της νεκροτομής, όπου απομακρύνεται απαραίτητα το δέρμα, μπορεί να ανεβρεθεί το οδοντικό αποτύπωμα στους υποδόριους ιστούς σαν τραυματικές και θλαστικές κακώσεις, υπό την προϋπόθεση ότι δεν υπάρχει απόσταση ιστοτεμαχίων. Όταν η δηκτική κάκωση συνοδεύεται με απόσπαση τεμαχίων ιστών από την τραυματική περιοχή, παρατηρείται αλλοίωση του σχήματός της και δυσκολία ή αδυναμία προσδιορισμού του οδοντικού αποτυπώματος.

Όσον αφορά την δυνατότητα ανεύρεσης του οδοντικού αποτυπώματος και κατεπέκταση την δυνατότητα προσδιορισμού του σχήματος των δηκτικών κακώσεων στην δική μας έρευνα, διαπιστώθηκαν τα παρακάτω:

1. Το ποσοστό των «ζώων θυμάτων» στα οποία κατέστη δυνατόν με απλή επισκόπηση (νεκροψία ή κλινική εξέταση), να βρεθεί το οδοντικό αποτύπωμα των «σκύλων δραστών», σε ορισμένα τουλάχιστον από τα τραύματα που έφεραν, ανήρχετο στο 6 %.

2. Το ποσοστό των «ζώων θυμάτων», στα οποία κατέστη δυνατόν μόνο μετά από την απομάκρυνση του δέρματος (νεκροτομή), να βρεθεί το οδοντικό αποτύπωμα των «σκύλων δραστών» ή μέρος από αυτό, σε ορισμένα τουλάχιστον από τα τραύματα που έφεραν, ανήρχετο στο 68 %. Πιο αναλυτικά στο 43% βρέθηκε το αποτύπωμα των κυνοδόντων και των τομέων ενώ στο 25% περίπου υπήρχαν κακώσεις και από τους προγόμφιους και γομφίους.

3. Το ποσοστό των «ζώων θυμάτων» στα οποία δεν κατέστη δυνατόν να βρεθεί το οδοντικό αποτύπωμα των «σκύλων δραστών» ή τουλάχιστο μέρος από αυτό, σε κανένα από τα τραύματα που έφερε, ανήρχετο στο 26 %.

3.5.4. Το βάθος των δηκτικών κακώσεων.

Το βάθος των δηκτικών κακώσεων ποικίλλει και συναρτάται άμεσα με τους παράγοντες που αναφέρονται παρακάτω.

1. Τα σωματομετρικά χαρακτηριστικά του «ζώου δράστη» που τις προκαλεί. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι μεγαλόσωμοι σκύλοι προκαλούν βαθύτερες δηκτικές κακώσεις, κύρια λόγω του μεγαλύτερου μήκους των δοντιών τους. (Ettinger S.J. 1995, Emily P.P 1993, Harvey C.E. 1993, Cohle S.D 1990).
2. Την θέση στην οποία δημιουργείται η δηκτική κάκωση. Υπάρχουν περιπτώσεις δήξεων όπου, κατά την βύθιση των δοντιών του ζώου δράστη στο σώμα του ζώου θύματος, παρεμβάλλονται σκληρά ανατομικά στοιχεία, που παίζουν τον ρόλο εμποδίων και αναστέλλουν την δημιουργία τραυμάτων μεγάλου βάθους. Τέτοιου είδους εμπόδια είναι τα οστά και το δέρμα. Σαν παράδειγμα μπορούν να αναφερθούν οι δηκτικές κακώσεις στην περιοχή του κρανίου και των άκρων, οι οποίες έχουν μικρό βάθος, λόγω της ύπαρξης των ισχυρών οστών του κρανίου και των άκρων, σχεδόν αμέσως μετά το δέρμα. (Wakili N. et al 2001, Sacks J.J,(b),1996) Αντίθετα, κακώσεις μεγάλου βάθους προκαλούνται σε περιοχές με μεγάλες μυϊκές μάζες και οστέινα τμήματα που βρίσκονται «εν τω βάθει». Τέτοιες περιοχές είναι οι γλουτοί, οι μηροί, η περιοχή της ωμοπλάτης κλπ. Όσον αφορά το ρόλο του δέρματος των ζώων θυμάτων, σαν ανατομικό στοιχείο που παρεμποδίζει τη βύθιση των δοντιών του ζώου δράστη αναφέρουμε τα παρακάτω. Η συνεκτικότητα του δέρματος εξαρτάται τόσο από το ζωικό είδος (συνεκτικότερο στα βοοειδή από ότι στα αιγοπρόβατα), όσο και από την ηλικία των ζώων θυμάτων (στα ενήλικα είναι πιο συνεκτικό από ότι στα νεότερης ηλικίας ζώα). Τέλος, στο ίδιο ζώο, υπάρχουν περιοχές όπως το περίνεο και η εσωτερική επιφάνεια των μηρών, όπου το δέρμα είναι λεπτότερο από τις υπόλοιπες.

Το βάθος μιας δηκτικής κάκωσης έχει άμεση σχέση με τη βαρύτητά της. Αυτό συμβαίνει γιατί οι μεγάλοι βάθους δηκτικές κακώσεις, κακοποιούν εκτός από τα «επιπολής» και τα «εν τω βάθει» ανατομικά στοιχεία των ζώων θυμάτων, τα οποία σημειωτέον είναι και τα ζωτικότερα. Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφέρουμε ότι σε μια δηκτική κάκωση, η κακοποίηση των εν τω βάθει οργάνων, εκτός από τις παραμέτρους που αναφέρθηκαν προηγούμενα, συναρτάται ευθέως και με τα σωματομετρικά χαρακτηριστικά του ζώου θύματος. Σαν παράδειγμα αναφέρουμε την πρόκληση δηκτικών κακώσεων από ένα μικρόσωμο σκύλο σε συγκεκριμένες θέσεις, σε ένα πρόβατο και ένα αρνί αντίστοιχα. Στο πρόβατο θα προκληθούν μικρότερης σοβαρότητας κακώσεις, από τις αντίστοιχες στο αρνί, λόγω του μεγαλύτερου μεγέθους του σώματος του πρώτου.

3.5.5 Ο αριθμός των δηκτικών κακώσεων.

Ο αριθμός των δηκτικών κακώσεων σε κάθε «ζώο θύμα», εξαρτάται από τα σωματομετρικά χαρακτηριστικά τόσο των σκύλων δραστών, όσο και αυτών των ίδιων των «ζώων θυμάτων».(Tsokos M. et al 2000, Straton E.C 1992). Παρατηρήσαμε, ότι οι μεγαλόσωμοι σκύλοι, προκαλούν κατά κανόνα, όπως και σε προηγούμενα κεφάλαια αναφέρθηκε, λιγότερες αριθμητικά δηκτικές κακώσεις, από τους αντίστοιχους μικρόσωμους. Αυτό πιστεύουμε ότι οφείλεται στο γεγονός, ότι οι δηκτικές κακώσεις που προκαλούν οι μεγαλόσωμοι σκύλοι δράστες, έχουν κατά κανόνα μεγαλύτερη βαρύτητα και κάμπτουν ευκολότερα την αντίσταση των “ζώων θυμάτων”, από τις αντίστοιχες των μικρόσωμων σκύλων. Παρατηρήσαμε επίσης, ότι τα μικρόσωμα “ζώα θύματα” έφεραν μικρότερο αριθμό δήξεων, από τα αντίστοιχα μεγαλόσωμα. Αυτό συνέβαινε γιατί ένα μεγαλόσωμο αιγοπρόβατο, απαιτεί κατά κανόνα περισσότερες δηκτικές κακώσεις για να υποκύψει, σε σχέση με ένα αντίστοιχο μικρόσωμο.

Στην δική μας εργασία, διαχωρίσαμε τα «ζώα θύματα» ανάλογα με τον αριθμό των προθανάτιων τραυμάτων που έφεραν, σε τρεις κατηγορίες. Πιο αναλυτικά:

1. Το ποσοστό των ζώων θυμάτων που έφεραν μία μόνο (προθανάτια) δηκτική κάκωση -ήταν περίπου 6%.
2. Το ποσοστό των ζώων θυμάτων που έφεραν μέχρι και πέντε (προθανάτιες) δηκτικές κακώσεις ήταν περίπου 69%.
3. Το ποσοστό των ζώων θυμάτων που έφεραν περισσότερες από πέντε (προθανάτιες) δηκτικές κακώσεις ήταν περίπου 25%.

3.5.6 Θέσεις των δηκτικών κακώσεων, και σχέση αυτών με την σοβαρότητα και την πρόγνωση για την υγεία των τραυματισμένων ζώων.

Θέσεις των δηκτικών τραυματικών κακώσεων, ονομάζονται τα διάφορα σημεία του σώματος, όπου αυτές παρατηρούνται. Η θέση στην οποία δημιουργείται μια δηκτική κάκωση, είναι ιδιαίτερης σημασίας και έχει άμεση σχέση με την βαρύτητα της κάκωσης. Προσδιορίζοντας τη θέση μιας κάκωσης, μπορούμε να αποφανθούμε για την σχέση της με τον θάνατο του θύματος (αν αυτό είναι νεκρό) ή να πιθανολογήσουμε για την πρόγνωση και την εξέλιξη τόσο της ίδιας της κάκωσης, όσο και για την επίπτωση που αυτή θα έχει, στην υγεία και τη ζωή του θύματος (αν αυτό είναι ζωντανό). Οι θέσεις των δηκτικών κακώσεων εξαρτώνται άμεσα από τις παρακάτω παραμέτρους:

- Από τα σωματομετρικά χαρακτηριστικά του “ζώου δράστη”. Οι μεγαλόσωμοι σκύλοι, προκαλούν δηκτικές κακώσεις σε πιο ψηλά σημεία του σώματος των θυμάτων τους (κρανίο, τράχηλο, λαιμό, ράχη, οσφύ κ.λ.π.) από τους αντίστοιχους μικρόσωμους σκύλους, οι οποίοι προκαλούν δήξεις σε χαμηλότερα σημεία (μαστούς, μηρούς, άκρα).
- Από τα σωματομετρικά χαρακτηριστικά του θύματος και την αναλογία που έχουν με τα αντίστοιχα του δράστη. Η θέση της δηκτικής κάκωσης έχει άμεση σχέση με το μέγεθος και κυρίως με το ύψος, του ζωικού είδους στο οποίο ανήκει το θύμα, αν δηλαδή το θύμα είναι άνθρωπος, βοοειδής ή αιγοπρόβατο. Μεταξύ θυμάτων του ίδιου είδους, σημασία για την θέση της δήξης έχει το αν ένα θύμα είναι ψηλότερο από ένα άλλο. Το ύψος στο ίδιο ζωικό είδος εξαρτάται από την ηλικία, (ενήλικας άνθρωπος ή παιδί, ενήλικο πρόβατο ή αρνί, κλπ) και την σωματική διάπλαση (μεγαλόσωμα ή μικρόσωμα αιγοπρόβατα). Σε 35 περιπτώσεις πρόκλησης δηκτικών κακώσεων από σκύλους σε παιδιά από 8 μηνών έως 17 χρόνων, 25 παιδιά (71%) είχαν κακώσεις που αφορούσαν την περιοχή της κεφαλής και του λαιμού, οι οποίες σε 9 περιπτώσεις ήταν λόγω θέσης απειλητικές για τη ζωή τους. Τα υπόλοιπα 10 παιδιά (29%) έφεραν κακώσεις σε άλλα σημεία του σώματός τους. (Calkins C. et al 2001).
- Από την εκπαίδευση που έχει πάρει ο σκύλος δράστης. Η θέση επίσης της δηκτικής κάκωσης, έχει άμεση σχέση με την εκπαίδευση που έχει πάρει ο σκύλος. Παρατηρήσαμε, ότι οι κυνηγετικοί σκύλοι προκαλούσαν πολύ συχνά, εκτός των άλλων δήξεων και δήξεις στη νεφρική χώρα. Οι ποιμενικοί σκύλοι, που έχουν εκπαιδευτεί στη σύλληψη των αιγοπροβάτων, προκαλούσαν αντίστοιχες κακώσεις στην περιοχή της κνήμης, του ταρσού και των μεταταρσίων.

Στο σημείο αυτό και πριν προχωρήσουμε στην αναφορά των θέσεων των δηκτικών κακώσεων ανά περιοχή του σώματος των αιγοπροβάτων, να δούμε τι γίνεται στις αντίστοιχες περιοχές του σώματος του ανθρώπου. Το ποσοστό

πρόκλησης δηκτικών κακώσεων ανά περιοχή του ανθρώπινου σώματος (Talan D.A., et al, 1999) είναι:

- **Περιοχή της κεφαλής: 16%.**
- **Περιοχή του λαιμού και του τραχήλου: 2%.**
- **Περιοχή των ώμων, του βραχίονα και του αντιβραχίου: 12%**
- **Περιοχή της άκρας χειρός: 50%.**
- **Περιοχή των ποδών (εκτός από τον άκρο πόδα): 16%**
- **Περιοχή του πέλματος: 4%.**

Η κατανομή των δηκτικών κακώσεων στο ανθρώπινο σώμα, οφείλεται κατά κύριο λόγο στην όρθια στάση που αυτό έχει φυσιολογικά. Ο άνθρωπος λοιπόν, λόγω της όρθιας στάσης που έχει το σώμα του, εμφανίζει τις ευαίσθητες και ζωτικές του περιοχές (λαιμός, τράχηλος, κεφάλι, κλπ), πολύ ψηλότερα από το ύψος των σκύλων. Συνεπώς οι δηκτικές κακώσεις στις περιοχές αυτές προκαλούνται δυσκολότερα από τις αντίστοιχες σε ζώα, με σωματομετρικά μεγέθη αντίστοιχα των αιγοπροβάτων. (Burt J.D. et al 2000, Calkins C.M. et al 2001, Fourie L. 1995). Επιπλέον, ο άνθρωπος διαθέτει ισχυρούς και ευέλικτους αμυντικούς μηχανισμούς όπως τα χέρια και τα πόδια, τα οποία μπορούν με επιτυχία να προστατεύσουν τα ζωτικά σημεία του σώματος από τις δήξεις. (Grant I. et al 2000, Brandenburg M.A et al 2000, Aslam A. et al 1999, Dire D.J et al 1994).

Όταν τα σαρκοφάγα ζώα και ιδιαίτερα τα κυνοειδή, επιτεθούν σε άλλα ζώα και ιδιαίτερα σε ζώα με σωματομετρικά χαρακτηριστικά όπως των αιγοπροβατοειδών, έχουν σαν κύριο στόχο τους, την πρόκληση δήξεων στην περιοχή του αυχένα και του λαιμού. Βέβαια, αυτό δεν είναι πάντα εφικτό, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις που μικρόσωμοι σκύλοι καταδιώκουν μεγάλωσμο

αιγοπρόβατα. Έτσι, αρκούνται να δημιουργήσουν δηκτικές κακώσεις σε σημεία του σώματος των αιγοπροβάτων, που είναι αντίστοιχα με το ύψος τους και όχι αναγκαστικά στην περιοχή του τραχήλου και του λαιμού.

Τα στάδια της όλης διαδικασίας της επίθεσης, όπως και σε προηγούμενα σημεία της μελέτης έχει αναφερθεί είναι:

- Το στάδιο της καταδίωξης.
- Το στάδιο της σύλληψης και συγκράτησης του “ζώου θύματος”.
- Το στάδιο της κατάρριψης. Στο στάδιο αυτό, το “ζώο δράστης” έχοντας συλλάβει και συγκρατήσει το “ζώο θύμα”, προσπαθεί να το καταρρίψει και να του προκαλέσει δηκτικές κακώσεις σε σημαντικά για την ζωή του σημεία, κύρια στον λαιμό και τον τράχηλο, αν δεν έχει ήδη συλληφθεί από τα σημεία αυτά. Έτσι εξηγείται το γεγονός, ότι ορισμένες φορές μικρόσωμοι

σκύλοι, μπορούν να προκαλέσουν δήξεις σε θέσεις του σώματος, που βρίσκονται πολύ πιο ψηλά από το ύψος τους. Το στάδιο αυτό σε ορισμένες περιπτώσεις δεν υπάρχει, κύρια όταν το “ζώο θύμα”, μετά την σύλληψη

- και συγκράτηση από το “ζώο δράστη”, ξεφεύγει και απομακρύνεται τραυματισμένο.

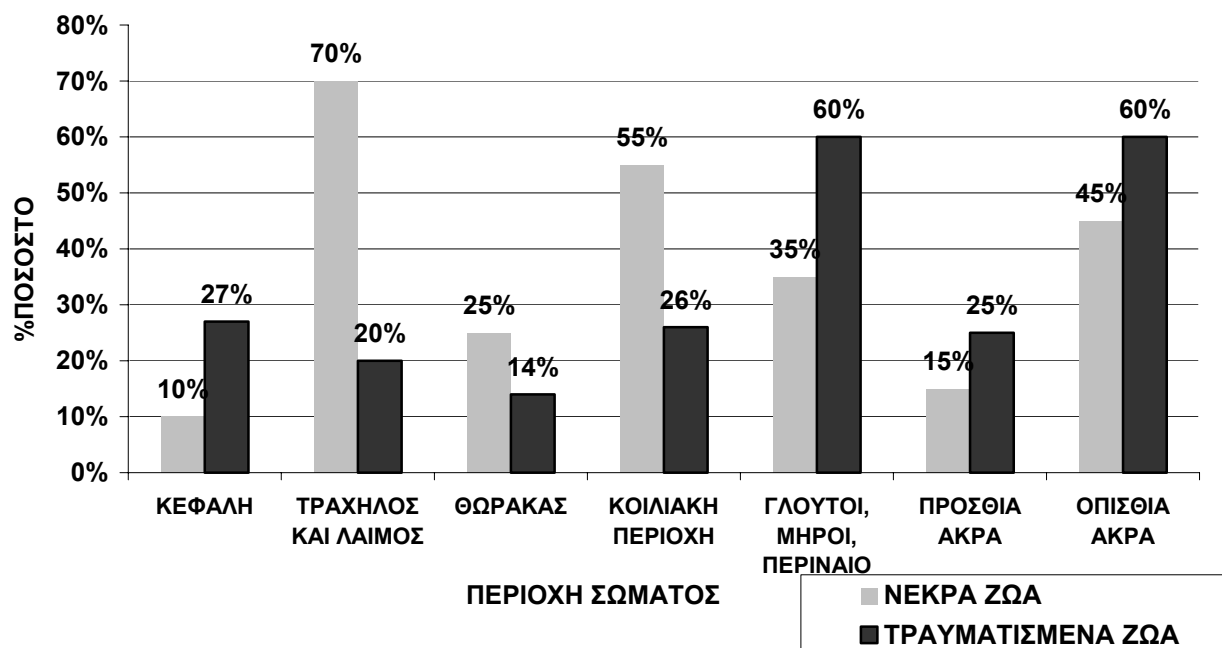
Επίσης, όπως αναφέρθηκε προηγούμενα, ο αριθμός των “ζώων θυμάτων” με μία μόνο δηκτική κάκωση είναι πολύ μικρός, σε αντίθεση με τον αριθμό των “ζώων θυμάτων”, με περισσότερες δηκτικές κακώσεις. Αντίθετα στον άνθρωπο, στις περισσότερες περιπτώσεις δήξεων, ο αριθμός των προκαλούμενων δηκτικών κακώσεων είναι πολύ μικρός.

Οι δηκτικές τραυματικές κακώσεις που μας απασχόλησαν, εντάχθηκαν σε κατηγορίες, ανάλογα με τη θέση τους, δηλαδή την ανατομική περιοχή στην οποία προκλήθηκαν και σχολιάζονται αμέσως παρακάτω. Τα ποσοστά % που αναφέρονται σε κάθε περιοχή τραυματισμού, αφορούν τις δηκτικές τραυματικές κακώσεις που παρατηρήθηκαν στην συγκεκριμένη περιοχή, ανεξάρτητα από την συνύπαρξη δηκτικών κακώσεων και σε άλλες περιοχές του σώματος.

ΠΙΝΑΚΑΣ 9 : Ποσοστό (%) ανεύρεσης των δηκτικών τραυματικών κακώσεων ανά περιοχή του σώματος, σε νεκρά και ζωντανά ζώα θύματα.

ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΡΑΥΜΑΤΟΣ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΑΝΕΥΡΕΣΗΣ ΤΡΑΥΜΑΤΩΝ ΣΕ ΝΕΚΡΑ ΖΩΑ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΑΝΕΥΡΕΣΗΣ ΤΡΑΥΜΑΤΩΝ ΣΕ ΖΩΝΤΑΝΑ ΖΩΑ
ΚΕΦΑΛΗ	10 %	27%
ΤΡΑΧΗΛΟΣ ΚΑΙ ΛΑΙΜΟΣ	70 %	20%
ΘΩΡΑΚΑΣ	25%	14%
ΚΟΙΛΙΑΚΗ ΚΟΙΛΟΤΗΤΑ	55%	26%
ΓΛΟΥΤΟΙ, ΜΗΡΟΙ, ΠΕΡΙΝΕΟ	35%	60%
ΠΡΟΣΘΙΑ ΑΚΡΑ	15%	25%
ΟΠΙΣΘΙΑ ΑΚΡΑ	45%	60%

%ΠΟΣΟΣΤΟ ΤΩΝ ΔΗΚΤΙΚΩΝ ΚΑΚΩΣΕΩΝ ΑΝΑ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΟΥ ΣΩΜΑΤΟΣ ΣΕ ΝΕΚΡΑ ΚΑΙ ΖΩΝΤΑΝΑ ΖΩΑ



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 1: Ποσοστό (%) των δηκτικών κακώσεων, ανά περιοχή του σώματος.

1. Δηκτικές κακώσεις στην περιοχή της κεφαλής. (ΕΙΚ. 9, 12, 13, 14.)

Οι δηκτικές κακώσεις που γίνονται από σκύλους στην περιοχή της κεφαλής, δεν θεωρούνται κατά κανόνα επικίνδυνες για την ζωή των ενηλίκων αιγοπροβάτων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο εγκέφαλος προστατεύεται από τα πολύ ισχυρά οστά της κεφαλής, καθώς και τα κέρατα (στις περιπτώσεις όπου υπάρχουν) και έτσι γίνεται σχεδόν αδύνατη η διάτρηση του κρανίου και η πλήξη του εγκεφάλου. Διάτρηση του κρανίου από τα δόντια των «σκύλων δραστών», είναι δυνατόν να παρατηρηθεί μόνο σε πολύ νεαρά αιγοπρόβατα (ηλικίας μέχρι 3-5μηνών) και αυτό σπάνια.

Στον άνθρωπο, 16% περίπου των δηκτικών κακώσεων που προκαλούνται από σκύλους, εντοπίζονται στην περιοχή της κεφαλής. Η δήξη στο κρανίο του ανθρώπου, μπορεί να προκαλέσει από απλές τραυματικές και θλαστικές κακώσεις, μέχρι κατάγματα ή διάτρηση των οστών του κρανίου, συνοδευόμενες από σοβαρές εγκεφαλικές βλάβες, τραυματικής ή μικροβιακής (μηνιγγίτιδα) αιτιολογίας. Ευτυχώς, η όρθια στάση του ανθρωπίνου σώματος, εμποδίζει την συχνότερη πρόκληση δήξεων στην ευαίσθητη περιοχή της κεφαλής. (Mason A. et al 2000, Burt J.D. et al 2000, Calkins C. M. et al 2001, Fourie L. 1995).

A) Νεκρά ζώα.

Τόπος: Κυρίως στο προσωπικό κρανίο (Μύες: μετωπιαίος, δακρυϊκός, ανελκτήρας του άνω χείλους και της ρινός, μασητήρας, σφιγκτήρας του στόματος),

Συχνότητα: Αφορούν το 10% περίπου των περιπτώσεων.

Συνύπαρξη: Σχεδόν σταθερή με τραυματικές κακώσεις σε άλλες περιοχές.

Σχόλια: Οι δηκτικές αυτές κακώσεις δημιουργούνται κύρια, όταν ο σκύλος δράστης ήταν μεγαλόσωμης φυλής και το ζώο θύμα μικρού ύψους (μικρόσωμο ή νεαρής ηλικίας).

B) Τραυματισμένα (ζωντανά) ζώα.

Τόπος: Κυρίως στο προσωπικό κρανίο και στα πτερύγια των αυτιών.

Συχνότητα: Αφορούν το 27% περίπου των περιπτώσεων.

Συμπτώματα: Η συμπτωματολογία ποικίλλει, ανάλογα με τα σημεία στα οποία εντοπίζονται οι τραυματικές κακώσεις. Έτσι μπορεί να παρατηρηθούν μικρής έντασης αιμορραγίες, ρινορραγία, δυσκολία στη μάσηση λόγω των κακώσεων, οίδημα κύρια στην μεσογνάθια χώρα, προβλήματα όρασης όταν συνυπάρχουν κακώσεις στους οφθαλμούς κλπ.

Αλλοιώσεις: Τραυματικές και θλαστικές κακώσεις των μαλακών ιστών, κατάγματα της κάτω γνάθου, των οστών του κρανίου (σπάνια στα αιγοπρόβατα και μόνο σε μικρής ηλικίας ζώα, ενώ συχνότερα στον άνθρωπο), αποκοπή του πτερυγίου του ωτός, καταστροφή του οφθαλμού. (Mason A et al 2000, Fourie L. 1995).

Συνύπαρξη: Σχεδόν σταθερή με τραυματικές κακώσεις σε άλλες περιοχές.

Πρόγνωση: Οι κακώσεις αυτές, είχαν κατά κανόνα καλή πρόγνωση και εξέλιξη, αν φυσικά δεν είχε τραυματιστεί κάποιο όργανο όπως π.χ τα μάτια.

Σχόλια: Οι δηκτικές αυτές κακώσεις δημιουργούνται στα αιγοπρόβατα, κύρια, όταν ο σκύλος δράστης ήταν μεγαλόσωμης φυλής και το ζώο θύμα μικρού ύψους (μικρόσωμο ή νεαρής ηλικίας).

2. Περιοχή του τραχήλου και του λαιμού. (ΕΙΚ. 4, 8, 9, 10, 14, 15, 16.)

Οι δηκτικές κακώσεις που δημιουργούνται στην περιοχή του τραχήλου και του λαιμού των αιγοπροβάτων, θεωρούνται οι πιο επικίνδυνες για την ζωή τους. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι στην συγκεκριμένη περιοχή υπάρχουν ανατομικά στοιχεία, απαραίτητα για την διατήρηση της ζωής, όπως μεγάλα αγγεία (καρωτίδες και σφαγιτίδες), η τραχεία, στοιχεία του περιφερικού νευρικού συστήματος (νεύρα), αλλά και του κεντρικού (αυχενική μοίρα του νωτιαίου μυελού). Οι κακώσεις λοιπόν σε μια τόσο σοβαρή ανατομική περιοχή, οδηγούν τις περισσότερες φορές στο θάνατο τα “ζώα θύματα”.(Calkins C. et al 2001, Tedeschi C. et al 1977). Τα στοιχεία της μελέτης αυτής, έδειξαν ότι οι δηκτικές κακώσεις στην περιοχή του τραχήλου και του λαιμού των ενηλίκων αιγοπροβάτων, δημιουργήθηκαν κύρια από “σκύλους δράστες” μεγαλόσωμων φυλών. Στα νεαρά όμως αιγοπρόβατα (αμνοερίφια), λόγω του μικρότερου ύψους τους, δημιουργήθηκαν τόσον από μικρόσωμους όσον και από μεγαλόσωμους σκύλους. Όσον αφορά τις δηκτικές κακώσεις που δημιουργούνται στον άνθρωπο στην περιοχή του τραχήλου και του λαιμού, αυτές λόγω της όρθιας

στάσης του ανθρωπίνου σώματος, είναι πολύ σπανιότερες στους ενήλικες. Αντίθετα, η συχνότητα τραυματισμού της περιοχής του τραχήλου και του λαιμού από δήξη, στα παιδιά, είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη στους ενήλικες. Στον άνθρωπο όπως και στα ζώα, η παραπάνω περιοχή θεωρείται από τις πιο σημαντικές για την ζωή του και κατά συνέπεια οι δηκτικές κακώσεις που προκαλούνται στην περιοχή αυτή, θεωρούνται κατά κανόνα πολύ σοβαρές. (Wass A. R. et al 1996, Kramer R. W. et al 1996, Tuggle D.W. 1993, Langley J. 1992).

A) Νεκρά ζώα.

Τόπος: Λαιμός και τράχηλος (Μύες: αυχενική μοίρα του τραπεζοειδούς, βραχιονοκεφαλικός, ωμοτραχηλικός, στερνοκεφαλικός).

Συχνότητα: Αφορούσαν το **70%** περίπου των περιπτώσεων.

Συνύπαρξη: Στο 60% των περιπτώσεων συνυπήρχαν με τραυματικές κακώσεις σε άλλες περιοχές.

Σχόλια: Οι κακώσεις ξεκινούσαν από απλούς μώλωπες και εκδορές και κατέληγαν σε μεγάλα ανοικτά τραύματα του λαιμού με τραυματική τραχειοτομία και κακώσεις στα μεγάλα αγγεία της περιοχής, με αποτέλεσμα την δημιουργία σοβαρής αιμορραγίας.

B) Τραυματισμένα (ζωντανά) ζώα.

Τόπος: Λαιμός και τράχηλος.

Συχνότητα: Αφορούσαν το **20%** περίπου των περιπτώσεων.

Συμπτώματα: Κατά κανόνα τα συμπτώματα είναι εμφανή, η γενική κατάσταση του ζώου είναι κακή και συνοδεύεται τις περισσότερες φορές με κατάκλιση, οίδημα τοπικό, δύσπνοια, σιαλόρροια και συχνά ραιβόκρανο. Σε πιο σπάνιες περιπτώσεις παρατηρούσαμε τραυματική τραχειοτομία.

Συνύπαρξη: Συνυπήρχαν με τραυματικές κακώσεις σε άλλες περιοχές.

Πρόγνωση: Τα τραύματα αυτά, είχαν στο 90% των περιπτώσεων κακή πρόγνωση. Στις περιπτώσεις επιβίωσης των ζώων για κάποιο χρονικό διάστημα, εμφανιζόταν οίδημα της περιοχής και ραιβόκρανο.

Σχόλια: Οι κακώσεις ξεκινούσαν από απλούς μώλωπες και εκδορές και σε πιο σπάνιες περιπτώσεις κατέληγαν σε μεγάλα ανοικτά τραύματα του λαιμού, με τραυματική τραχειοτομία.

3. Περιοχή του θώρακα. (ΕΙΚ. 2, 4, 5, 6, 10.)

Στην περιοχή αυτή, εντάσσονται οι κακώσεις της ραχιαίας μοίρας του θώρακα, που περιλαμβάνει την περιοχή όλων των θωρακικών σπονδύλων, με τους αντίστοιχους μύες που βρίσκονται εκεί. Επίσης, εντάσσονται οι κακώσεις των πλευρικών μοιρών του θώρακα, που ξεκινούν από το ύψος της πρώτης και φτάνουν στο ύψος της τελευταίας πλευράς, χωρίς να συμπεριλαμβάνουν τις κακώσεις που

δημιουργούνται στους μύες της ωμοπλάτης (που εντάσσεται στην περιοχή των πρόσθιων άκρων). Ο θώρακας περικλείει και προστατεύει όργανα ζωτικής σημασίας, όπως την καρδιά και τους πνεύμονες. Ευτυχώς, τα ανατομικά στοιχεία που τον απαρτίζουν, δηλαδή οι πλευρές, οι μύες που καλύπτουν την περιοχή, το στέρνο και στα ζώα η ωμοπλάτη, με την μυϊκή στοιβάδα που την καλύπτει, συνιστούν σοβαρότατα εμπόδια για την κακοποίηση των οργάνων που προαναφέρθηκαν. Παρόλα αυτά, στην περιοχή του θώρακα, δημιουργούνται δηκτικές κακώσεις, οι οποίες κύρια στα νεαρά αιγοπρόβατα (αμνοερίφια) είναι σοβαρές, γιατί προκαλούνται κακώσεις τόσο στα τοιχώματα του θώρακα, όσο και στους πνεύμονες. Στον άνθρωπο, λόγω της ύπαρξης των χεριών, που δρουν σαν όργανα άμυνας, σπάνια παρατηρούνται δηκτικές κακώσεις στην περιοχή του θώρακα (Talan D.L et al 1999).

A) Νεκρά ζώα.

Τόπος: Κύρια στη ραχιαία επιφάνεια του θώρακα (Μύες: πλατύς ραχιαίος, ραχιαία μοίρα του τραπεζοειδούς).

Συχνότητα: Αφορούσαν το **25%** περίπου των περιπτώσεων.

Συνύπαρξη: Συνυπήρχαν σταθερά με τραυματικές κακώσεις σε άλλες περιοχές.

Σχόλια: Οι τραυματικές κακώσεις ξεκινούσαν από απλούς μώλωπες και εκδορές στο δέρμα και τον μυϊκό ιστό της περιοχής και σε ορισμένες περιπτώσεις, κύρια σε νεαρά ζώα (αμνοερίφια), κατέληγαν σε βαθιά τραύματα, κατάγματα των πλευρών και αιμοθώρακα.

B) Τραυματισμένα (ζωντανά) ζώα.

Τόπος: Κύρια στη ραχιαία επιφάνεια του θώρακα .

Συχνότητα: Αφορούσαν το **14%** περίπου των περιπτώσεων.

Συμπτώματα: Στα επιφανειακά τραύματα τα οποία απαντώνταν συχνότερα στην περιοχή αυτή, δεν εμφανιζόταν ειδικά συμπτώματα, εκτός από δυσκολία στην κίνηση λόγω τραυματικού άλγους, η οποία εκδηλωνόταν σαν μικρού βαθμού χωλότητα στα πρόσθια άκρα. Απεναντίας, ειδικά συμπτώματα παρατηρούταν στις περιπτώσεις βαθιών τραυμάτων που είχαν σαν αποτέλεσμα την δημιουργία καταγμάτων, αιμοθώρακα κλπ. Ευτυχώς τα τελευταία σπάνια απαντώνταν σε ζωντανά τραυματισμένα ζώα.

Συνύπαρξη: Συνυπήρχαν σταθερά με τραυματικές κακώσεις σε άλλες περιοχές.

Πρόγνωση: Καλή σε επιφανειακά τραύματα, επιφυλακτική έως δυσμενής σε βαθύτερα, λόγω κάκωσης των πλευρών και των πνευμόνων.

Σχόλια: Οι τραυματικές κακώσεις που συνήθως απαντιόταν σε ζωντανά ζώα ήταν μώλωπες και εκδορές στο δέρμα και τον μυϊκό ιστό της περιοχής. Βαθιά τραύματα, κατάγματα των πλευρών και συμπτωματολογία πνευμοθώρακα τραυματικής αιτιολογίας ή αιμοθώρακα, σπάνια απαντώνταν σε ζωντανά τραυματισμένα ζώα.

4. Περιοχή του κύτους της κοιλίας. (ΕΙΚ. 2, 4, 6, 7.)

Η δημιουργία δηκτικών κακώσεων στην περιοχή του κύτους της κοιλίας, ήταν πολύ συχνές στα αιγοπρόβατα που εξετάσαμε. Το γεγονός αυτό οφείλεται, στο ότι η παραπάνω περιοχή, είναι εύκολα προσιτή τόσο σε μεγάλωσους, όσο και σε μικρόσωμους “σκύλους δράστες”. Το κύτος της κοιλίας ξεκινά από την περιοχή του διαφράγματος και εκτείνεται σε μήκος, προς τα πίσω, μέχρι την πύελο. Το ύψος του εκτείνεται από τη λευκή γραμμή της κοιλίας, έως το σώμα και τις εγκάρσιες αποφύσεις των οσφυϊκών σπονδύλων. Είναι φανερό, ότι η περιοχή αυτή, πέραν των μυών που σχηματίζουν τα τοιχώματά της, δεν έχει οστέινο σκελετό, στο μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειάς της, για να προστατεύεται από εξωτερικούς τραυματισμούς.

A) Νεκρά ζώα.

Τόπος: Κύρια στην περιοχή των κενεώνων και στη νεφρική χώρα (Μύες: έξω λοξός κοιλιακός, έσω λοξός κοιλιακός, τείνων την πλατεία περιτονία).

Συχνότητα: Αφορούσαν το **55%** περίπου των περιπτώσεων.

Συνύπαρξη: Συνυπήρχαν σταθερά με τραυματικές κακώσεις σε άλλες περιοχές κύρια στις περιοχές των γλουτών, των μηρών και του περινέου .

Σχόλια: Οι τραυματικές κακώσεις ξεκινούσαν από απλές εκδορές και κατέληγαν σε βαθιά τραύματα, με κακώσεις της νεφρικής περιοχής, τραύματα στους νεφρούς και των ρήξεις των αγγείων. Επίσης, σε ορισμένες περιπτώσεις, παρατηρήθηκαν βαθιά τραύματα στους μύες των κοιλιακών τοιχωμάτων, κύρια της περιοχής του κενεώνα, με αποτέλεσμα την έξοδο εντερικών ελίκων από το σώμα. Η εμφάνιση περιτονίτιδας στις τελευταίες περιπτώσεις ήταν σταθερή.

B) Τραυματισμένα (ζωντανά) ζώα.

Τόπος: Κύρια στην περιοχή των κενεώνων και στη νεφρική χώρα.

Συχνότητα: Αφορούσαν το **26%** περίπου των περιπτώσεων.

Συμπτώματα: Οι τραυματικές κακώσεις ξεκινούσαν από απλές εκδορές και σε ορισμένες περιπτώσεις κατέληγαν σε βαθιά τραύματα με κακώσεις των νεφρών και των αγγείων της νεφρικής περιοχής

Συνύπαρξη: Συνυπήρχαν σταθερά με τραυματικές κακώσεις σε άλλες περιοχές κύρια στις περιοχές των γλουτών, των μηρών και του περινέου .

Πρόγνωση: Επιφυλακτική έως δυσμενής κύρια σε βαθιά τραύματα, λόγω μόλυνσης του περιτοναίου και αιμορραγίας, συνήθως μετά από κακώσεις των νεφρών και των αγγείων της νεφρικής περιοχής (δημιουργία εξωπεριτοναϊκών αιμορραγικών συλλογών).

5. Περιοχή των γλουτών, των μηρών και του περινέου. (ΕΙΚ. 4, 7, 11.)

Η περιοχή αυτή , μαζί με τις αντίστοιχες των οπισθίων άκρων και του λαιμού, συγκεντρώνουν τα μεγαλύτερα ποσοστά πρόκλησης δηκτικών κακώσεων στα αιγοπρόβατα. Είναι η οπισθιώτερη περιοχή του σώματος των αιγοπροβάτων, μακριά από τα όργανα άμυνάς τους (κέρατα) και επιπλέον κατά την διάρκεια της καταδίωξης, εκτίθεται συνεχώς στους “σκύλους δράστες” των δήξεων. Στον άνθρωπο, το 16% περίπου των δηκτικών κακώσεων δημιουργούνται στην περιοχή των γλουτών και των μηρών. Αντίθετα η περιοχή του περινέου και των εξωτερικών γεννητικών οργάνων του ανθρώπου, σπάνια υπόκειται σε δήξη. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι στην Αλαμπάμα των Η.Π.Α., το χρονικό διάστημα από το 1991 έως το 1999, παρατηρήθηκαν 7 περιπτώσεις δήξης στο όσχεο. Από αυτές 4 αφορούσαν ενήλικες και 3 παιδιά, 3-5 ετών. (Cummings J. M. et al 2000). Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι, παρά τα όσα προαναφέρθηκαν για την πρόκληση δήξεων στην περιοχή των γλουτών, των μηρών και του περινέου, στον άνθρωπο, η μεταθανάτια προσβολή της παραπάνω περιοχής από σκύλους είναι συχνότατη . (Tsokos M. et al 1999).

A) Νεκρά ζώα.

Τόπος: Κύρια στην περιοχή των μυών ημιτενοντώδους, ημιμυενώδους και δικέφαλου μηριαίου.

Συχνότητα: Αφορούσαν το **35%** περίπου των περιπτώσεων.

Συνύπαρξη: Συνυπήρχαν σταθερά με τραυματικές κακώσεις σε άλλες περιοχές κύρια στις περιοχές του κύτους της κοιλίας, του τραχήλου και του λαιμού.

Σχόλια: Οι τραυματικές κακώσεις ξεκινούσαν από απλές εκδορές και κατέληγαν σε βαθιά τραύματα με κακώσεις τόσο στα επιπολής και εν τω βάθει ανατομικά μέρη της περιοχής των γλουτών και των μηρών, όσον και στο αιδού, τον κόλπο και τον πρωκτό.

B) Τραυματισμένα (ζωντανά) ζώα.

Τόπος: Κύρια στην περιοχή των μυϊκών μαζών των γλουτών και των μηρών.

Συχνότητα: Αφορούσαν το **60%** περίπου των περιπτώσεων.

Συμπτώματα: Ανάλογα με την θέση και την βαρύτητα των τραυμάτων εμφανιζόταν από ελαφρά δυσκινησία των οπισθίων άκρων έως αδυναμία ανέγερσης και μετακίνησης των τραυματισμένων ζώων.

Συνύπαρξη: Συνυπήρχαν ορισμένες φορές με τραυματικές κακώσεις σε άλλες περιοχές.

Πρόγνωση: Καλή σε τραύματα των μυϊκών μαζών των γλουτών και των μηρών, επιφυλακτική έως δυσμενής σε τραύματα του περινέου.

Σχόλια: Οι τραυματικές κακώσεις ξεκινούσαν από απλές εκδορές και σε ορισμένες περιπτώσεις κατέληγαν σε βαθιά τραύματα με κακώσεις τόσο στα επιπολής και εν

τω βάθει ανατομικά μόρια της περιοχής των γλουτών και των μηρών, όσον και στα εξωτερικά χείλη του αιδοίου και τον πρωκτό.

6. Περιοχή των πρόσθιων άκρων. (ΕΙΚ. 7, 10.)

Στις δηκτικές κακώσεις της περιοχής των πρόσθιων άκρων, συμπεριλάβαμε και τις δηκτικές κακώσεις της περιοχής της ωμοπλάτης. Η περιοχή της ωμοπλάτης, δεν ανήκει μεν ανατομικά στα πρόσθια άκρα, αλλά αποτελεί ουσιαστικά την προς το σώμα των ζώων, προέκταση αυτών. Συνεπώς, κατά την δημιουργία των δηκτικών κακώσεων, οι παραπάνω περιοχές θεωρούνται ότι αποτελούν για τους “σκύλους δράστες” ενιαίο στόχο. Γενικώς τα πρόσθια άκρα, δεν θεωρούνται στόχος επιλογής για τους “σκύλους δράστες”. Παρατηρήθηκαν λοιπόν μικρά ποσοστά δημιουργίας δηκτικών κακώσεων, οι οποίες συνυπήρχαν σταθερά με κακώσεις σε άλλα σημεία του σώματος των αιγοπροβάτων. Αντίθετα στον άνθρωπο, η παροχή των χεριών και κύρια της άκρας χειρός, παρουσιάζει μεγάλη συχνότητα εμφάνισης δηκτικών κακώσεων.(Brandenburg M.A. et al 2000, Grant I. et al 2000). Αυτό βέβαια δικαιολογείται γιατί τα χέρια χρησιμοποιούνται από τον άνθρωπο σαν όργανα άμυνας, εναντίων των σκύλων που επιτίθενται. (Aslam A. et al 1999, Robinson W.A 1992).

A) Νεκρά ζώα.

Τόπος: Κύρια στην περιοχή των μυών δικέφαλου βραχιόνιου, πρόσθιου βραχιόνιου, πρόσθιου εκτείνοντος τον καρπό εκτείνων τον έσω δάκτυλο και ωλένιο. Επίσης στους μύες της ωμοπλάτης.

Συχνότητα: Αφορούσαν το **15%** περίπου των περιπτώσεων.

Συνύπαρξη: Συνυπήρχαν σταθερά με τραυματικές κακώσεις σε άλλες περιοχές κύρια του τραχήλου και του λαιμού.

Σχόλια: Οι τραυματικές κακώσεις στην παραπάνω περιοχή ξεκινούσαν από απλές εκδορές και κατάληγαν σε βαθιά τραύματα, τα οποία συνοδευόταν αρκετές φορές με κατάγματα κύρια της κερκίδας της ωλένης και των οστών των μετακαρπίων. Προκαλούνται κύρια από μικρόσωμους σκύλους - δράστες.

B) Τραυματισμένα (ζωντανά) ζώα.

Τόπος: Κύρια στην περιοχή των μυϊκών μαζών της περιοχής.

Συχνότητα: Αφορούσαν το **25%** περίπου των περιπτώσεων.

Συμπτώματα: Χωλότητα διάφορου βαθμού, που προερχόταν είτε από τα τραύματα των μαλακών ιστών είτε από τα κατάγματα των οστών των άκρων.

Συνύπαρξη: Συνυπήρχαν σταθερά με τραυματικές κακώσεις σε άλλες περιοχές κύρια στις περιοχές του τραχήλου και του λαιμού.

Πρόγνωση: Επιφυλακτική έως δυσμενής στις περιπτώσεις καταγμάτων και εξάρθρημάτων, τα οποία λόγω της δύσκολης αποκατάστασής τους στα ζώα και της

αναπηρίας που αυτά συνεπάγονται, αναγκάζουν τους κτηνοτρόφους να οδηγούν σε σφαγή-αξιοποίηση τα τραυματισμένα ζώα.

Σχόλια: Επειδή η περιοχές του αντιβραχίου του καρπού και των μετακαρπίων στερούνται μεγάλων μυϊκών μαζών, παρατηρούντο συχνά κατάγματα των οστών της περιοχής.

7. Περιοχή των οπίσθιων άκρων. (ΕΙΚ. 15)

Η περιοχή των οπίσθιων άκρων, οριοθετείται ανατομικά, από την διάρθρωση του ισχίου, ως και την τελευταία φάλαγγα των δακτύλων. Στις δηκτικές κακώσεις της περιοχής των οπίσθιων άκρων, δεν συμπεριλάβαμε και τις δηκτικές κακώσεις της περιοχής των μηρών και των γλουτών. Η περιοχές αυτές, ανήκουν μεν ανατομικά στα οπίσθια άκρα, αλλά αποτελούν ουσιαστικά, άλλο στόχο για τους «σκύλους δράστες». Συνεπώς, σαν περιοχή των οπίσθιων άκρων σε αυτή την εργασία, θεωρούμε την περιοχή από την άρθρωση του γόνατος ως και την τελευταία φάλαγγα των δακτύλων. Η περιοχή αυτή, λόγω του ότι συνιστά το οπισθιότερο ανατομικό στοιχείο του σώματος των ζώων, όπως και οι περιοχές των γλουτών και των μηρών, αποτελεί στόχο για τους «σκύλους δράστες». Δέχεται λοιπόν, μεγάλο ποσοστό δηκτικών τραυματικών κακώσεων. Επίσης, η περιοχή αυτή θεωρείται σαν κατεξοχήν περιοχή σύλληψης και συγκράτησης των «ζώων θυμάτων» από τους «σκύλους δράστες», στο στάδιο της καταδίωξης που παρατηρείται κατά την δημιουργία των δηκτικών κακώσεων.

A) Νεκρά ζώα.

Τόπος: Κύρια στην περιοχή των μυών που βρίσκονται μεταξύ της άρθρωσης του γόνατου και του ταρσού (γαστροκνήμιος, μακρός περνιαίος, εκτείνων τον έξω δάκτυλο, έξω καμπτήρας των δακτύλων).

Συχνότητα: Αφορούσαν το **45%** περίπου των περιπτώσεων.

Συνύπαρξη: Συνυπήρχαν σταθερά με τραυματικές κακώσεις σε άλλες περιοχές κύρια στις περιοχές των γλουτών, των μηρών και του περινέου, καθώς και του κύτους της κοιλίας.

Σχόλια: Οι τραυματικές κακώσεις στην παραπάνω περιοχή ξεκινούσαν από απλές εκδορές και κατάληγαν σε βαθιά τραύματα, τα οποία συνοδευόταν με απόσπαση ιστών και αρκετές φορές με κατάγματα των οστών κνήμης και μετακαρπίων. Οι τραυματικές κακώσεις στην παραπάνω περιοχή προκαλούνται κύρια από μικρόσωμους σκύλους - δράστες.

B) Ζωντανά (τραυματισμένα) ζώα.

Τόπος: Κύρια στην περιοχή των μυϊκών μαζών, που βρίσκονται μεταξύ της άρθρωσης του γόνατου και του ταρσού.

Συχνότητα: Αφορούσαν το **60%** περίπου των περιπτώσεων.

Συμπτώματα: Χωλότητα διάφορου βαθμού, αδυναμία ανέγερσης.

Συνύπαρξη: Συνυπήρχαν σταθερά με τραυματικές κακώσεις σε άλλες περιοχές κύρια στις περιοχές των γλουτών, των μηρών, του περινέου και του κύτους της κοιλίας.

Πρόγνωση: Επιφυλακτική έως δυσμενής στις περιπτώσεις καταγμάτων και εξαρθημάτων, τα οποία λόγω της δύσκολης αποκατάστασής τους στα ζώα και της αναπηρίας που αυτά συνεπάγονται, αναγκάζουν τους κτηνοτρόφους να οδηγούν σε σφαγή-αξιοποίηση τα τραυματισμένα ζώα.

Σχόλια: Παρατηρούντο συχνά κατάγματα και εξαρθήματα, λόγω της μικρής μυϊκής κάλυψης της περιοχής.

3.5.7 Βαρύτητα των δηκτικών κακώσεων.

Η βαρύτητα δηλαδή η σοβαρότητα των δηκτικών κακώσεων για την υγεία και την ζωή των «ζώων θυμάτων», είναι συνάρτηση πολλών παραγόντων, μεταξύ των οποίων πρωταρχικής σημασίας θεωρούνται οι παρακάτω:

- Οι θέσεις των κακώσεων, δηλαδή τα ανατομικά σημεία στα οποία βρίσκονται.
- Το βάθος των κακώσεων.
- Ο αριθμός των κακώσεων σε κάθε «ζώο θύμα».

Η επέλευση του θανάτου στα νεκρά ζώα, (αιτία θανάτου), εξαρτάται και συναρτάται άμεσα από τους παραπάνω παράγοντες. Επίσης, η πρόγνωση και η εξέλιξη των τραυματικών κακώσεων στα τραυματισμένα ζώα, καθορίζονται από τον συνδυασμό του αριθμού, του βάθους και της θέσης, των δηκτικών τραυματικών κακώσεων. Η λεπτομερής λοιπόν μελέτη των παραπάνω παραμέτρων, παρέχει στον πραγματογνώμονα μια καταρχήν πρόβλεψη για την βαρύτητα της κατάστασης του ζώου, αν είναι ακόμα ζωντανό, ή την αιτιώδη συνάφεια με το θάνατο που έχουν οι συγκεκριμένες δηκτικές κακώσεις, αν το ζώο είναι νεκρό. (Reick D. 1997, Clueroe A.D. 1995, Langley R.L, 1994, Anderson C.R 1992)

Στο σημείο αυτό, πρέπει να υπενθυμίσουμε τις δυσκολίες που υπάρχουν στην ανεύρεση των θέσεων και του αριθμού των δηκτικών τραυματικών κακώσεων και κατά συνέπεια στον προσδιορισμό της βαρύτητάς τους. Οι δυσκολίες αυτές αφορούν κύρια κακώσεις που δεν συνοδεύονται με απώλειες τμημάτων δέρματος, «κλειστά τραύματα» και οφείλονται κατά κύριο λόγο στην μεγάλη εριοκάλυψη ή \ και έγχρωμο δέρμα των αιγοπροβατοειδών. Επίσης στην αδυναμία λήψης ιστορικού από τον τραυματία, αφού πρόκειται περί «αλόγου» ζώου, πράγμα που δεν ισχύει στην ιατρική του ανθρώπου. Η λεπτομερής κλινική εξέταση, που οδηγεί σε σωστή αξιολόγηση τόσο της γενικής κατάστασης των τραυματισμένων ζώων, όσο και των ειδικών συμπτωμάτων που δημιουργούν οι δηκτικές τραυματικές κακώσεις (όπως π.χ οι

χωλότητες όπου και όταν παρατηρούνται), αποτελούν το «κλειδί» για την ορθή και τεκμηριωμένη εκτίμηση της βαρύτητας τους

3.5.8 Συνέπειες από τις δηκτικές κακώσεις.

Οι συνηθισμένες συνέπειες των δηκτικών κακώσεων, συνιστούνται, αφενός μεν στο **θάνατο των ζώων**, αμέσως ή λίγο αργότερα από την πρόκληση της δήξης, αφετέρου δε στη **διάφορου βαθμού αναπηρία** που προκαλούν. Οι συνέπειες αυτές εξαρτώνται άμεσα από τη φυσιολογία της κάκωσης (θέση, αριθμός, βάθος κ.λ.π.) και από το χρονικό διάστημα μεταξύ τραυματισμού και έναρξης της θεραπείας των τραυμάτων. Η αντισηψία, ο καλός καθαρισμός της περιοχής, η απομάκρυνση των νεκρωμένων ιστών, η συρραφή αν κριθεί απαραίτητη, η άμεση έναρξη της αντιβιοτικής θεραπείας και η προστασία της τραυματικής περιοχής από τα έντομα (μύγες), διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην εξέλιξη της δηκτικής κάκωσης. Δεν πρέπει τέλος να λησμονείται ο κίνδυνος της λύσσας παρά το γεγονός ότι τις τελευταίες δεκαετίες ελάχιστα περιστατικά λύσσας σε ζώα, απασχολούν την χώρα μας. (Shuman L.H. et al 2000, Μιχαλοδημητράκης Ε, 1997, Clueroe A.D. 1995, Lee K.A. 1992, Sudarshan M.K. 1995).

Στην εργασία αυτή, παρακολούθηθηκε και καταγράφηκε, η πορεία και η εξέλιξη της υγείας **422 αιγοπροβάτων**, που χαρακτηρίστηκαν σε προηγούμενα κεφάλαια σαν **«βαριά τραυματισμένα»** ζώα και των **415 αιγοπροβάτων** που χαρακτηρίστηκαν σαν **«τραυματισμένα υπό θεραπεία»** ζώα. Βαριά τραυματισμένα χαρακτηρίστηκαν τα αιγοπρόβατα τα οποία υπέκυψαν στα τραύματά τους σε χρονικό διάστημα 1-15 ημερών από την ημέρα τραυματισμού τους. Τραυματισμένα χαρακτηρίστηκαν τα αιγοπρόβατα που μετά από θεραπεία επιβίωσαν, με ή χωρίς αναπηρία. Το δείγμα αυτό των ζωντανών αλλά τραυματισμένων ζώων, επιλέχθηκε, γιατί τα ζώα που το απαρτίζουν, βρέθηκαν τραυματισμένα, αλλά ζωντανά κατά την διάρκεια της πραγματογνωμοσύνης, η οποία έγινε μέσα σε 8 ώρες το πολύ, από τον χρόνο πρόκλησης της ζημιάς. Έτσι τα τραυματισμένα αυτά ζώα, θα μπορούσαν να μας δώσουν ένα καθαρό αποτέλεσμα, για την πορεία και την εξέλιξη της υγείας τους και γενικώς για την εξέλιξη των δηκτικών κακώσεων στα αιγοπρόβατα. Το παραπάνω δείγμα των τραυματισμένων ζώων, παρακολούθηθηκε για χρονικό διάστημα περίπου ενός μηνός, στο περιβάλλον της εκτροφής του παραγωγού. Συστήθηκε θεραπευτική αγωγή και παρακολούθηθηκαν τα αποτελέσματά της. Τα τραυματισμένα ζώα τα οποία στο χρονικό αυτό διάστημα πέθαιναν, νεκροτομώταν προκειμένου να βρεθεί το αίτιο του θανάτου.

ΠΙΝΑΚΑΣ 10: Συνέπειες από τις δηκτικές κακώσεις. (Δείγμα 837 αιγοπροβάτων).

ΕΙΔΟΣ	ΒΑΡΙΑ ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΕΝΑ ΖΩΑ ΚΑΤΑΛΗΞΗ ΘΑΝΑΤΟΣ ΣΕ ΧΡΟΝΟ				ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΕΝΑ ΖΩΑ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΓΩΓΗ		
	Πρώτο 24ωρο	2 ^η -3 ^η Ημέρα	4 ^η -15 ^η Ημέρα	ΣΥΝ.	Επιβίωση Με Αναπηρία	Επιβίωση Χωρίς Αναπηρία	ΣΥΝ.
ΑΙΓΕΣ<1 ΕΤΩΝ	4	3	-	7	9	17	26
ΑΙΓΕΣ>1 ΕΤΩΝ	21	17	8	46	13	54	67
ΠΡΟΒΑΤΑ>1 ΕΤ.	43	23	12	78	26	33	59
ΠΡΟΒΑΤΑ<1 ΕΤ.	126	98	67	291	107	156	263
ΣΥΝΟΛΟ	194	141	87	422	155	260	415
% ΠΟΣΟΣΤΟ	46%	33%	21%	100%	37%	63%	100%

3.5.9 Η αιτιώδης συνάφεια των δηκτικών κακώσεων με το θάνατο των ζώων θυμάτων.

Σαν αιτιώδης συνάφεια με το θάνατο, θεωρείται η σχέση μιας κάκωσης ή ενός νεκροτομικού ευρήματος γενικότερα με τον θάνατο που έχει ήδη επέλθει. Η ανεύρεση της αιτιώδους συνάφειας αποτελεί έργο επίπονο αλλά και απαραίτητο για την υποστήριξη και κατά συνέπεια την ορθή επιστημονική και λογική τεκμηρίωση του αιτίου του θανάτου.

Θανατηφόρες θεωρούνται γενικά οι δηκτικές κακώσεις που έχουν τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

1. Η θέση τους είναι τέτοια ώστε να κακοποιούνται ανατομικές περιοχές, με όργανα ζωτικής σημασίας, όπως:
 - Περιοχή του λαιμού και του τραχήλου (κάκωση αγγείων – νεύρων).
 - Περιοχή του θώρακα (κάκωση πνευμόνων – καρδιάς).
 - Διάτρηση των κοιλιακών τοιχωμάτων (περιτονίτιδα).
2. Το βάθος τους να είναι μεγάλο, ώστε να πλήττονται και τα εν τω βάθει ζωτικής σημασίας όργανα.

(Μιχαλοδημητράκης Ε. 1997, Clueroe A.D., 1995, Cohle S.D., 1990).

Σε πραγματογνωμοσύνες που διενεργούνται σε περιπτώσεις δηκτικών κακώσεων σε ζώα, η θετική ή αρνητική συσχέτιση με τον θάνατο ενός νεκροτομικού ευρήματος και στην προκειμένη περίπτωση των κακώσεων αυτών, είναι ένα βασικό μέλημα του πραγματογνώμονα. Πιο απλά δεν μπορεί η ανεύρεση ενός δηκτικού

τραύματος σε μια μη ζωτική περιοχή όπως αυτή λόγω χάρη του μηρού, να αποτελέσει αιτία θανάτου.

3.5.10 Διαχωρισμός των προθανάτιων από τις μεταθανάτιες κακώσεις.

Ο διαχωρισμός των προθανάτιων από τις μεταθανάτιες κακώσεις, συνιστά ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα των ιατροδικαστικών επιστημών. Λεπτομέρειες για το θέμα αυτό, παρουσιάστηκαν στο πρώτο μέρος αυτής της εργασίας. Θεωρούμε, ότι ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα των πραγματογνωμοσυνών, στις περιπτώσεις δηκτικών κακώσεων, είναι η διάκριση και ο διαχωρισμός των προθανάτιων από τις μεταθανάτιες δηκτικές κακώσεις. Ως προθανάτιες κακώσεις, ορίζονται αυτές που προκαλούνται σε ζωντανό ζώο, δηλαδή πριν την επέλευση του θανάτου. Αντίθετα, μεταθανάτιες κακώσεις ονομάζονται οι κακώσεις που προκαλούνται, μετά την επέλευση του θανάτου. (Μιχαλοδημητράκης Ε., 1997, Benz P. 1994, Patel F. 1994, Joshua P.A. 1980, Raekallio J. 1972).

Έχει παρατηρηθεί και αναφέρεται στην διεθνή ιατροδικαστική βιβλιογραφία, ότι τα πτώματα ανθρώπων που εγκαταλείπονται στο φυσικό περιβάλλον ή βρίσκονται σε χώρους στους οποίους ζουν κατοικίδια ζώα και τρωκτικά, υφίστανται μεταθανάτια δηκτικές κακώσεις, σαν αποτέλεσμα της προσπάθειας των ζώων να αποσπάσουν τους ιστούς του πτώματος, για τροφή τους. Έχει παρατηρηθεί ότι οι σκύλοι προκαλούν μεταθανάτια στο ανθρώπινο πτώμα δηκτικές κακώσεις στην κοιλιακή χώρα, στον πρωκτό, στο πέος, στην πύελο, στα δάκτυλα, τη μύτη, τα αυτιά, το πρόσωπο, αλλά και σε άλλα μέρη του σώματος. Τα τρωκτικά (ποντικοί, αρουραίοι, κλπ), προξενούν μεταθανάτιες δηκτικές κακώσεις, κύρια στο πρόσωπο (μύτη και αυτιά) και την περιοχή του λαιμού. Οι γάτες, προξενούν μεταθανάτιες δηκτικές κακώσεις κύρια στο πρόσωπο, αλλά και στην κοιλιακή χώρα. Το μέγεθος των μεταθανάτιων δηκτικών κακώσεων εξαρτάται από τον χρόνο έκθεσης του πτώματος στα παραπάνω είδη ζώων. Ορισμένες φορές φτάνει μέχρι την εμφάνιση του σκελετού ενός τμήματος ή ολόκληρου του πτώματος. (Tsokos M.et al 2000, Tsokos M.et al 1999, Rothschild M.A. et al 1997).

Όλα όσα αναφέρθηκαν στην περίπτωση της μεταθανάτιας προσβολής των ανθρώπινων πτωμάτων, ισχύουν και στην περίπτωση των πτωμάτων των ζώων που εγκαταλείπονται στο περιβάλλον. Επιπλέον, τα πτώματα των ζώων τις περισσότερες περιπτώσεις, δυστυχώς, εγκαταλείπονται στο ύπαιθρο άταφα, χωρίς την παραμικρή φροντίδα περισυλλογής και ενταφιασμού τους. Έτσι, στην πράξη, τα πτώματα των ζώων που εγκαταλείπονται στο ύπαιθρο, γίνονται από την πρώτη στιγμή στόχοι από άγρια σαρκοφάγα θηλαστικά (λύκος, σκύλος, τσακάλι, αρκούδα κ.λ.π.), πτωματοφάγα πτηνά (γύπας, κοράκι, κ.λ.π.), τρωκτικά (ποντίκια) και έντομα. Η ύπαρξη λοιπόν δηκτικών κακώσεων σε πτώματα ζώων, μπορεί να έχει συμβεί

προθανάτια και να αποτελέσει το αίτιο του θανάτου ή μεταθανάτια σαν φυσικό επακόλουθο των προαναφερθέντων στοιχείων.

Εφόσον λοιπόν, διερευνούνται οι δηκτικές κακώσεις σε ένα πτώμα ζώου ή ανθρώπου, είναι καθοριστικής σημασίας, να διαχωριστούν οι προθανάτιες, που έχουν ιατροδικαστικό ενδιαφέρον για την αιτία θανάτου, από τις αντίστοιχες μεταθανάτιες. Η διάκριση των προθανάτιων από τις μεταθανάτιες κακώσεις, στηρίζεται στην τοπική αντίδραση του οργανισμού, η οποία εμφανίζεται αμέσως μετά τον προθανάτιο τραυματισμό, ενώ απουσιάζει εντελώς από τον αντίστοιχο μεταθανάτιο. Η οργανική αυτή αντίδραση περιλαμβάνει τρεις φάσεις:

- * Την άμεση αγγειοδιαστολή και στάση του αίματος στα αγγεία των γειτονικών προς το τραύμα ιστών.
- * Την εξοίδηση των γειτονικών ιστών
- * Την συσσώρευση λευκοκυττάρων στα διευρυμένα αγγεία της περιφέρειας του τραύματος και την διήθηση τους στο γειτονικό συνδετικό ιστό. Αν το τραύμα είναι σοβαρό, πράγμα πολύ συνηθισμένο, η διήθηση αυτή περιλαμβάνει και ερυθροκύτταρα.

Συμπερασματικά λοιπόν, η διάκριση μιας προθανάτιας από μια μεταθανάτια κάκωση, στηρίζεται στην ανεύρεση μακροσκοπικά αιμορραγικής και οιδηματικής περιοχής, που περιβάλλει τα τραυματικά χείλη. Ιστολογική διαπίστωση-επιβεβαίωση γίνεται με την ανεύρεση μεγάλου αριθμού λευκοκυττάρων και ερυθροκυττάρων στην περίπτωση κάκωσης προθανάτιας πρόκλησης. Τέλος υπάρχουν και οι ιστοχημικές μέθοδοι προσδιορισμού της μεταβολής της ενζυμικής δραστηριότητας ορισμένων ενζύμων (Φωσφατάσες, μη ειδικές Εστεράσες, ATP-αση, Αμινοπεπτιδάση κ.λ.π.) στην τραυματική περιοχή, που συμβαίνει μόνο στις προθανάτιες κακώσεις, ενώ απουσιάζει από τις μεταθανάτιες. Η μεθοδολογία και οι τρόποι προσδιορισμού της ενζυμικής δραστηριότητας της τραυματικής περιοχής με ιστοχημικές μεθόδους, αναφέρεται αναλυτικά στη συνέχεια αυτής της εργασίας. (Benz P. 1994, Joshua P.A. 1980, Raekallio J. 1980).

Κεφάλαιο II

« ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ ΤΩΝ ΤΡΑΥΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΚΩΣΕΩΝ ΣΤΑ ΖΩΑ »

1. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ ΤΩΝ ΤΡΑΥΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΚΩΣΕΩΝ, ΚΑΙ ΔΙΑΦΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΜΕΤΑΞΥ ΠΡΟΘΑΝΑΤΙΩΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑΘΑΝΑΤΙΩΝ ΚΑΚΩΣΕΩΝ.

Ένα από τα σοβαρότερα ερωτηματικά που δημιουργούνται στους επιστήμονες οι οποίοι ασχολούνται με περιπτώσεις τραυματικών κακώσεων, από ιατροδικαστική (ή κτηνιατροδικαστική) οπτική, είναι αυτά που αφορούν τον προσδιορισμό της ηλικίας των τραυματικών κακώσεων, καθώς και με την προθανάτια ή μεταθανάτια δημιουργία τους.

Μέχρι το τέλος της δεκαετίας του 1950, ο υπολογισμός της ηλικίας των τραυματικών κακώσεων, καθώς και η διαφορική διάγνωση των προθανάτιων από τις αντίστοιχες μεταθανάτιες, βασιζόταν κύρια στους μακροσκοπικούς τους χαρακτήρες. Τα αποτελέσματα όμως αυτά, δεν ήταν πάντοτε αξιόπιστα, ιδιαίτερα όταν το πτώμα βρισκόταν σε κατάσταση σήψης (Knight B., et al 1983, Αγιουτάντης Γ., 1980).

Πρόεκυψε λοιπόν η αναγκαιότητα της ανεύρεσης εργαστηριακών μεθόδων, που θα συμπλήρωναν και θα ενίσχυαν επιστημονικά τις ήδη υπάρχουσες.

1.1 ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.

Μετά από παρέλευση αρκετών χρόνων, έγινε προσπάθεια προσδιορισμού της ηλικίας των τραυματικών κακώσεων, καθώς και του διαχωρισμού των προθανάτιων από τα μεταθανάτια τραύματα, με βάση τα μικροσκοπικά (ιστολογικά) τους χαρακτηριστικά, δηλαδή την εμφάνιση ευκρινούς λευκοκυτταρικής διήθησης στην τραυματική περιοχή (μετανάστευση των λευκοκυττάρων, κινητοποίηση των ινοκυττάρων, των ινοβλαστών, των αγγειοπλαστών κλπ.). (Perper A. J, 1980, Betz P., 1999, Betz P., 1994, Betz P., et al 1991).

Οι πρώτες έρευνες στην ιστοπαθολογική μελέτη των τραυμάτων θεωρείται ότι έγιναν από τον Agey (1936), όμως χρειάστηκε πολύς χρόνος για να περιγραφούν και να ταξινομηθούν χρονολογικά τα φαινόμενα που λαμβάνουν χώρα, από τη στιγμή της δημιουργίας ενός τραύματος, ως την ίασή του. Έτσι ο Needham (1952), αρκετά εμπειριστατωμένα, σύγκρινε και την ίαση (επούλωση) του τραύματος, με τις βιολογικές δραστηριότητες των διαφόρων ζωικών ειδών. Το αποτέλεσμα αυτής της αντικειμενικά δύσκολης σύγκρισης, είναι ότι, η δύναμη (δυνατότητα) αναγέννησης

ενός ιστού, είναι αντιστρόφως ανάλογη με το βαθμό της ιστολογικής διαφοροποίησής του.

Αργότερα, ο Douglas (1963), διέκρινε και διαχώρισε (ιστοπαθολογικά) την ίαση του τραύματος σε τέσσερις φάσεις, περιγράφοντας τις ιστολογικές διαφοροποιήσεις καθεμιάς από αυτές. Η πρώτη φάση διαρκεί από την 1^η ως την 3^η μέρα και χαρακτηρίζεται από εξαγγείωση αίματος και εμφάνιση ινικής. Η δεύτερη φάση διαρκεί από την 4^η ως την 6^η μέρα και χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση μακροφάγων και λευκοκυττάρων. Η τρίτη φάση διαρκεί από την 5^η ως την 15^η μέρα, δηλαδή αρχίζει προς το τέλος της δεύτερης φάσης, και χαρακτηρίζεται από την έντονη παρουσία ινοβλαστών. Τέλος η τέταρτη φάση που διαρκεί από τη 16^η μέρα μέχρι την πλήρη ίαση του τραύματος χαρακτηρίζεται από την μείωση του αριθμού των ινοβλαστών και τον σχηματισμό κολλαγόνου (Betz P. et al 1995 (b), Mant K.A., 1973).

Οι Raekallio και Ross, στηριζόμενοι στα κυτταρικά φαινόμενα που γίνονται κατά τη διάρκεια της ίασης των τραυμάτων στον άνθρωπο, διέκριναν τρεις φάσεις. Η πρώτη ή φλεγμονώδης φάση διαρκεί 1 - 3 μέρες μετά τον τραυματισμό, η δεύτερη 3 - 10 ή 14 μέρες ενώ η τρίτη φάση αρχίζει στο τέλος της δεύτερης και διαρκεί μέχρι την πλήρη ίαση (Raekallio J.,1963, Perper A. J, 1980).

Οι Mescon και Matoltsy (1965), μελέτησαν τα τραύματα μικρού βάθους σε κουνέλια. Διέκριναν και αυτοί τρεις φάσεις κατά την διάρκεια της ίασής τους. Την πρώτη ή άδηλη φάση, την δεύτερη ή φάση της κυτταρικής μετανάστευσης και την τρίτη φάση ή φάση ανασχηματισμού της τραυματικής περιοχής. Σύμφωνα με τις παρατηρήσεις τους, η εμφάνιση των λευκοκυττάρων στην περιοχή του τραύματος, θεωρείται σαν την πρώτη απάντηση του οργανισμού στον τραυματισμό και συμπληρώνεται πλήρως την 18^η - 22^η ώρα μετά τον τραυματισμό. Μετά την 24^η ώρα αρχίζει η μετανάστευση κυττάρων προς την τραυματική περιοχή, η οποία όπως αναφέρουν, δεν αποτελεί μια απλή μεταναστευτική διαδικασία, αλλά περιλαμβάνει και διαδικασίες κυτταρικού πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης (Perper A. J, 1980, Egger G.,et al, 1988, Raekallio J.,1970, Raekallio J. et al,1979,).

Η εφαρμογή των ιστολογικών μεθόδων για τον προσδιορισμό της ηλικίας των τραυματικών κακώσεων είχε από την αρχή το μειονέκτημα του μη καθορισμού της λευκοκυτταρικής ζώνης αντίδρασης, πριν την παρέλευση μιας ιστολογικά άδηλης φάσης, περίπου 8 - 10 ωρών μετά τον τραυματισμό. Πιο απλά, για να γίνουν εμφανείς οι διαφοροποιήσεις των ιστολογικών χαρακτήρων της τραυματικής περιοχής, πρέπει να περάσουν τουλάχιστον 8 - 10 ώρες από την πρόκληση κάποιου προθανάτιου τραύματος. Το γεγονός αυτό δεν ικανοποιούσε πλήρως τις ιατροδικαστικές διερευνήσεις, γιατί στις περισσότερες περιπτώσεις ο χρόνος επιβίωσης μετά από σοβαρό τραυματισμό, είναι μικρότερος από 8 ώρες (Betz P.,

1994, Perper A. J, 1980). Επίσης στην περίπτωση της αρχόμενης σήψης, τα ιστολογικά στοιχεία δεν μπορούν να αξιοποιηθούν.

1.2 ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.

Οι βιοχημικές μέθοδοι προσδιορισμού της ηλικίας των τραυματικών κακώσεων, και της διαφορικής διάγνωσης μεταξύ των προθανάτιων από τις αντίστοιχες μεταθανάτιες, στηρίζονται στον προσδιορισμό των τιμών της ισταμίνης και της σεροτονίνης, στην τραυματική περιοχή (Buffoni F. et al 1993, Kampmann H., et al, 1980, Raekallio J., 1980, Raekallio J., 1972).

1.3 ΙΣΤΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.

Η εξέλιξη των τεχνικών της ενζυμικής ιστοχημείας, επέτρεψε την μελέτη της ενδοκυτταρικής κατανομής ουσιών όπως τα ένζυμα, καθώς και την συσχέτιση τους με τις κυτταρικές λειτουργίες. Τα ένζυμα ως γνωστόν είναι συνυφασμένα με τις διάφορες φάσεις του κυτταρικού μεταβολισμού και των κυτταρικών λειτουργιών. Ανάλογα με τους σκοπούς που εξυπηρετούν, είναι τοποθετημένα σε συγκεκριμένους ενδοκυτταρικούς σχηματισμούς. Έτσι, τα υδρολυτικά ένζυμα (π.χ. οι φωσφατάσες), βρίσκονται στα λυσοσώματα των πολυμορφοπύρηνων και των μακροφάγων και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης, ενώ η ΑΤΡαση εντοπίζεται και στα μιτοχόνδρια (Perper A. J, 1980).

Ο βασικός λόγος που οδήγησε τους ερευνητές, να πειραματιστούν σε δερματικά τραύματα, προκειμένου να προσδιορίσουν την ηλικία των τραυματικών κακώσεων, είναι το γεγονός ότι, κατά την διάρκεια της δημιουργίας ενός τραύματος σε οποιοδήποτε σημείο του σώματος, επειδή το δέρμα περιβάλλει το σώμα, σίγουρα θα τραυματιστεί και αυτό. Δεν υπάρχει λοιπόν πρακτικά τραυματισμός, δηλαδή λύση της συνέχειας ενός ιστού, χωρίς προηγουμένως να υπάρξει λύση της συνέχειας του δέρματος, δηλαδή και δερματικό τραύμα (Betz P. 1994, Betz P. 1995(a), Betz P. 1999, Raekallio J. 1980, Perper A.J. et al 1980).

Οι Raekallio (1961, 1964), Mustakallio (1961), Montagna (1962), και Pullar (1965), για πρώτη φορά μελέτησαν συστηματικά την κατανομή των ενζύμων στον δέρμα του ανθρώπου, χρησιμοποιώντας μεθόδους και τεχνικές της ενζυμικής ιστοχημείας. Οι ίδιες μέθοδοι, χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για τις πρώτες μελέτες του προσδιορισμού της ηλικίας των τραυματικών κακώσεων που έγιναν ως γνωστόν στο δέρμα. Αμέσως μετά τον προθανάτιο τραυματισμό ενός ιστού, αρχίζουν να διακρίνονται δύο περιοχές (ζώνες), η εσωτερική ή κεντρική και η εξωτερική ή περιφερική ζώνη. (Betz P., 1994, Raekallio J., 1984, Raekallio J., 1980, Goodson W.H., et al 1979, Perper A. J, 1980).

Η εσωτερική ή κεντρική ζώνη του τραύματος (ΕΙΚ. 18), εκτείνεται σε περιοχή διαμέτρου 200 - 500 μ. και περιλαμβάνει το τμήμα του ιστού που έχει πάθει τη μεγαλύτερη καταστροφή από το αίτιο που προκάλεσε το τραύμα. Στη ζώνη αυτή παρατηρείται προοδευτική απώλεια της ενζυμικής δραστηριότητας, σαν ένα πρώιμο σημείο κυτταρικής νέκρωσης. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται "αρνητική ζωική αντίδραση" (negative vital reaction). Η μείωση της ζωτικότητας των κυττάρων κύρια του συνδετικού ιστού, θεωρείται ότι οφείλεται αφενός στην μηχανική βλάβη του τραύματος, αφετέρου στην μείωση της παροχής του αίματος από την προκαλούμενη τοπικά αγγειακή καταστροφή και τέλος στην φλεγμονή που αναπτύσσεται τοπικά. Το φαινόμενο αυτό δεν παρατηρείται στα μεταθανάτια τραύματα.

Η εξωτερική ή περιφερική ζώνη του τραύματος (ΕΙΚ. 18), εκτείνεται σε περιοχή 100 - 300 μ. γύρω από την αντίστοιχη εσωτερική. Αμέσως μετά τη δημιουργία μιας τραυματικής κάκωσης, τα ζωντανά κύτταρα που βρίσκονται στην περιφέρεια της, αρχίζουν την σύνθεση και παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων από διάφορα ένζυμα. Επιπλέον, τα κύτταρα που λίγο αργότερα θα εισβάλλουν στην τραυματική περιοχή από την κυκλοφορία, παράγουν και αυτά ποσότητες από τα παραπάνω ένζυμα. Όπως είναι λοιπόν φυσικό, στην εξωτερική ζώνη του τραύματος θα παρατηρηθεί μια έντονη ενζυμική δραστηριότητα, που θα έχει σαν αποτέλεσμα την τοπική αύξηση της ποσότητας των ενζύμων. Η αύξηση αυτή σύμφωνα με τα παραπάνω, οφείλεται, τόσο στην αυξημένη ενζυμική παραγωγή από τα μεσεγγυματικά στοιχεία της εξωτερικής ζώνης της τραυματικής περιοχής, όσο και στις ποσότητες των ενζύμων που μεταφέρονται με την κυκλοφορία. Η αυξημένη αυτή ενζυμική δραστηριότητα ονομάζεται "θετική ζωική αντίδραση" (positive vital reaction), και δεν παρατηρείται σε μεταθανάτια τραύματα (Gallo R., 1997, Perper A. J, 1980).

Ορισμένοι ερευνητές, όπως οι Fell και Danielli, από το 1963 είχαν αναφέρει, ότι η ποσότητα της αλκαλικής φωσφατάσης που παράγεται στην τραυματική περιοχή, κύρια από τα κύτταρα του συνδετικού ιστού που συμμετέχουν στην αναγέννηση του τραύματος και από τα λευκοκύτταρα, είναι πολύ μεγαλύτερη από την αντίστοιχη ποσότητα, που υπάρχει φυσιολογικά σε ένα υγιή (μη τραυματισμένο) ιστό. Η ποσότητα αυτή αυξάνεται και φτάνει στο μέγιστό της, όταν αρχίζει ο σχηματισμός των ινών του κολλαγόνου (Mant K.A., 1973).

Ο χρόνος εμφάνισης της ενζυμικής δραστηριότητας, που έχει ταυτοποιηθεί με πολλές ιστοχημικές μεθόδους, επιτρέπει την δημιουργία βιολογικού χρονοδιαγράμματος για τις ενζυμικές διακυμάνσεις των ενζύμων στην τραυματική περιοχή. Η πρώιμη αυτή ενζυμική δραστηριότητα σένα προθανάτιο τραύμα και η απουσία της στα αντίστοιχα μεταθανάτια, επιβεβαιώθηκε και από άλλους ερευνητές. όπως οι Tanaka (1966), Fatteh (1966), Berg (1969), Pioch (1969), Karkola (1972). Κατά τους Malik (1971), Berg (1969) και Pioch (1969), οι ίδιες ιστοχημικές -

ενζυματικές μέθοδοι, μπορεί να χρησιμοποιηθούν όχι μόνο για τα δερματικά τραύματα, αλλά και για τα εγκαύματα, τις εκδορές και τις εκχυμώσεις, ενώ κατά τους Todo (1968) και Karkola (1972) για τα τραύματα μετά την εξαγωγή δοντιών και τα τραύματα διαφόρων εσωτερικών οργάνων όπως του ήπατος με τις μεταβολές της σουκινιλικής δευδρογενάσης, της εστεράσης, της όξινης και της αλκαλικής φωσφατάσης. Επίσης για τα τραύματα του εγκεφάλου με την ανεύρεση οξειδοαναγωγασών (Classen H., et al 1996, Cejkova J., et al 1989).

Το σημαντικό στις ιστοχημικές - ενζυματικές μεθόδους είναι ότι παραμένουν αξιόπιστες ακόμα και στις περιπτώσεις αρχόμενης σήψης, δηλαδή 3 - 5 μέρες μετά τον θάνατο εφόσον βέβαια τα τραύματα έχουν γίνει προθανάτια. Επίσης, οι μέθοδοι αυτοί, μπορούν να προσδιορίσουν την ηλικία μίας κάκωσης σε μια πολύ πρώιμη χρονικά φάση, δηλαδή από την πρώτη ώρα, πράγμα που δεν είναι εφικτό με τις απλές ιστοχημικές μεθόδους (Perper A. J, 1980, Raekallio J.,1972)

Ο παράγοντας ηλικία δεν φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στον χρόνο εμφάνισης των ενζύμων στην τραυματική περιοχή. Πιθανώς, σε ηλικιωμένα άτομα, η ένταση της ενζυμικής αντίδρασης να είναι μειωμένη σε σχέση με τα αντίστοιχα νεώτερα. Σύμφωνα με το Berg, η έντονη αιμορραγία, το υπερβολικό ψύχος και τα κρανιακά κατάγματα, δεν επιβραδύνουν την εμφάνιση της ενζυμικής δραστηριότητας, πράγμα που μπορεί όμως να συμβεί στην περίπτωση των πολλαπλών σοβαρών τραυμάτων.

Ο χρόνος εμφάνισης της ενζυμικής δραστηριότητας στην τραυματική περιοχή σε πειραματόζωα, δεν έχει ουσιαστικά και εμπειριστατωμένα μελετηθεί. Θεωρείται απλώς, ότι οι ενζυμικές αντιδράσεις εμφανίζονται νωρίτερα στα πειραματόζωα από ότι στον άνθρωπο (Perper A. J, 1980, Raekallio J.,1984).

1.4 ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.

Εφαρμόστηκαν ανοσοιστοχημικές μεθόδους και τεχνικές για τον προσδιορισμό της ηλικίας των τραυματικών κακώσεων. Οι μέθοδοι αυτές στηρίζονται στον προσδιορισμό ουσιών όπως fibronectine, tenascin, collagen type I, III, V, VI, κλπ. Πιο αναλυτικά, η P-selectin που ανιχνεύεται πολύ νωρίς στην τραυματική περιοχή, ενώ η E-selectin μετά από 1.5 ημέρες, μετά τον τραυματισμό. Η fibronectin επίσης ανιχνεύεται 10-30 λεπτά μετά τον τραυματισμό, ενώ η κανονική της εμφάνιση γίνεται 5 ημέρες μετά τον τραυματισμό. Η fibronectin, όπως είναι γνωστό, είναι μια γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 450.000, που εμφανίζεται στο πλάσμα και στις ινίδια (fibrillars), σαν στοιχείο του εξωκυτταρικού καλουπιού. Στο μη τραυματισμένο δέρμα βρίσκεται στη βασική μεμβράνη, στα προσαρτήματα του δέρματος κλπ. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αναγέννηση των ιστών, στην επούλωση των τραυμάτων, και στην κυτταρική προσκόλληση και μετανάστευση. Πρόσφατες έρευνες την θεωρούν σαν δείκτη της ζωτικότητας των τραυμάτων. (Betz

P, 1995(a), Betz P., et al 1992(b), Grellner W. et al 1998, Ohshima T. 2000, Agren M.S. et al 1994).

Επίσης ανοσοιστοχημικές μέθοδοι χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό εξωκυτταρικών ουσιών η *tenascin* και η *laminin*. Η πρώτη εμφάνιση της *tenascin* στην τραυματική περιοχή και συγκεκριμένα γύρω από τα κύτταρα της ινοβλάστης, γίνεται την 2^η ημέρα μετά τον τραυματισμό, ενώ η μέγιστη εμφάνισή της γίνεται 5 ημέρες μετά τον τραυματισμό (Betz P., et al 1993(b), Betz P, 1995(a), Castellucci M., et al 1991). Η πρώτη εμφάνιση της *laminin* στην τραυματική περιοχή, γίνεται την 1.5 ημέρες μετά τον τραυματισμό (Betz P., et al 1992(c), Ohshima T. 2000). Όλες οι παραπάνω ουσίες, εκτός από την P-selectin, εμφανίζονται 1-5 ημέρες μετά τον τραυματισμό (Ohshima T. 2000, Ohshima T. et al 1998, Betz P, 1995(a)). Η πρώτη εμφάνιση των κυττοκερατινών 5 και 13 στην επιδερμίδα της τραυματικής περιοχής με ανοσοιστοχημικές μεθόδους, γίνεται την 5^η ημέρα μετά τον τραυματισμό. Η μέγιστη εμφάνισή της γίνεται 18 ημέρες περίπου μετά τον τραυματισμό (Betz P., et al 1993(c)).

Ο Eisenmenger και συν και Betz και συν., διερεύνησαν για τον ίδιο λόγο την σύνθεση του κολλαγόνου κατά την διάρκεια της επούλωσης των τραυμάτων. Τα αποτελέσματα των ερευνών έδειξαν ότι το κολλαγόνο τύπου I, εμφανίζεται το νωρίτερο 4 ημέρες μετά τον τραυματισμό και συγκεκριμένα γύρω από τα κύτταρα της ινοβλάστης, ενώ η παρουσία του ανιχνεύεται μέχρι την 6^η μέρα μετά τον τραυματισμό. Το κολλαγόνο τύπου III, εμφανίζεται το νωρίτερο 2-3 ημέρες μετά τον τραυματισμό και η παρουσία του διατηρείται μέχρι 2.5 μήνες. Το ίδιο ακριβώς συμβαίνει και στην περίπτωση του κολλαγόνου τύπου V. Το κολλαγόνο τύπου IV και τύπου VII, που αποτελούν στοιχεία της βασικής μεμβράνης, εμφανίζονται το νωρίτερο 3-4 ημέρες μετά τον τραυματισμό, ενώ η ουσιαστική τους εμφάνιση γίνεται 8-21 ημέρες μετά τον τραυματισμό. (Eisenmenger W. et al, 1988, Betz P., et al 1993(a), Betz P., et al 1993(b), Betz P., et al 1993(e), Betz P., et al 1992(c), Betz P., et al 1993(d))

Ο Oehmichen και συν., πειραματίστηκαν με την σύνθεση των DNA και RNA στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας του δέρματος της τραυματικής περιοχής. (Sato Y., et al, 2000, Hausmann R. et al 1999, Oehmichen et al, 1997).

Ο Dressler και συν. και Betz και συν., εξέτασαν με ανοσοιστοχημικές μεθόδους την προσκόλληση μορίων ICAM VCAM στα ενδοθηλιακά αγγειακά κύτταρα. (Dressler J. et al 2000, Dressler J. et al 1999, Dressler J. et al 1997, Betz P. et al 1997)

Ο Walcher για τον ίδιο λόγο, χρησιμοποίησε την προσδιορισμό της αιμοσιδηρίνης, χρησιμοποιώντας βαφή με Prussian blue. Η αιμοσιδηρίνη εμφανίζεται 9 ημέρες μετά τον τραυματισμό. (Ohshima T. 2000)

Ο Betz και συν., επίσης χρησιμοποίησαν μεθόδους προσδιορισμού την παραγωγής p53, για τον προσδιορισμό της ηλικίας των τραυματικών κακώσεων. (Betz, P., 1995 (a), Hausmann R., et al 1998).

1.5 ΜΕΘΟΔΟΣ ELISA.

Για τον προσδιορισμό της ηλικίας των τραυματικών κακώσεων, χρησιμοποιήθηκαν επίσης μέθοδοι ELISA, για τον προσδιορισμό των ΚΥΤΤΟΚΙΝΩΝ και ιδιαίτερα της interleukin (IL-1α), (IL-1β), (IL-6) και (IL-10). Οι κυττοκίνες είναι γλυκοπρωτείνες που παράγονται από διάφορα είδη κυττάρων όπως τα ουδετερόφιλα τα μακροφάγα και τα λεμφοκύτταρα και παίζουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα του οργανισμού τη αιμοποίηση στην κυτταρική αναγέννηση κλπ. (Kondo T., et al 1996). Ο χρόνος εμφάνισής τους μετά τον τραυματισμό είναι 30-180 λεπτά της ώρας για την (IL-10), 3 ώρες για την (IL-1β) και 6-12 ώρες για τις (IL-1α) και (IL-6) τραυματισμό (Ohshima T. 2000, Kondo T., et al 1999).

1.6 ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΟΥ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

Επίσης για την διαπίστωση ινικής σε ιστολογικές τομές πρόσφατων τραυμάτων, χρησιμοποιείται η μέθοδος του ανοσοφθορισμού όχι μόνο για τραύματα του δέρματος, αλλά και του λιπώδους ιστού.

1.7 ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ

Σήμερα, γίνεται χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σε ειδικά επεξεργασμένα τεμάχια της τραυματικής περιοχής, για την διαπίστωση της προθανάτιας ή μεταθανάτιας δημιουργίας ενός τραύματος. Τα νημάτια της ινικής στα προθανάτια τραύματα είναι στερεά καθηλωμένα, σε αντίθεση με τα εύκολα αποκολλούμενα νημάτια των μεταθανάτιων τραυμάτων (Betz P., 1999).

Παρά τα όσα παραπάνω έχουν αναφερθεί, καθώς και όσων θα αναφερθούν στα επόμενα κεφάλαια, για την εξαγωγή σωστού συμπεράσματος τόσο για την ηλικία όσον και για την προ- ή μεταθανάτια δημιουργία ενός τραύματος, πρέπει απαραίτητα να ληφθούν υπόψη και τα ευρήματα της νεκροψίας - νεκροτομής που αναφέρονται στο ίδιο επιστημονικό πεδίο.

2.ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ (ΙΣΤΟΕΝΖΥΜΟΛΟΓΙΑ)

2.1. ΓΕΝΙΚΑ

Τα ένζυμα είναι ουσίες που καταλύουν τα βιολογικά συστήματα, προσδιορίζουν τον τρόπο των χημικών μετασχηματισμών και μεσολαβούν στον μετασχηματισμό των διαφόρων μορφών ενέργειας (Stryer L., 1994, Διαμαντίδης Ι., 1990).

Τα περισσότερα ένζυμα είναι πρωτεΐνες. Όμως η ανακάλυψη των καταλυτικά ενεργών μορίων RNA, δείχνει ότι οι πρωτεΐνες δεν έχουν αποκλειστικά το προνόμιο της κατάλυσης.

Τα κυριότερα χαρακτηριστικά των ενζύμων είναι η καταλυτική τους ισχύς, η εξειδίκευσή τους καθώς και το γεγονός ότι σε πολλά ένζυμα γίνεται ρύθμιση της δράσης τους.

Το γεγονός ότι τα περισσότερα ένζυμα είναι πρωτεΐνες, σημαίνει ότι το μόριό τους αποτελείται από μια ή περισσότερες πολυπεπτιδικές αλυσίδες, στις οποίες η αλληλουχία των αμινοξέων καθορίζεται γενετικά όπως άλλωστε όλων των πρωτεϊνών. Η τρισδιάστατη δομή του μορίου τους στο χώρο (δευτεροταγής, τριτοταγής και τεταρτοταγής δομή), είναι τέτοια ώστε τα ένζυμα να έχουν μια ισχυρή, συμπαγή, σφαιροειδή μορφή, στην περιφέρεια του οποίου διατάσσονται κυρίως τα τμήματα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων των οποίων οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων τους είναι πολικές. Επίσης στην πρωτεϊνική τους φύση τα ένζυμα οφείλουν τις χαρακτηριστικές φυσικοχημικές ιδιότητές τους που είναι:

- Τα ένζυμα είναι πολυιονικά μόρια και μπορούν να έχουν θετικό, αρνητικό ή ουδέτερο φορτίο, ανάλογα με το pH του περιβάλλοντος.
- Τα ένζυμα είναι μακρομόρια μεγάλου μοριακού βάρους. Αυτό σημαίνει ότι μπορούν να καθιζάνουν σε ισχυρά φυγόκεντρα πεδία, δεν διαπερνούν τις ημιδιαπερατές μεμβράνες, ενώ πυκνά υδατικά τους διαλύματα παρουσιάζουν αυξημένη οσμωτική πίεση και διαθλούν το μονοχρωματικό φως που προσπίπτει σαυτά.

Η επίδραση της θερμοκρασίας και του pH στην καταλυτική τους ικανότητα, αποδίδεται επίσης στην πρωτεϊνική τους φύση. (Stryer L., 1994, Διαμαντίδης Ι., 1990).

Τα ένζυμα όπως προαναφέρθηκε είναι πρωτεϊνικής φύσης καταλύτες, πράγμα που σημαίνει ότι υπόκεινται στους νόμους της κατάλυσης, δηλαδή επιταχύνουν την ταχύτητα μιας αντίδρασης, χωρίς να επηρεάζεται η τελική θερμοδυναμική ισορροπία του συστήματος. Στην πράξη στους βιολογικούς οργανισμούς αυτό σημαίνει ότι : (Διαμαντίδης Ι., 1990).

** Απαιτούνται πολύ μικρές ποσότητες ενζύμων, γιατί βρίσκονται ανέπαφα μετά το τέλος της αντίδρασης.

** Ότι τα ένζυμα καταλύουν μόνο εκείνες τις αντιδράσεις που είναι θερμοδυναμικά δυνατές, δηλαδή αντιδράσεις που συνοδεύονται από μείωση της ελεύθερης ενέργειας, ενώ δεν μπορούν να επηρεάσουν με κανένα τρόπο αντιδράσεις μη θερμοδυναμικά δυνατές, ο οποίες δεν γίνονται είτε υπάρχει καταλύτης είτε όχι, αν δεν τους δοθεί ενέργεια από το περιβάλλον.

** Τα ένζυμα απλά αυξάνουν κατά πολύ (μέχρι 10¹¹ φορές) την ταχύτητα μιας αντίδρασης και κάνουν ορατές τις χημικές μεταβολές ενός συστήματος σε μικρό χρονικό διάστημα, οι οποίες απουσία τους θα γινόταν με μεγάλη βραδύτητα και θα ξέφευγαν από την προσοχή μας. Η αύξηση της ταχύτητας μιας αντίδρασης από τα ένζυμα οφείλεται στην μείωση της ενέργειας ενεργοποίησης που απαιτείται μεταξύ των μορίων των αντιδρώντων, και παρέχουν την δυνατότητα να γίνονται οι βιολογικές αντιδράσεις, ταχύτατα στις ήπιες θερμικά συνθήκες που επικρατούν στα κύτταρα (π.χ. η ενέργεια ενεργοποίησης που απαιτείται για τη διάσπαση του H₂O₂ είναι 18 Kcal/mol απουσία καταλύτη και μόνο 2 Kcal/mol παρουσία του ενζύμου καταλάση).

2.1.1 Η εξειδικευμένη δράση των ενζύμων

Τα ένζυμα σε γενικές γραμμές συμπεριφέρονται όπως και οι χημικοί καταλύτες. Υπάρχουν όμως και μερικές διαφορές μεταξύ τους. Η δράση των ενζύμων είναι εξειδικευμένη, τόσο σε ότι αφορά το είδος της αντίδρασης, όσο και σε ότι αφορά το είδος του υποστρώματος. Υπόστρωμα ονομάζεται η ουσία που υφίσταται τη δράση του ενζύμου και τροποποιείται κατά τη διάρκεια μιας ενζυμικής αντίδρασης. Η εξειδίκευση της δράσης των ενζύμων ως προς το υπόστρωμα, μπορεί να είναι υψηλή ή απόλυτη, οπότε το ένζυμο είναι ικανό να ξεχωρίζει το ένα από τα δυο στερεοϊσομερή μιας ουσίας, ή να είναι χαμηλή, οπότε σαν υπόστρωμα μπορεί να είναι μια ομάδα ουσιών με ορισμένα κοινά γνωρίσματα. (Stryer L., 1994, Διαμαντίδης Ι., 1990).

Η εξειδικευμένη δράση των ενζύμων οφείλεται στην ύπαρξη του ενεργού κέντρου ή ενεργούς περιοχής, το οποίο παριστά τη ζώνη του ενζυμικού μορίου, που είναι υπεύθυνη για την καταλυτική του ικανότητα. Είναι η ζώνη, που σύμφωνα με το ομοίωμα της επαγωγικής προσαρμογής του Koshland, αλλάζει όταν το ένζυμο έλθει σε επαφή με το υπόστρωμα, και τροποποιείται έτσι ώστε η σύνδεση ενζύμου - υποστρώματος να είναι περισσότερο πλήρης. Η δημιουργία του ενεργού κέντρου είναι ουσιαστικά αποτέλεσμα της δυνατότητας της πεπτιδικής αλυσίδας (του ενζύμου), να ελικώνεται και να αναδιπλώνεται (δευτεροταγής και τριτοταγής δομή) και πρακτικά αναφέρεται στη συγκεκριμένη διάταξη στο χώρο, ορισμένων πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Έτσι κατανοείται γιατί η βιολογική δράση ενός ενζύμου, συνδέεται με τη φυσική του κατάσταση και γιατί αυτή εξαφανίζεται όταν το ένζυμο μετουσιωθεί, δηλαδή όταν καταστραφεί η δευτεροταγής και η τριτοταγής του δομή. Όλες οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων που δομούν το ενεργό κέντρο δεν έχουν τον ίδιο ρόλο. Μερικές από αυτές, συμμετέχουν άμεσα στην κατάλυση, οπότε και έρχονται σε άμεση επαφή με τα τμήματα εκείνα του υποστρώματος που θα υποστούν τροποποίηση, ενώ ο ρόλος των υπόλοιπων μπορεί να χαρακτηριστεί σαν βοηθητικός, αλλά οπωσδήποτε αναγκαίος, γιατί αυτές συντελούν στην πληρέστερη σύνδεση υποστρώματος - ενζύμου. Έτσι, το ενεργό

κέντρο μπορεί τοπογραφικά να χωριστεί σε δυο περιοχές, το καταλυτικό κέντρο και το κέντρο σύνδεσης. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η σύνδεση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο είναι αντιστρεπτή και δεν εξασφαλίζεται με ισχυρούς ομοιοπολικούς δεσμούς. Αντίθετα, αναπτύσσονται ασθενείς δεσμοί που προσδίδουν στο σύμπλοκο ενζύμου και υποστρώματος, το πλεονέκτημα της γρήγορης και ευκίνητης μοριακής αλληλοεπίδρασης, στοιχεία απαραίτητα για την κατάλυση. (Διαμαντίδης Ι., 1990).

Με τη σύνδεση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο, αυτά ακινητοποιούνται στην κατάλληλη θέση, με σωστό προσανατολισμό, ώστε να γίνεται γρήγορα η σωστή αντίδραση. Αντίθετα, στην περίπτωση που η αντίδραση γίνεται απουσία καταλύτη, τα μόρια των αντιδρώντων διασπώνται ή αντιδρούν μεταξύ τους με διάφορους τρόπους, με συνέπεια να δημιουργείται συνήθως μεγάλος αριθμός παραπροϊόντων. Παράλληλα, σε πολλές περιπτώσεις, η σύνδεση του υποστρώματος στο ένζυμο συνοδεύεται και από αλλαγές στη διαμόρφωση του ενζύμου, με τελικό αποτέλεσμα την ταυτόχρονη στρέβλωση του υποστρώματος, πράγμα που διευκολύνει κατά πολύ το σπάσιμο των δεσμών του. (Stryer L., 1994, Διαμαντίδης Ι., 1990).

2.1.2 Η δράση των ενζύμων βρίσκεται κάτω από συνεχή έλεγχο.

Πραγματικά, τα κύτταρα διαθέτουν μηχανισμούς που ελέγχουν τις ενζυμικές δραστηριότητες και κατά συνέπεια το μεταβολισμό τους. Η θέση επίσης των ενζύμων μέσα στο κύτταρο δεν είναι τυχαία. Κάτι τέτοιο δεν θα εξυπηρετούσε τον καθορισμένο λειτουργικό τους ρόλο και ακόμα θα έκανε αναποτελεσματικούς τους μηχανισμούς ελέγχου της δράσης τους. Τα ένζυμα συνήθως οργανώνονται σε μεγαλομοριακά σύμπλοκα, καθένα από τα οποία επιτελεί συγκεκριμένο έργο και βρίσκονται σε συγκεκριμένη θέση μέσα στο κύτταρο. Ειδικότερα μέσα στα μιτοχόνδρια βρίσκεται το σύνολο των ενζύμων που καταλύουν τις αντιδράσεις της οξειδωσης των λιπαρών οξέων και τις αντιδράσεις του κύκλου του Krebs. Επίσης βρίσκονται οργανωμένα στην εσωτερική μεμβράνη τους οι μεταφορείς ηλεκτρονίων και τα ένζυμα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Τα ένζυμα λοιπόν των μιτοχονδρίων, οργανώνονται λειτουργικά για την παραγωγή ενέργειας. Αντίθετα, στα λυσοσώματα απαντά ένας πολύ μεγάλος αριθμός ενζύμων, που καταλύουν τις αντιδράσεις υδρολυτικής διάσπασης των μακρομορίων και των ξένων εισβολέων. Πρέπει να τονιστεί ότι, όλα τα κύτταρα ενός οργανισμού δεν περιέχουν, ούτε τα ίδια ένζυμα, ούτε και τις ίδιες ποσότητες από αυτά. Έτσι η εξειδικευμένη λειτουργία ενός κυττάρου και κατ' επέκταση ενός ιστού, καθορίζεται από το είδος και την ποσότητα των ενζύμων που περιέχονται σαυτόν. (Stryer L., 1994, Διαμαντίδης Ι., 1990).

2.1.3 Χρονική εξέλιξη (ταχύτητα) μιας ενζυμικής αντίδρασης.

Η ποσότητα ενός ενζύμου σε ένα ιστό ή ένα βιολογικό υγρό μπορεί να εκτιμηθεί μετρώντας με διάφορες τεχνικές την καταλυτική του δράση, δηλαδή την

ταχύτητα μετατροπής του υποστρώματος σε προϊόντα. Σε καθορισμένες συνθήκες θερμοκρασίας, pH, παρουσία διαφόρων απαραίτητων παραγόντων και της συγκέντρωσης υποστρώματος, η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης είναι ανάλογη της ποσότητας του ενζύμου. Ένα ένζυμο μπορεί να κορεστεί από το υπόστρωμά του, όταν η συγκέντρωση του τελευταίου σε σχέση με τη συγκέντρωση του ενζύμου είναι πάρα πολύ μεγάλη. Στην περίπτωση αυτή η ενζυμική αντίδραση γίνεται με τη μέγιστη δυνατή ταχύτητα (V_{max}). Η μεταβολή της συγκέντρωσης του υποστρώματος (S) ή των προϊόντων (P), στη μονάδα του χρόνου, αποτελεί ποσοτική έκφραση της ταχύτητας της κατάλυσης, δηλαδή $v = -d(S)/dt = d(P)/dt$. Η ταχύτητα αυτή εξαρτάται μεταξύ των άλλων, από τρεις παράγοντες. Τη συγκέντρωση του ενζύμου, τη συγκέντρωση του υποστρώματος και τη συγγένεια του ενζύμου με το υπόστρωμά του. Η επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος στην ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης, αποτελεί στοιχείο καθοριστικό στις ιστοχημικές ενζυμικές αντιδράσεις. Αν σε *in vitro* πείραμα διατηρείται σταθερή η συγκέντρωση ενός ενζύμου και μεταβάλλεται κάθε φορά μόνο τη συγκέντρωση του υποστρώματος, διαπιστώνεται ότι η ταχύτητα της αντίδρασης στην αρχή αυξάνεται σημαντικά. Αν στη συνέχεια προστίθεται σταδιακά περισσότερη ποσότητα υποστρώματος, διαπιστώνεται ότι η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης αυξάνεται και φτάνει σε μια μέγιστη τιμή (V_{max}), πέρα από την οποία δεν αυξάνεται άλλο, όση ποσότητα υποστρώματος και να προστεθεί. (Διαμαντίδης Ι., 1990).

2.1.4 Τροποποιητές της ενζυμικής δράσης.

Πολλές χημικές ουσίες έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν θετικά ή αρνητικά τη δράση των ενζύμων. Οι ουσίες αυτές ονομάζονται τροποποιητές και διακρίνονται σε αναστολείς (αρνητικούς τροποποιητές) και σε ενεργοποιητές (θετικούς τροποποιητές). Η διάκριση αυτή είναι σχετική, γιατί πολλές φορές η ίδια ουσία, κάτω από διαφορετικές συνθήκες, μπορεί να δράσει σαν αναστολέας και σαν ενεργοποιητής. Ο βιολογικός ρόλος των τροποποιητών είναι σπουδαίος γιατί αποτελούν βασικό στοιχείο της ρύθμισης του μεταβολισμού στα κύτταρα. Η ενζυμική ιστοχημεία χρησιμοποιεί ταχτικά τόσο τους αναστολείς όσο και τους ενεργοποιητές των ενζύμων. Η σύνδεση των τροποποιητών στο μόριο των ενζύμων, μπορεί να είναι αντιστρεπτή, όταν γίνει με ασθενείς δεσμούς και μη αντιστρεπτή, όταν αναπτυχθούν ομοιοπολικοί δεσμοί, μεταξύ του τροποποιητή και του ενζύμου.

Αναστολή της ενζυμικής δράσης.

Υπάρχουν πολλοί παράγοντες οι οποίοι μπορεί να προκαλέσουν ολική καταστροφή του πρωτεϊνικού μορίου όλων των ενζύμων (π.χ. υψηλές θερμοκρασίες) και κατά συνέπεια την πλήρη απώλεια της καταλυτικής δράσης τους. Υπάρχουν όμως και άλλοι που δρουν εξειδικευμένα και αναστέλλουν μόνιμα ή παροδικά τη λειτουργία συγκεκριμένων ενζύμων. (Stryer L., 1994, Διαμαντίδης Ι., 1990).

Μη αντιστρεπτή αναστολή. Προκαλείται από διάφορες ουσίες που έχουν την ικανότητα να δεσμεύονται ισχυρά πάνω σε ορισμένες ομάδες των ενζυμικών μορίων και να προκαλούν την απώλεια της καταλυτικής τους ικανότητας. Αυτό γιατί με τη δέσμευσή τους είτε τροποποιείται η φυσική διαμόρφωση των ενζύμων ώστε να μην είναι πλέον ευχερής η δέσμευση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο, είτε γιατί παρεμποδίζεται άμεσα η δέσμευση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο λόγω της παρουσίας αυτού του αναστολέα. Επειδή δε, η δέσμευση του αναστολέα στα ένζυμα γίνεται με ισχυρό ομοιοπολικό δεσμό και δεν είναι εύκολη η απομάκρυνσή του, γιαυτό και ονομάζεται μη αναστρεπτή αναστολή. (Stryer L., 1994, Διαμαντίδης Ι., 1990).

Αναστρεπτή αναστολή. Η αναστρεπτή αναστολή που προκαλείται από ουσίες που παρουσιάζουν δομικές ομοιότητες με το κανονικό υπόστρωμα του ενζύμου και μπορούν να δεσμευτούν στο ενεργό τους κέντρο, ονομάζεται συναγωνιστική αναστολή. Πιο απλά, το υπόστρωμα και ο αναστολέας συναγωνίζονται για το ίδιο ενεργό κέντρο. Η αναστρεπτή αναστολή που προκαλείται από ουσίες που δεσμεύονται είτε πάνω στο ένζυμο, αλλά σε θέσεις διαφορετικές από το ενεργό κέντρο, είτε πάνω στο σύμπλοκο ενζύμου - υποστρώματος, ονομάζεται μη συναγωνιστική αναστολή. Τέλος, όταν οι ουσίες δεσμεύονται μόνο πάνω στο σύμπλοκο ενζύμου υποστρώματος θεωρείται ότι υπάρχει ασυναγώνιστη αναστολή.

Ενεργοποίηση της ενζυμικής δράσης.

Οι ενεργοποιητές των ενζύμων προκαλούν αύξηση της ταχύτητας των ενζυμικών αντιδράσεων, δηλαδή αυξάνουν την συγγένεια του ενζύμου για το υπόστρωμα. Είναι συνήθως μικρά μόρια (ιόντα K^+ , Na^+ , Mg^+) που συνδέονται είτε στο ελεύθερο ένζυμο, είτε στο σύμπλοκο ενζύμου - υποστρώματος. (Διαμαντίδης Ι., 1990).

2.1.5 Επίδραση του pH και της θερμοκρασίας στα ένζυμα.

Η ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης μεταβάλλεται σε σχέση με τις μεταβολές του pH του διαλύματος μέσα στο οποίο αυτή πραγματοποιείται. Για κάθε ένζυμο υπάρχει μια συγκεκριμένη ζώνη τιμών pH, άλλοτε μικρή και άλλοτε μεγάλη, όπου παρατηρείται η ενζυμική δράση.

Η επίδραση του pH και πιο συγκεκριμένα η συγκέντρωση των πρωτονίων στο διάλυμα της αντίδρασης, οφείλεται κύρια στις πρωτονιώσεις και αποπρωτονιώσεις που προκαλούνται τόσο στο ένζυμο, όσο και στο υπόστρωμα, όπως επίσης και στη συμμετοχή των πρωτονίων στους καταλυτικούς μηχανισμούς.

Η αύξηση της θερμοκρασίας συνεπάγεται αύξηση της ταχύτητας μίας ενζυμικής αντίδρασης, μέχρι ένα όριο που συνήθως βρίσκεται κοντά στους 45°C. Μετά το θερμοκρασιακό αυτό όριο, το ενζυμικό μόριο μετουσιώνεται και παρατηρείται απότομη απώλεια της ενζυμικής δραστηριότητας. (Stryer L., 1994, Διαμαντίδης Ι., 1990).

2.1.6 Ομάδες ενζύμων.

Τα ένζυμα χωρίζονται σε έξι ομάδες (Διαμαντίδης Ι., 1990).

1. Οξειδοαναγωγικά ένζυμα ή οξειδοαναγωγάσες. (Αφυδρογονάσες, υδροξυλάσες, οξυγονάσες, υπεροξειδάσες, καταλάσες.).

2. Τρανσφεράσες.

3. Υδρολυτικά ένζυμα ή υδρολάσες. (Λιπάσες, φωσφολιπάσες, φωσφατάσες, νουκλεάσες, εστεράσες.)

Τα ένζυμα της ομάδας αυτής καταλύουν αντιδράσεις υδρολυτικής διάσπασης ενός δεσμού με την προσθήκη των στοιχείων του νερού στα φορτία του υποστρώματος που ελευθερώνονται. Επομένως στις αντιδράσεις αυτές, το μόριο του νερού είναι το δεύτερο υπόστρωμα που υφίσταται και αυτό διάσπαση.

4. Λυάσες.

5. Ισομεράσες.

6. Συνθετάσες.

Σύμφωνα με άλλους συγγραφείς, τα ένζυμα απλά μπορούν να διακριθούν σε δυο μεγάλες κατηγορίες, τα οξειδωτικά και τα υδρολυτικά ένζυμα. Τα οξειδωτικά ένζυμα απαντούντα κύρια στα μιτοχόνδρια, ενώ τα υδρολυτικά στα λυσοσωμάτια (Bancroft J.D., 1967, Bancroft J.D., et al 1977).

2.2 ENZYMΙΚΗ ΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑ

Η ενζυμική ιστοχημεία ή ιστοενζυμολογία, αποτελεί κλάδο της ιστοχημείας και ασχολείται με την αναγνώριση και τον εντοπισμό των θέσεων της δραστηριότητας διαφόρων ενζύμων, πάνω σε ιστολογικές τομές (Stevens A., et al 1993).

Πιο συγκεκριμένα, προσδιορίζεται το αποτέλεσμα της δράσης κάποιου ενζύμου σε ένα ειδικό για κάθε ένζυμο υπόστρωμα, το οποίο σαν επωαστικό διάλυμα προστίθεται πάνω στην ιστολογική τομή. Η ενζυμική δραστηριότητα γίνεται εμφανής με την δημιουργία αδιάλυτης ένωσης, στις θέσεις όπου εντοπίζεται το ένζυμο πάνω στις ιστολογικές τομές. Επειδή όμως, η αδιάλυτη αυτή ένωση τις περισσότερες φορές είναι διαφανής και κατά συνέπεια άχρωμη, πρέπει να χρωματιστεί για να γίνει ανιχνεύσιμη με απλό μικροσκόπιο. Γι' αυτό το λόγο, σε κάθε διάλυμα υποστρώματος προσθέτονται "συζευκτικά" μέταλλα ή άλλες αδιαφανείς ουσίες, που έχουν την ιδιότητα να ενώνονται (συζευγνύονται) με το προϊόν της ενζυμικής αντίδρασης και να το κάνουν αδιαφανές (Τσαβαρής Ν., 1977, Bancroft J.D., et al 1977, Vacca L., 1985).

Τα ένζυμα είναι από τη φύση τους ενώσεις θερμοευαίσθητες και δύσκολα διατηρούνται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Για να επιτύχουμε λοιπόν ιστοχημικά την εντόπιση της μεγαλύτερης δυνατής ποσότητας των ενζύμων, πρέπει η ανίχνευσή τους να γίνει αμέσως μετά την απομάκρυνση του ιστοτεμάχιου που θα χρησιμοποιηθεί, από το σώμα του ζώου . Για να παραμείνει η ενζυμική

δραστηριότητα σε ένα ιστό, απαιτείται απότομη ψύξη του τελευταίου, σε πολύ χαμηλή θερμοκρασία. Η μονιμοποίηση του ιστοτεμαχίου (κύρια με formol calcium στους -4°C), αναφέρεται ότι βοηθά την διατήρηση των υδρολυτικών ενζύμων, ενώ δεν συστήνεται στα περισσότερα οξειδωτικά ένζυμα (Bancroft J.D., 1967, Bancroft J.D., et al 1977).

Τα διαζωνικά άλατα. Τα άλατα αυτά, παράγονται από την επίδραση (επεξεργασία) όξινου διαλύματος νιτρικού νατρίου, σε πρωτοταγείς αρωματικές αμίνες. Είναι ενώσεις στην πλειονότητά τους άχρωμες, χωρίς βέβαια να λείπουν και οι εξαιρέσεις, όπως το fast garnet GBC, η παραροσανιλίνη, κλπ. Τα διαζωνικά άλατα αντιδρούν με τα προϊόντα της αρχικής ενζυμικής αντίδρασης (π.χ. φαινόλες ή aryl αμίνες) και δίδουν τις χαρακτηριστικές χρώσεις στα σημεία εντοπισμού των ενζύμων. Η ενέργεια σύνδεσης ενός διαζωνικού άλατος με τα ενδιάμεσα προϊόντα μιας ενζυμικής αντίδρασης, εξαρτάται όχι μόνο από την χημική φυσιογνωμία του, αλλά και από το P H της αντίδρασης στην οποία συμμετέχει. Μεγάλες τιμές του pH (αλκαλικό pH) δεν την ευνοούν. Δεν είναι σπάνιες οι περιπτώσεις, που το προτεινόμενο pH της αντίδρασης, δεν είναι το συνιστούμενο για κάποιο διαζωνικό άλας. Σε τέτοιες περιπτώσεις αντικαθιστούμε το διαζωνικό άλας, με άλλο, το οποίο μπορεί να δουλέψει στις παραπάνω συνθήκες του pH ή καταφεύγουμε αν είναι εφικτό σε άλλες ενζυμικές μεθόδους (π.χ. μεθόδους μετα-σύζευξης) (Gahan P.B., 1985, Bancroft J.D., et al 1977, Vacca L., 1985). Πολλά διαζωνικά άλατα περιέχουν στοιχεία όπως αργίλιο, νάτριο, μαγνήσιο, ψευδάργυρο κλπ, για να αυξήσουν τη σταθερότητα ή τον χρόνο διατήρησής τους. Στοιχεία όμως όπως τον ψευδάργυρο, μπορούν να αναστείλουν ορισμένες ενζυμικές αντιδράσεις και στην περίπτωση αυτή πρέπει να επιλέγονται διαζωνικά άλατα που δεν τα περιέχουν, όπως π.χ. το fast garnet GBC που δεν περιέχει ψευδάργυρο. Το γεγονός αυτό, πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη, στην επιλογή των διαζωνικών αλάτων. Τέλος η ακρίβεια στην ανεύρεση των θέσεων της ενζυμικής δραστηριότητας, εξαρτάται άμεσα από την συγκέντρωση του χρησιμοποιούμενου διαζωνικού άλατος. Ο Pearse, αναφέρει σαν καλύτερη συγκέντρωση των διαζωνικών αλάτων σε μία ιστοχημική αντίδραση, αυτή του 1mg/ml περίπου. Συγκεντρώσεις μικρότερες των 0,2mg/ml προκαλούν διάχυση του α -naphthol, ενώ μεγαλύτερες των 5mg/ml πιθανώς να αναστέλλουν την ενζυμική δραστηριότητα ή να οδηγήσουν στην δημιουργία μη ειδικής για το ένζυμο χρώσης. Παλαιότερα, τα διαζωνικά άλατα παρασκευαζόταν και χρησιμοποιώταν σε σύντομο χρονικό διάστημα. Σήμερα υπάρχουν στο εμπόριο και χρησιμοποιούνται περισσότερα από 30 διαζωνικά άλατα. Τα άλατα αυτά πρέπει να αποθηκεύονται σε ψυχρό και σκοτεινό χώρο και καλό είναι να αντικαθίστανται ή τουλάχιστο να ελέγχονται κάθε εξάμηνο. Είναι σήμερα γνωστό ότι, διαζωνικά άλατα παλιά ή

κακοσυντηρημένα, μπορούν να δράσουν σαν ενζυμικοί αναστολείς (Gahan P.B., 1985, Bancroft J.D., et al 1977, Vacca L.,1985).

Η Μονιμοποίηση. Η μονιμοποίηση των ιστοτεμαχίων, επιβραδύνει την εμφάνιση της ενζυμικής δραστηριότητας, και σε ορισμένες περιπτώσεις, όταν ο χρόνος έκθεσης του ενζύμου στα μονιμοποιητικά υγρά είναι μεγάλος, μπορεί να αναστείλει την ενζυμική δραστηριότητα. Σε αυτό το συμπέρασμα καταλήγουν οι μελέτες που έγιναν με σκοπό την καταγραφή της ενζυμικής δραστηριότητας της αλκαλικής και της όξινης φωσφατάσης,σε ανθρώπινη τροφοβλάστη.(Song J.Y., 1996, Matsubara S., et al, 2000).

Ο προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας, γίνεται με τους παρακάτω τρόπους :

1) Προσδιορισμός με την μέθοδο της ταυτόχρονης σύλληψης (Simultaneous Capture)

Σύμφωνα με την μέθοδο αυτή, το ένζυμο δρα πάνω στο υπόστρωμα και το προϊόν της αντίδρασης αυτής, ενώνεται με ένα διαζωνικό άλας που προστίθεται στο υπόστρωμα. Έτσι τελικά έχουμε την δημιουργία ενός αδιαφανούς άλατος, μικροσκοπικά ορατού. (Τσαβαρής Ν., 1977,Bancroft J.D., et al 1977, Vacca L.,1985).

ENZΥΜΟ + ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ = ΠΡΟΪΟΝ (μη ορατό) + ΔΙΑΖΩΝΙΚΟ ΑΛΑΣ = ΤΕΛΙΚΟ ΠΡΟΪΟΝ (ορατό).

2) Προσδιορισμός με την μέθοδο της μετά - σύζευξης (Post Coupling)

Η μέθοδος αυτή διαφέρει από την προηγούμενη στο ότι, προκειμένου να χρωματιστεί το προϊόν της αντίδρασης ενζύμου - υποστρώματος, χρησιμοποιείται χρωστική ή άλλη αδιαφανής ουσία και όχι διαζωνικό άλας. Με αυτή τη μέθοδο, αποφεύγονται τα διαζωνικά άλατα που μερικές φορές μπορεί να αδρανοποιήσουν το ένζυμο . Η μέθοδος αυτή, διαφέρει επίσης από την προηγούμενη και στο ότι συζευκτική χρωστική μπορεί να προστεθεί σε ένα δεύτερο χρόνο (όχι ταυτόχρονα όπως το διαζωνικό άλας). (Τσαβαρής Ν., 1977,Bancroft J.D., et al 1977, Vacca L.,1985).

ENZΥΜΟ + ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ = ΠΡΟΪΟΝ (μη ορατό) + ΧΡΩΣΤΙΚΗ = ΤΕΛΙΚΟ ΠΡΟΪΟΝ (ορατό).

3) Μέθοδος προσδιορισμού με αυτοχρωματισμό του υποστρώματος (Self Coloured Substrate).

Στη μέθοδο αυτή, χρησιμοποιείται υδατοδιαλυτή χρωστική, προς την οποία μετακινείται η υδρόφιλη ομάδα του ενζύμου και την κάνει αδιάλυτη. (Τσαβαρής Ν., 1977,Bancroft J.D., et al 1977, Vacca L.,1985).

ΕΝΖΥΜΟ + ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ + ΧΡΩΣΤΙΚΗ (υδατοδιαλυτή) = ΤΕΛΙΚΟ ΠΡΟΪΟΝ (ορατό).

4) Μέθοδος προσδιορισμού με ενδομοριακή επαναδιευθέτηση (Intramolecular Rearrangement).

Στη μέθοδο αυτή, το τελικό προϊόν της αντίδρασης δεν είναι επαρκώς αδιάλυτο (ορατό) και συνεπώς δεν δίδει ικανοποιητικό προσδιορισμό του ενζύμου. Ωστόσο, με κατάλληλη επεξεργασία, γίνεται περισσότερο αδιάλυτο (ορατό) και εναποτίθεται στις θέσεις της ενζυμικής δραστηριότητας σαν ίζημα (Τσαβαρής Ν., 1977, Bancroft J.D., et al 1977, Vacca L., 1985).

Από τις παραπάνω τέσσερις μεθόδους ενζυμικού προσδιορισμού, χρησιμοποιείται κύρια η μέθοδος της ταυτόχρονης σύλληψης.

Στην ενζυμική ιστοχημεία χρησιμοποιούνται απαραίτητα "μάρτυρες", αρνητικοί και θετικοί. Ο λόγος που επιβάλλει την ύπαρξη μαρτύρων είναι το γεγονός ότι ορισμένες φορές το υπόστρωμα ή στοιχεία του διασπώνται, με αποτέλεσμα να εξαχθούν λανθασμένα αποτελέσματα. Σαν αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιούνται τομές από τον ιστό που εξετάζεται οι οποίες επωάζονται σε επωαστικό διάλυμα είτε χωρίς την παρουσία υποστρώματος, είτε με την παρουσία υποστρώματος και την ταυτόχρονη προσθήκη αναστολέα του συγκεκριμένου ενζύμου. Σαν θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιούνται τομές από ιστούς που παρουσιάζουν έντονη ενζυμική δραστηριότητα στο ένζυμο που εξετάζεται.

Η μικροσκοπική εξέταση των τομών και των μαρτύρων γίνεται συγκριτικά, για να διαπιστωθεί καταρχήν η ύπαρξη ή όχι ενός ενζύμου στον εξεταζόμενο ιστό. Σε περίπτωση ύπαρξης του ενζύμου, η ένταση της ενζυμικής δραστηριότητας συνδέεται με την ένταση του χρωματισμού ο οποίος εμφανίζεται μικροσκοπικά στην εξεταζόμενη περιοχή. (Τσαβαρής Ν., 1977, Vacca L., 1985).

Στην περίπτωση που εξετάζεται, δηλαδή τον προσδιορισμό της ηλικίας ενός τραύματος, οι ιστολογικές τομές γίνονται σε ιστοτεμάχια της τραυματικής χώρας, ενώ η σύλληψη και χρώση του ενζύμου συνιστά την καταγραφή της αύξησης της ενζυμικής δραστηριότητας, λόγω του υπάρχοντος τραυματισμού.

2.3 ΦΥΣΙΟΓΝΩΜΙΑ ΤΩΝ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΚΑΙ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΙΣΤΟΧΗΜΙΚΗΣ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗΣ ΤΟΥΣ

2.3.1 ΦΩΣΦΑΤΑΣΕΣ

Οι φωσφατάσες είναι υδρολυτικά ένζυμα ευρέως διαδεδομένα στους φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς. Χρησιμοποιούνται στην υδρόλυση των φωσφορικών εστέρων. Από το σύνολο των φωσφατασών, άλλες εμφανίζουν μέγιστη

δραστηριότητα σε αλκαλικό και άλλες σε όξινο pH . Οι περισσότερες φωσφατάσες θεωρούνται "μη ειδικά" ένζυμα, δηλαδή μπορούν να αντιδράσουν χημικά και να υδρολύσουν τους φωσφορικούς εστέρες πολλών υποστρωμάτων. Μεταξύ των εξαιρέσεων αναφέρονται η ATPάση και η γλυκοζο-6-φωσφατάση, οι οποίες υδρολύουν μόνο την ATP και την glucose-6-phosphate, σε pH 7.2 και 6.5 αντίστοιχα. Η ομάδα αυτή των φωσφατασών χαρακτηρίζεται από πολλούς σαν " ειδικές φωσφατάσες". Βάσει των παραπάνω αναφορών η ομάδα των φωσφατασών μπορεί να διαχωριστεί σε 3 υποομάδες: (Τσαβαρής Ν., 1977, Bancroft J.D., et al 1977, Vacca L., 1985, Hollinshead M., et al 1998).

1. Αλκαλική φωσφατάση.
2. Όξινη φωσφατάση.
3. Ειδικές φωσφατάσες. (Η Αδενοσυνοτριφωσφατάση ή ATP - άση , η Γλυκοζο - 6 - Φωσφατάση και η 5 - Νουκλεοτιδάση).

Υπάρχουν και εφαρμόζονται ιστοχημικά αξιόπιστες μέθοδοι για την διερεύνηση της ενζυμικής δραστηριότητας, πέντε τουλάχιστον φωσφατασών. Αυτές είναι : (Bancroft J.D., et al 1977, Vacca L., 1985).

- Η Αλκαλική Φωσφατάση .
- Η Όξινη Φωσφατάση .
- Η Αδενοσυνοτριφωσφατάση (A T P - άση) .
- Η 5 - Νουκλεοτιδάση .
- Η Γλυκοζο - 6 - Φωσφατάση .

Βασικό στοιχείο στην ιστοχημική μελέτη των φωσφατασών είναι η υδρόλυση που προκαλούν από τη φύση τους, στους φωσφορικούς εστέρες κατά την διάρκεια της επώασης. Η αποδέσμευση των φωσφορικών ιόντων που ακολουθεί ή τα παραμένοντα οργανικά υπολείμματα (τμήματα), γίνονται στη συνέχεια ορατά με διάφορα μέσα. Τα φωσφορικά ιόντα έχουν την δυνατότητα να δεσμεύουν στοιχεία όπως τον μόλυβδο, το ασβέστιο κλπ. και να δημιουργούν αδιάλυτα καθιζαίνοντα άλατα (φωσφορικό μόλυβδο, φωσφορικό ασβέστιο κλπ.). Τα άλατα αυτά μπορεί να γίνουν ορατά αφού χρωματιστούν με διάφορους τρόπους και μέσα, ανάλογα με την μέθοδο που ακολουθείται. Έτσι στην μέθοδο Gomori και στις τροποποιήσεις της, τα παραπάνω άλατα δίδουν μετά από σειρά αντιδράσεων θειούχες ενώσεις που είναι έγχρωμες και συνεπώς οπτικά ανιχνεύσιμες. Αντίθετα, άλλες ιστοχημικές μέθοδοι χρησιμοποιούν διαζωνικά άλατα που χρωματίζουν τα αρχικά παραγόμενα φωσφορικά άλατα (Bancroft J.D., et al 1977, Vacca L., 1985).

Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι φωσφορικοί εστέρες για την ιστοχημική ανίχνευση της δραστηριότητας των φωσφατασών, είναι αυτοί του a - naphthol .

Η σύζευξη μπορεί να συμβεί κατά τη διάρκεια της επώασης (simultaneous coupling) ή μετά από αυτή (post coupling), ανάλογα με τη μέθοδο που ακολουθείται.

Ο ρόλος που διαδραματίζει το ΡΗ του επωαστικού διαλύματος είναι πολύ σημαντικός και καθοριστικός για την ιστοχημική παρουσίαση της ενζυμικής δραστηριότητας όχι μόνο των φωσφατάσων, αλλά και όλων των ενζύμων.

Η ιδανική τιμή του ΡΗ για τις φωσφατάσες φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (4)

ΠΙΝΑΚΑΣ 11 : Ιδανικές τιμές του ΡΗ για τις φωσφατάσες.

ΕΝΖΥΜΟ	ΤΙΜΗ ΤΟΥ ΡΗ
ΑΛΚΑΛΙΚΗ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗ	9.2
ΟΞΙΝΗ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗ	5.0
ΓΛΥΚΟΖΟ - 6 – ΦΩΣΦΑΤΑΣΗ	6.5
5 – ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΑΣΗ	7.5 - 8.5
Α Τα Ρ - αση	7.2

1. ΑΛΚΑΛΙΚΗ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗ

Η αλκαλική φωσφατάση είναι μια φωσφομονοεστεράση με ευρεία εξειδίκευση που υδρολύει πολλούς μονοφωσφορικούς εστέρες. Είναι πολύ διαδεδομένη στη φύση. Το μοριακό της βάρος ανέρχεται σε 80.000, έχει δύο υποομάδες και προσθετική ομάδα Zn^{++} . Οι άριστες τιμές του ΡΗ για τη μεγαλύτερη δυνατή δραστηριοποίησή της, κυμαίνονται μεταξύ 9.2-9.6. Ενεργοποιείται από την παρουσία ιόντων μαγνησίου, μαγανίου και κοβαλτίου. Τα κυανιούχα και η κυστεΐνη, αναστέλλουν την δραστηριότητά της (Τσαβαρής Ν., 1977, Bancroft J.D., et al 1977, Bancroft J.D., 1967, Vacca L., 1985).

Προσδιορίστηκε για πρώτη φορά με μεθόδους της ενζυμικής ιστοχημείας το 1939 από τους Gomori και Takamatsu. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε βασιζόταν στο σχηματισμό κατά την επώαση, φωσφορικού ασβεστίου ή νιτρικού κοβαλτίου, που τελικά αποδίδει φαιό ή μελανό ίζημα στις θέσεις της ενζυμικής δραστηριότητας. Στη συνέχεια ο BURSTON (1958) χρησιμοποίησε τη μέθοδο της ταχείας σύζευξης που έχει μεγαλύτερη ακρίβεια απόδοση και σταθερότητα.

Ιστοχημικά βρέθηκε σε πολλά μέρη του οργανισμού, κύρια στους σακοειδείς σχηματισμούς του οργάνου Golgi των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου, του Βωμάνειου ελύτρου Novikoff (1962), στα ενδοθηλιακά κύτταρα του μαστού, στο τοίχωμα των αγγείων, στην ωοθήκη στα ιστιοκύτταρα Pearse (1970) στα κύτταρα των ηπατικών κόλπων και στα χοληφόρα τριχοειδή. Τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα περιέχουν αλκαλική φωσφατάση, ενώ το ένζυμο απουσιάζει από τα εωσινόφιλα (Τσαβαρής Ν., 1977, Rubin A., et al 1979, Zugibe F.T., 1970, Vacca L., 1985).

Ο Gomori (1955), ανίχνευσε έντονη δραστηριότητα του ενζύμου σε ορισμένα νεοπλάσματα όπως στο οστεοπλαστικό σάρκωμα, στο σάρκωμα Ewing και στο συνοβίωμα, ενώ αντίθετα παρουσιάζεται ελαττωμένη η ενζυμική δραστηριότητα στα νεοπλάσματα του λεμφικού ιστού και στο νευροβλάστωμα. Στον μαστό εντοπίστηκε στο κυτταρόπλασμα των καρκινικών κυττάρων από τον (El Fiky 1967). Αύξηση της αλκαλικής φωσφατάσης βρέθηκε στον μαστό στην διάρκεια της γαλακτοπαραγωγής σε σχέση με αυτόν που βρίσκεται σε μη γαλακτοπαραγωγική φάση.

Οι Huseby και Thomas (1954) , παρατήρησαν ελάττωση της δραστηριότητας του ενζύμου με την πάροδο της ηλικίας και την ελάττωση του κυτταρικού πολυμορφισμού. (Τσαβαρής Ν., 1977, Bancroft J.D., et al 1977).

2. A T P - αση

Η ΑΤΡαση είναι ουσιαστικά μια ομάδα "ειδικών φωσφατασών" που υδρολύουν την ΑΤΡ. Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει τρεις τύπους ΑΤΡασης.

α. Η ΑΤΡαση των μιτοχονδρίων που ενεργοποιείται και αδρανοποιείται με διαφορετικά ιόντα και σε διάφορες τιμές pH. Η ΑΤΡαση των μιτοχονδρίων του μυοκαρδίου παραδείγματος χάριν, ενεργοποιείται με ιόντα μαγνησίου και αναστέλλεται με ιόντα ασβεστίου, ενώ η αντίστοιχη του ήπατος, απαιτεί για την ενεργοποίησή της ιόντα μαγνησίου και ασβεστίου. Επειδή η παρουσία ιόντων μολύβδου θεωρείται ότι αναστέλλει την δραστηριότητα της ΑΤΡασης των μιτοχονδρίων κατά περίπου 70%, προστίθεται η 2,4 δινιτροφαινόλη που αποτελεί ισχυρό ενεργοποιητή της μιτοχονδριακής ΑΤΡάσης. Επίσης η κατάψυξη των ιστών που προκαλεί καταστροφή των μιτοχονδρίων, συμβάλλει και αυτή στην ιστοχημική παρουσίαση της παραπάνω ΑΤΡασης (Τσαβαρής Ν., 1977, Zugibe F.T.,1970, Bancroft J.D., et al 1977, Bancroft J.D., 1967, Vacca L.,1985).

β. Η ΑΤΡαση των κυτταρικών μεμβρανών που ενεργοποιείται με ιόντα νατρίου και καλίου και απαιτεί την παρουσία ιόντων μαγνησίου για την καλύτερη ενεργοποίησή της. Η δράση της αναστέλλεται από την παρουσία ιόντων ασβεστίου. Η καταλληλότερη τιμή του pH της αντίδρασης είναι 7.2 . (Τσαβαρής Ν., 1977, Zugibe F.T.,1970, Vacca L.,1985).

γ. Η ΑΤΡαση της μυοσύνης που ενεργοποιείται με ιόντα ασβεστίου, αναστέλλεται από ιόντα μαγνησίου σε pH 9.0.

Ιστοχημικά και οι τρεις τύποι της ΑΤΡασης μπορούν να εντοπιστούν και να παρουσιαστούν. Για την ΑΤΡαση των κυτταρικών μεμβρανών και των μιτοχονδρίων χρησιμοποιούνται ιστοχημικές μέθοδοι με μόλυβδο (lead method Wachstein and Meisel τροποποιημένη από τους Culling και Pearse), ενώ για την ΑΤΡαση της μυοσύνης χρησιμοποιούνται οι μέθοδοι ασβεστίου - κοβαλτίου (Gomori calcium method).

Η ATPαση προσδιορίστηκε για πρώτη φορά το 1951 από τους Naidoo και Pratt και το 1955 από τους Padykula και Herman. Η απόδοση όμως των ιστοχημικών μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μικρή, με ποσοστό επιτυχίας όχι μεγαλύτερο από 20% (Pearse 1970). Στη συνέχεια η μέθοδος τροποποιήθηκε από τους Wachstein και Meisel το 1957, με βελτίωση των αποτελεσμάτων.

Η ATP-αση ανευρίσκεται στους μύες, στο μυοκάρδιο, στο ήπαρ, καθώς και σε κύτταρα άλλων ιστών (Stal P., et al 1995). Θετική αντίδραση δίνει στο σάρκωμα Karosi ενώ δεν εμφανίζει δραστηριότητα στα χοληφόρα αγγεία στην περίπτωση του πρωτοπαθούς ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (Wachstein και Meisel 1959). Στον φυσιολογικό μαστικό αδένα των επιμύων δεν ανευρίσκεται το ένζυμο, ενώ υπάρχει στην περίπτωση καρκίνου του μαστού που προκλήθηκε πειραματικά, στο ίδιο ζώο Elfiky (1972). Στον άνθρωπο αναφέρεται αύξηση της ATP-ασης σε περιπτώσεις καρκίνου του μαστού (Τσαβαρής Ν., 1977, Zugibe F.T.,1970, Bancroft J.D., 1967, Sundquist K.T., 1999,Culling C.F.A., 1974, Vacca L.,1985).

2.3.2. ΕΣΤΕΡΑΣΕΣ

Οι εστεράσες είναι ένζυμα που είναι ικανά να υδρολύουν εστέρες των λιπαρών οξέων. Συνήθως οι εστέρες αυτοί, έχουν 4 άτομα άνθρακα, σε αντίθεση με τις λιπάσες που διασπούν εστέρες λιπαρών οξέων, με περισσότερα των 6 ατόμων άνθρακα.

Συνιστούν ένα μεγάλο αριθμό ενζύμων που χωρίζονται σε ομάδες όπως αρυλεστεράσες, λιπάσες, καρβοξυλεστεράσες, φωσφολιπάση Β, ψευδοχολινεστεράση και ακετυλοχολινεστεράση. Κάθε ένζυμο (εστεράση), είναι ικανό να υδρολύει ένα αριθμό διαφορετικών υποστρωμάτων. Οι ιδανικές τιμές του pH για τις εστεράσες κυμαίνονται μεταξύ των 5.0 και 9.0, ανάλογα με την κατηγορία και την ομάδα στην οποία ανήκουν. Σύμφωνα με τους Pearse και συν. (1972), οι εστεράσες διακρίνονται σε 2 κατηγορίες.

1. Μη ειδικές εστεράσες. (Non specific esterases)

Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει τις παρακάτω ομάδες.

A-Εστεράσες ή αρυλεστεράσες ή αρομεστεράσες.

B-Εστεράσες ή καρβοξυλεστεράσες ή αλιεστεράσες.

C-Εστεράσες ή ακετυλεστεράσες.

Όλες οι "μη ειδικές εστεράσες" μπορούν να υδρολύσουν το υπόστρωμα *α-naphthyl acetate*. Επίσης κριτήριο της υποδιαίρεσής τους, αποτελεί η ειδική δράση που έχουν τόσο πάνω σε υποστρώματα, όσο και σε ειδικούς αναστολείς. (inhibitors). Οι συνήθως χρησιμοποιούμενοι οργανοφωσφορικοί αναστολείς για τον διαχωρισμό των "μη ειδικών εστερασών", είναι αυτοί που περιέχουν *diethyl-p-nitrophenil phosphate* (E600) και *diisopropyl fluorophosphate* (DFP) καθώς και

ορισμένες αρωματικές ιωδιούχες ενώσεις, όπως το p-chloromercouribenzoate (PCMB). Πιο απλά για να διαπιστωθεί αν κάποια δραστηριότητα εστεράσης οφείλεται σε μια από τις κατηγορίες "A,B,C" των μη ειδικών εστερασών, η τομή επωάζεται με διάλυμα E600 σε συγκέντρωση 10μM, ρυθμιστικό διάλυμα με pH 5.3, στους 37°C, για 1 ώρα. Με αυτό τον τρόπο αναστέλλεται η δραστηριότητα των B-εστερασών. Επώαση στη συνέχεια με διάλυμα PCMB σε συγκέντρωση 100μM, αναστέλλει την δραστηριότητα και των A-εστερασών. Η οποιαδήποτε υπάρχουσα πλέον αντίδραση, οφείλεται στις C-εστεράσες. (Διαμαντίδης Ι., 1990, Τσαβαρής Ν., 1977, Bancroft J.D., et al 1977, Culling C.F.A., 1974, Vacca L.,1985).

2. Ειδικές εστεράσες (Specific esterases).

Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει τις :

- Ακετυλοχολινεστεράση,
- Χολινεστεράση,
- Λιπάσες.

Πολλές από τις "ειδικές εστεράσες" υδρολύουν απλούς εστέρες όπως το a-naphthyl acetate. Επίσης, για ορισμένες ομάδες των "ειδικών εστερασών", μπορεί να χρησιμοποιηθεί το προαναφερόμενο στις "μη ειδικές εστεράσες" σχήμα για τον μεταξύ τους διαχωρισμό. Έτσι η ομάδα των χολινεστερασών αναστέλλεται από την εστερίνη σε συγκέντρωση 10μM.

Στην ενζυμική ιστοχημεία μπορεί να προσδιοριστεί η ενζυμική αντίδραση τόσο των "μη ειδικών" όσο και των "ειδικών εστερασών". Συνήθως όμως όταν αναφερόμαστε στον ιστοενζυμολογικό προσδιορισμό της αντίδρασης της εστεράσης, εννοούμε τον προσδιορισμό των "μη ειδικών εστερασών".

Πρώτοι οι Nachlas και Seligman το 1949 προσδιόρισαν την ενζυμική αντίδραση των "μη ειδικών εστερασών" με την μέθοδο AS-Naphthyl Acetate method. Η μέθοδος αυτή τροποποιήθηκε από τον Gomori το 1952 και από τον Burstone το 1959. Η μέθοδος αυτή συνεχίζει μέχρι σήμερα να χρησιμοποιείται γιατί δίνει αξιόπιστα αποτελέσματα. Οι εστεράσες έχουν μελετηθεί ιστοχημικά περισσότερο από τα άλλα ένζυμα. Οι μελέτες έχουν στραφεί τόσο στη βελτίωση των μεθόδων και τεχνικών του ιστοχημικού προσδιορισμού τους, όσο και στην εντόπιση και κατανομή τους στους ιστούς και τα όργανα του σώματος. (Τσαβαρής Ν., 1977, Bancroft J.D., et al 1977, Culling C.F.A., 1974, Vacca L.,1985).

Οι εστεράσες απαντούντα στο ενδοπλασματικό δίκτυο, τα λυσοσώματα και τα μιτοχόνδρια. Έχουν ανεβρεθεί ιστοχημικά στο δέρμα από τους Wells (1957), Raekallio (1963), Pearse και συν. (1966), στο κεντρικό νευρικό σύστημα από τους Gomori και Chessik (1953), στον σπλήνα από τον Αργύρη και συν. (1956), στους νεφρούς από τους Holt και Whithers (1952), Pearse και συν. (1958), στο ήπαρ από τους Underhay και συν. (1956), Mietkiewisky και Malendowioz (1967), στον

θυρεοειδή από τον Weber (1954), στον συνδετικό ιστό από τους Steigleder και Loffer (1956), στον προστάτη από τους Frost και Brandes (1967), κλπ. (Τσαβαρής Ν., 1977, Bancroft J.D., et al 1977, 1974, Vacca L., 1985).

3. ΤΡΑΥΜΑΤΙΚΕΣ ΚΑΚΩΣΕΙΣ - ΙΑΣΗ ΔΕΡΜΑΤΙΚΩΝ ΤΡΑΥΜΑΤΩΝ.

3.1 ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ.

Σαν παθολογική χαρακτηρίζεται η αναγέννηση ενός ιστού ή κυτταρικού συστήματος που έχει υποστεί βλάβες από παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς. Αντίθετα σαν φυσιολογική ορίζεται η αναγέννηση στην οποία αντικαθιστούνται κύτταρα που έχουν απολεσθεί εξαιτίας της φυσιολογικής φθοράς κατά την διάρκεια της ζωής.

Διακρίνονται δυο είδη παθολογικής αναγέννησης, η τέλεια και η ατελής.

3.1.1 Στην τέλεια παθολογική αναγέννηση ο ιστός που έχει υποστεί βλάβες, αντικαθίσταται με κύτταρα του ίδιου του ιστού. Για να είναι δυνατή η τέλεια παθολογική αναγέννηση πρέπει να πληρούνται δυο όροι :

α). Η βλάβη πρέπει να γίνεται σε ιστό του οποίου τα κύτταρα να ανήκουν στους βλαστικούς ή αναστρέψιμους ιστούς. Αν δηλαδή πρόκειται για κύτταρα του νευρικού ή του μυϊκού ιστού, η βλάβη δεν αποκαθίσταται με τέλεια αναγέννηση.

β). Μια βλάβη είναι δυνατό να αποκατασταθεί με τέλεια αναγέννηση μόνο όταν καταστράφηκαν μεν τα κύτταρα του ιστού, έμεινε όμως ανέπαφο το βασικό πέταλο ή ο αιμοαγγειοσυνδετικός ιστός.

Σαν παράδειγμα τέλει αναγέννησης μπορούν να αναφερθούν οι κεντρολόβιες νεκρώσεις και οι νεκρώσεις μεμονωμένων κυττάρων του ήπατος. Αυτό προϋποθέτει βέβαια ότι το δίκτυο των κολπιδών τριχοειδών παραμένει ανέπαφο. Τα κύτταρα του ήπατος όπως είναι γνωστό ανήκουν στους αναστρέψιμους ιστούς. (Tedeschi C.G., 1977, Τσιρογιάννης Ε., και συν., 1982, Agren M.S., 1992, Gerstein D.A., et al 1993., Scott A., 1985).

3.1.2 Στην ατελή παθολογική αναγέννηση, η αποκατάσταση της βλάβης δε γίνεται με κύτταρα όμοια με αυτά του ιστού, αλλά με την δημιουργία επανορθωτικού (κοκκιώδους ή ουλώδους) ιστού.

Κλασσικό παράδειγμα ατελής παθολογικής αναγέννησης αποτελούν τα τραύματα, για τα οποία πραγματεύεται και η έρευνα αυτή. Τραύμα σύμφωνα με τη συνηθισμένη έννοια χαρακτηρίζεται η λύση της συνέχειας ενός ιστού με παράλληλη απώλεια ουσίας. Η λύση της συνέχειας ενός ιστού δεν επέρχεται μόνο με μηχανικά μέσα, αλλά και με νέκρωσή του (π.χ. έμφρακτα). Αυτή καθαυτή η λύση της συνέχειας ενός ζωντανού ιστού προκαλεί τη γένεση του επανορθωτικού ιστού. Αν μετά από

τραυματισμό προκύψει σχισμή ή κοίλος χώρος στον ιστό, ο χώρος αυτός γεμίζει από το αίμα που εξαγγειώνεται το οποίο και πήζει κύρια στο άνοιγμα της σχισμής. Σύμφωνα με το πρότυπο του Witzke 1979, το ινοδωγόνο αποτελείται από 6 πολυπεπτιδικές αλυσίδες δηλαδή 3 τύπους αλυσίδων α , β , γ , διαταγμένων ανά ζεύγη και συμμετρικά δημιουργώντας δυο όμοια ημιμόρια. Όλες οι αλυσίδες μεταξύ τους συνδέονται με δισουλφιδικές γέφυρες. Έτσι ο τύπος του ινοδωγόνου είναι $(\alpha A, \beta B, \gamma)_2$. Τα A και B εκφράζουν τις πεπτίδες A και B του ινοδωγόνου, οι οποίες αποχωρίζονται από τις αλυσίδες α και β κατά την διαδικασία της πήξης του αίματος με τη δράση της θρομβίνης. Το μόριο αυτό $(\alpha, \beta, \gamma)_2$, που προέρχεται από την προηγούμενη διάσπαση, χαρακτηρίζεται σαν μονομερές του ινώδους. Με την απόσχιση των πεπτιδών A και B και την δημιουργία του μονομερούς του ινώδους, αποκαλύπτονται τα κέντρα πολυμερισμού, με αποτέλεσμα το πολυμερισμό του μονομερούς του ινώδους. Ο πολυμερισμός πραγματοποιείται τόσο με τελικο-τελική σύνδεση των μονομερών του ινώδους με τις αλυσίδες γ , όσο και με πλαγιο-πλάγια σύνδεση των αλυσίδων. Η σύνδεση μεταξύ των μονομερών του ινώδους είναι χαλαρή και γίνεται κυρίως με γέφυρες υδρογόνου. Το είδος του πήγματος είναι ασταθές (fibrin s, soluble) και διαλύεται σε αραιά διαλύματα οξέων και βάσεων. Η κατάσταση αυτή του πήγματος αποτελεί το τελικό στάδιο σε άτομα που έχουν έλλειψη του παράγοντα XIII, ο οποίος είναι απαραίτητος για την παραπέρα σταθεροποίηση του ινώδους. Ο παράγοντας αυτός ενεργοποιείται από τη θρομβίνη και συμπεριφέρεται σαν μια τρανσαμινάση, ενός ενζύμου που δεν διασπά δεσμούς αλλά συνδέει. Επίσης σταθεροποιεί με ομοιοπολικές πεπτιδικές συνδέσεις, τους χαλαρούς δεσμούς του ασταθούς συμπλέγματος των μονομερών του ινώδους. Έτσι παράγεται το αδιάλυτο ινώδες (fibrin i, insoluble). Η σταθεροποίηση της πλέξης του ινώδους γίνεται με την σύνδεση των γ -αλυσίδων κατά μήκος και μετά ακολουθεί η εγκάρσια πλέξη με ισοπεπτιδικές συνδέσεις των α -αλυσίδων, ενώ οι β -αλυσίδες δεν συμμετέχουν σαυτή την εργασία. Ακόμα η πλέξη των γ -αλυσίδων γίνεται πολύ γρηγορότερα από αυτήν των α -αλυσίδων, ενώ η ποιότητα και ο βαθμός της δεν εξαρτώνται μόνο από τον χρόνο αλλά και από τον παράγοντα XIII. Έτσι το πλέγμα από ινώδες που σχηματίστηκε, αποτελεί το υπόστρωμα για την είσοδο των ινοβλαστών, οι οποίοι με την ινοσυνδεσίνη (fibronectin), της επιπολής επιφάνειάς τους, συνδέονται με το ινώδες, αφού μεσολαβήσει ο παράγοντας XIII, που έχει ήδη ενεργοποιηθεί. Στη συνέχεια οι ινοβλάστες της τραυματικής περιοχής, συνθέτουν κολλαγόνο, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη συνδετικού ιστού που στεγανοποιεί το τραύμα. Έχει αποδειχθεί ότι, ο ενεργός παράγοντας XIII ευνοεί την ανάπτυξη ινοβλαστών, ενώ η CIG (cold insoluble globulin, αδιάλυτη κρυσφαιρίνη), που αποτελεί την ελεύθερη μορφή της ινοσυνδεσίνης (fibronectin) στο πλάσμα του αίματος, αναστέλλει την ανάπτυξη, γεγονός που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη, για

την αντιμετώπιση τραυμάτων με δύσκολη ίαση. (Τσιρογιάννης Ε., και συν., 1982, Gerstein D.A., et al 1993, Gu X.M., 1995).

Η πραγματική ίαση του τραύματος αρχίζει μετά την απορρόφηση του νεκρωμένου ιστού (απορροφητική φάση) και την ανάπτυξη κοκκιώδους ιστού (επανορθωτική φάση). Ο κοκκιώδης αυτός ιστός σε ορισμένους ιστούς όπως στο χόνδρο και στον οστίτη, μπορεί να διαφοροποιηθεί σε χόνδρο και οστό. Στους περισσότερους όμως ιστούς μετασχηματίζεται σε ουλώδη ιστό. Η ουσιαστική διεργασία για την ίαση μιας βλάβης που δεν μπορεί να αποκατασταθεί με τέλεια αναγέννηση είναι ο σχηματισμός κοκκιώδους ιστού, τον οποίο ο οργανισμός των θηλαστικών διαθέτει πάντα σαν ουσία αντικατάστασης. Η διαδικασία σχηματισμού του κοκκιώδους ιστού, καθώς και του ουλώδους ιστού που προέρχεται από αυτόν εξελίσσεται σε πολλά στάδια. (Τσιρογιάννης Ε., και συν., 1982, Polson C.J., et al, 1984).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, όταν ύστερα από λύση της συνέχειας ενός ιστού (π.χ. μετά από τραύμα), δημιουργηθεί μια σχισμή ή ένας κοίλος χώρος, τότε παρατηρείται έξαγγείωση αίματος, το οποίο στη συνέχεια πήζει με το μηχανισμό που ήδη έχει περιγραφεί και κλείνει τα χείλη του τραύματος. Η λύση όμως της συνέχειας του ιστού προκαλεί γύρω από το τραύμα νέκρωση, η οποία σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί η ίδια να προκαλέσει λύση των ιστών. Στο σημείο της νέκρωσης τα αγγεία του τοπικού τελικού αγγειακού πλέγματος αποφράσσονται από θρόμβους, ώστε να παρεμποδιστεί η παραπέρα έξαγγείωση του αίματος. Ο μηχανισμός αυτός προστατεύει τον οργανισμό από μια μεγάλη απώλεια αίματος που θα μπορούσε να απειλήσει τη ζωή (Μιχαλοδημητράκης Ε., 1997). Με αυτές τις αντιδράσεις του οργανισμού που χαρακτηρίζονται σαν άμεσα μέτρα, πετυχαίνεται τόσο ένας άμεσος περιορισμός της βλάβης του ιστού, όσο και απόφραξη μιας βλάβης της εξωτερικής επιφάνειας. Η επικάλυψη του τραύματος και ο περιορισμός των ιστικών βλαβών, επέρχεται γρήγορα αλλά δεν είναι σταθερός. Έτσι προκύπτει η ανάγκη δημιουργίας σταθερού επουλωτικού ιστού, του κοκκιώδους ιστού. (ονομάζεται κοκκιώδης γιατί κατά την αποκατάσταση των δερματικών τραυμάτων διακρίνονται στην εξωτερική του επιφάνεια μικρά κοκκία που συνδέονται με τον πολλαπλασιασμό των τριχοειδών). Με την δημιουργία του κοκκιώδους ιστού η ιστική βλάβη οργανοποιείται (παθολογική οργανοποίηση), και απομακρύνεται ο νεκρωμένος ιστός. Γιαυτό το λόγο φτάνουν από το κυκλοφορικό στην τραυματική περιοχή κυτταρικά στοιχεία από το αίμα. Πιο αναλυτικά, ύστερα από λίγες ώρες μεταναστεύουν στην περιοχή της βλάβης κοκκιόκυτταρα, λεμφοκύτταρα, και μονοκύτταρα. Τα κοκκιόκυτταρα και τα μονοκύτταρα μακροφάγα, φαγοκυτταρώνουν το νεκρωμένο ιστό και με τα λυσοσωματικά τους ένζυμα τον αποδομούν, ενώ μέσω των λεμφαγγείων τον απομακρύνουν από την περιοχή της βλάβης. Με βάση τις αυτοραδιογραφικές

μεθόδους είναι σχεδόν βέβαιο ότι τουλάχιστον ένα μέρος από τα μακροφάγα που μεταναστεύουν δεν εξυπηρετούν μόνο τη φαγοκυττάρωση της νεκρής ουσίας, αλλά μπορεί αργότερα να μετασχηματίζονται σε κύτταρα του συνδετικού ιστού. Η σημασία των λεμφοκυττάρων θα πρέπει να ερμηνευτεί με την ικανότητά τους να συμμετέχουν σε ανοσοβιολογικά φαινόμενα και να μετατρέπονται σε πλασμοκύτταρα που στη συνέχεια παράγουν αντισώματα. Κατά την επόμενη φάση, στο σχηματισμό του κοκκιώδους ιστού συμμετέχουν και τριχοειδή που προέρχονται από τα τριχοειδή της περιφέρειας της βλάβης. Τα τριχοειδή του κοκκιώδους ιστού αναπτύσσονται από μεμονωμένες κυτταρικές βλάστες-βύσματα, που μορφολογικά εμφανίζονται σαν πολυπύρηννα γιγαντοκύτταρα στο πεδίο της βλάστησης και αργότερα μετασχηματίζονται σε ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία και δομούν το τοίχωμα των τριχοειδών (Τσιρογιάννης Ε., και συν., 1982, Agren M.S., 1992, Gerstein D.A., et al 1993, Gu X.M., 1995, Holt D.R., 1992, Kelman I., et al 1990, Scott A., 1985).

Έχουν απομονωθεί από νεοπλάσματα, παράγοντες που διεγείρουν την ανάπτυξη των τριχοειδών. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα των νεόπλαστων τριχοειδών, παράλληλα προς τα άλλα ένζυμα, έχουν υψηλή πυκνότητα μιας ενεργού ουσίας για το ινωδολυτικό σύστημα. Με την ουσία αυτή είναι δυνατό να ενεργοποιηθεί η λύση του ινώδους, που υπάρχει στην περιοχή της βλάβης. Επιπλέον, η ανάπτυξη νεόπλαστων τριχοειδών δίνει τη δυνατότητα στα κυτταρικά στοιχεία του αίματος να φτάσουν στο κέντρο της περιοχής της βλάβης.

Μεταξύ των τριχοειδών αναπτύσσεται νεαρός συνδετικός ιστός, που προέρχεται από την περιφέρεια της βλάβης. Τα κύτταρα του συνδετικού ιστού που παράγουν την μεσοκυττάρια ουσία, προέρχονται κατά ένα μεγάλο μέρος από το μετασχηματισμό των μονοπύρηννων του αίματος και κατά ένα μικρότερο μέρος από τα τοπικά μόνιμα κύτταρα του συνδετικού ιστού και τα κύτταρα του έξω χιτώνα των αγγείων. Ανεξάρτητα από την προέλευσή τους τα κύτταρα που παράγουν μεσοκυτταρική ουσία, πολλαπλασιάζονται στην περιοχή της βλάβης έντονα. Ύστερα από κάποιο χρονικό διάστημα ο νεοσχηματισμένος ιστός μειώνεται και ο κυτταρικός πληθυσμός σταθεροποιείται "steady state". Με την εμφάνιση των κυττάρων του συνδετικού ιστού, των οποίων την προέλευση δεν μπορούμε να διαπιστώσουμε με το μικροσκόπιο, αρχίζει η σύνθεση της μεσοκυτταρικής ουσίας. Όπως έχει αποδειχθεί, η σύνθεση των πρωτεογλυκανών προηγείται χρονικά από τη σύνθεση του κολλαγόνου.

Με τη σύνθεση της μεσοκυτταρικής ουσίας, αναπτύσσεται ένας έντονα αγγειούμενος νεαρός συνδετικός ιστός, που προωθείται από την περιφέρεια προς το κέντρο της βλάβης μέχρι να γεμίσει το κοίλωμα ή η σχισμή της. Ενώ η διεργασία αυτή εξελίσσεται ακόμα, αρχίζει από την περιφέρεια του τραύματος να μεταβάλλεται η σύσταση του συνδετικού ιστού, για να σχηματιστεί ο ουλώδης ιστός (Tedeschi C.G., 1977, Τσιρογιάννης Ε., και συν., 1982).

Με τη μεταβολή της σύστασης του νεαρού συνδετικού ιστού, μειώνεται και πάλι ο αριθμός των κυττάρων του και παράγεται περισσότερη μεσοκυττάριος ουσία. Έτσι ο ιστός γίνεται πλουσιότερος σε ίνες και προκύπτει τελικά ένας ιστός φτωχότερος σε κυτταρικά στοιχεία και τριχοειδή, που αντικαθιστά τον προηγούμενο μόνιμο ιστό, που υπήρχε στην περιφέρεια της βλάβης. Ο ιστός αυτός ονομάζεται ουλώδης ιστός.

Αυτή είναι γενικά η πορεία σχηματισμού του επανορθωτικού ιστού, έχει δε, πολύ λίγες διαφορές από ιστό σε ιστό. Παρακάτω θα περιγραφούν λεπτομερέστερα τα χαρακτηριστικά της ίασης (δημιουργίας επανορθωτικού ιστού), στα δερματικά τραύματα.

Η ίαση των δερματικών τραυμάτων εξαρτάται από τον τρόπο γένεσής τους και τη μορφολογία τους. Με βάση κλινικά στοιχεία, διακρίνουμε τρεις μορφές ίασης δερματικών τραυμάτων : (Τσιρογιάννης Ε., και συν., 1982).

1. Ίαση κατά πρώτο σκοπό. Παρατηρείται στις περιπτώσεις που τα λεία χείλη του τραύματος βρίσκονται το ένα κοντά στο άλλο ή στις περιπτώσεις που τα χείλη του τραύματος έχουν συμπλησιαστεί με συρραφή. Όλα τα στάδια της ίασης του τραύματος, προχωρούν σχετικά γρήγορα, γιατί απαιτείται μια μικρή μόνο αντίδραση του ιστού.

2. Ίαση κάτω από εσχάρα. Παρατηρείται σε δερματικά τραύματα που δεν είναι εκτεταμένα. Το τραύμα αρχικά καλύπτεται από εσχάρα που παρεμποδίζει τη μόλυνση και την αποξήρανση του τραύματος. Η εσχάρα αυτή μετά την επιθηλιοποίηση πέφτει.

3. Ίαση κατά δεύτερο σκοπό. Παρατηρείται στις περιπτώσεις που τα χείλη του τραύματος απέχουν μεταξύ τους και υπάρχει απώλεια ιστού (π.χ. τραύματα που μολύνθηκαν, που δεν έγινε συρραφή, εγκαύματα). Τα τραύματα στις περιπτώσεις αυτές θα πρέπει να κλείσουν με κοκκιώδη ιστό, για να ακολουθήσει πλήρωση του κοιλώματος ή της σχισμής με ουλώδη ιστό.

Ανεξάρτητα με τη μορφή ίασης των τραυμάτων, η βιολογική εξεργασία είναι ποιοτικά η ίδια και διαχωρίζεται σε τέσσερις φάσεις:

α. Εξιδρωματική φάση. Η φάση αυτή περιλαμβάνει την αγγειακή απάντηση, την διαδικασία της αιμόστασης και την κυτταρική απάντηση, στην τραυματική περιοχή. Αμέσως μετά τον τραυματισμό, παρατηρείται τοπικά αγγειοσυστολή στην τραυματική περιοχή, που διαρκεί για λίγα λεπτά της ώρας. Στη συνέχεια παρατηρείται αγγειοδιαστολή και αύξηση της διαπερατότητας πρωτεϊνών του πλάσματος, η οποία φτάνει στο μέγιστό της σε 10 λεπτά της ώρας περίπου. Μετά ακολουθεί η φάση της αιμόστασης, κατά την οποία, πρώτα τα τριχοειδή και στη συνέχεια τα μεγαλύτερα αγγεία σταματούν να αιμορραγούν και πήζει το αίμα και το πλάσμα που έχει ήδη εξαγγειωθεί στην τραυματική περιοχή. Αν η βλάβη δεν είναι εκτεταμένη, όλο το κενό

που έχει δημιουργηθεί γεμίζει με πηγμένο αίμα. Στην εξωτερική επιφάνεια το πηγμένο αίμα ξεραίνεται ελαφρά και σχηματίζει ένα πυκνό υμένιο (εσχάρα) από ινώδες, ερυθροκύτταρα και κοκκιοκύτταρα. Αν η βλάβη είναι πολύ μεγάλη, μόνο ο πυθμένας του δημιουργούμενου κενού καλύπτεται από πηγμένο αίμα. Τέλος ακολουθεί η κυτταρική απάντηση, που σύμφωνα με την άποψη των περισσότερων ερευνητών διαρκεί από την 4^η έως την 24^η ώρα μετά των τραυματισμό. Πάντως οι απόψεις των ερευνητών συγκλίνουν στο ότι παρά την παρουσία λευκοκυττάρων στην τραυματική περιοχή από την 4^η - 5^η μετά τον τραυματισμό ώρα, δεν μπορεί να γίνει αντιληπτή μια σαφής και οργανωμένη λευκοκυτταρική απάντηση πριν την 8^η - 10^η ώρα. Μετά την 16^η ώρα από τον τραυματισμό, μπορεί να διακριθούν στην τραυματική περιοχή 2 ζώνες. Η κεντρική ή εσωτερική ζώνη, βάθους περίπου 500μm, στην οποία τα κύτταρα του συνδετικού ιστού παρουσιάζουν καρυόλυση και καρυόρρηξη, μετά δε τις 32 ώρες εμφανίζεται νέκρωση της περιοχής. Η περιφερειακή ή εξωτερική ζώνη που περιβάλλει την κεντρική, παρουσιάζει το πρώτο 24ωρο αύξηση του αριθμού και δραστηριοποίηση των ινωβλαστών και των ουδετερόφιλων, τα επίπεδα των οποίων παραμένουν μέχρι την 2^η - 3^η ημέρα. Τα μεγάλα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα κάνουν την εμφάνισή τους την 16^η - 24^η ώρα, και φτάνουν στην μεγαλύτερη τιμή τους την 48^η περίπου ώρα. (Gu X.M.,1995,Kawaguchi Y. et al 1996, Raekallio J. 1984, Tedeschi C.G., 1977, Τσιρογιάννης Ε., και συν., 1982).

β. Απορροφητική φάση. Σε κάθε χείλος του τραύματος σχηματίζεται μια νεκρωτική ζώνη του ιστού. Η νέκρωση αυτή εξαρτάται από τον τρόπο γένεσης του τραύματος και η έκτασή της ποικίλλει. Ο νεκρός ιστός πρέπει να απορροφηθεί πριν αρχίσει ο πολλαπλασιασμός των εκεί κυτταρικών στοιχείων, δηλαδή πριν την επανόρθωση (επούλωση). Στη φάση αυτή συμμετέχουν εξαιτίας της φαγοκυτταρικής τους ικανότητας, τα κοκκιοκύτταρα και τα μονοπύρηνα που μεταφέρονται στην τραυματική περιοχή με το αίμα, καθώς επίσης και τα ιστιοκύτταρα που προέρχονται από τα τοπικά μόνιμα κύτταρα. Τα μονοπύρηνα και τα τοπικά μόνιμα κύτταρα σχηματίζουν τα μακροφάγα. Η διάρκεια της απορρόφησης εξαρτάται, τόσο από την έκταση της νέκρωσης στην περιφέρεια του τραύματος, όσο και από τον τρόπο δημιουργίας του.

γ. Παραγωγική φάση. Η φάση αυτή χαρακτηρίζεται από τη δημιουργία του κοκκιώδους ιστού. Η ποσότητα του κοκκιώδους ιστού και κατεπέκταση η χρονική διάρκεια της παραγωγικής φάσης, εξαρτάται, από την έκταση της βλάβης του ιστού. Όπως είναι φανερό η ποσότητα του κοκκιώδους ιστού που αναπτύσσεται σε τραύματα με σχισμοειδή μορφή (χειρουργική συμπλησίαση των χειλών του τραύματος), είναι σημαντικά μικρότερη από αυτήν των εκτεταμένων βλαβών. Σε μελέτες που έγιναν σε πειραματόζωα, αναφέρεται ότι η φάση αυτή αρχίζει από την

23^η μετά τον τραυματισμό ώρα, ενώ στον άνθρωπο λίγο αργότερα δηλαδή μεταξύ 24^{ης} και 48^{ης} ώρας.

δ. Επουλωτική φάση. Η μεγαλύτερη ποσότητα της μεσοκυττάριας ουσίας παράγεται αφού στην τραυματική περιοχή τελειώσει η παραγωγή του κοκκιώδους ιστού. Βέβαια, η μεσοκυττάρια ουσία αρχίζει να παράγεται σε μικρές όμως ποσότητες, συγχρόνως με την παραγωγή του κοκκιώδους ιστού. Ο συνδετικός ιστός που παράγεται με την παραπάνω διαδικασία, σταθεροποιεί μηχανικά το τραύμα. Τα λεμφοκύτταρα εμφανίζονται πρώτα και φτάνουν στη μεγαλύτερη συγκέντρωσή τους την 6^η μετά τον τραυματισμό μέρα.

Παράλληλα με τον σχηματισμό του επουλωτικού συνδετικού ιστού, σημασία έχει και η επιθηλιοποίηση της βλάβης, με την οποία αποκαθίσταται και η εξωτερική επιφάνεια του δέρματος. Η επιθηλιοποίηση αρχίζει από την περιοχή των χειλών του τραύματος όπου τα κύτταρα της βλαστικής στοιβάδας της επιδερμίδας πολλαπλασιάζονται έντονα, πάνω από τον συνδετικό ιστό και διαφοροποιούνται σε κύτταρα της πολύστοιβης επιδερμίδας. Η διάρκεια της επιθηλιοποίησης εξαρτάται από την έκταση του κενού που πρέπει να καλυφθεί. Το αποτέλεσμα της ίασης των δερματικών τραυμάτων είναι η ουλή. Στην κατά πρώτο σκοπό ίαση, αναπτύσσεται μια ουλή που μοιάζει με επίχρισμα και δεν προκαλεί καμιά λειτουργική διαταραχή. Σε ορισμένα τραύματα όμως, όπου αναπτύσσεται μεγάλη ποσότητα ουλώδους ιστού, ενδέχεται να δημιουργηθούν λειτουργικές διαταραχές (π.χ. ουλή κοντά στις αρθρώσεις). Η ουλή αποτελεί τρόπο ίασης όχι με τέλεια αναγέννηση, πράγμα που επιβεβαιώνεται και από ορισμένες ιδιότητες των ουλών του δέρματος όπως:

- * Η επιδερμίδα στην περιοχή της δερματικής ουλής δεν χρωματίζεται κατά την επίδραση υπεριωδών ακτινών, αλλά παραμένει λευκή. Η αναγέννηση της επιδερμίδας δεν συνοδεύεται από σχηματισμό μελανοκυττάρων.

- * Επικουρικοί σχηματισμοί (εξαρτήματα) του δέρματος όπως τρίχες, σμηγματογόνοι και ιδρωτοποιοί αδένες, δεν αναγεννώνται στην περιοχή των ουλών.

- * Επίσης στις δερματικές ουλές δεν παρατηρείται έντονος νεοσχηματισμός ελαστικών ινών.

Η διεργασία της ίασης ενός δερματικού τραύματος μπορεί να διαταραχθεί από ορισμένους παράγοντες όπως, μόλυνση, συγκέντρωση υγρού στην τραυματική κοιλότητα, υπέρμετρη παραγωγή κοκκιώδους ιστού, σχηματισμό χηλοειδούς κλπ. Οι παράγοντες αυτοί μπορεί να δράσουν σε μια ή περισσότερες φάσεις της επανόρθωσης και είναι δυνατόν να επηρεάσουν την εξέλιξη και να επιβραδύνουν την ίαση των δερματικών τραυμάτων. (Agren M.S., 1992, Gerstein D.A., et al 1993, Gu X.M., 1995, Holt D.R., 1992, Kelman I., et al 1990, Kawaguchi Y. et al 1996, Scott A., 1985, Raekallio J. 1984, Tedeschi C.G., 1977, Τσιρογιάννης Ε., και συν., 1982).

4. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ.

Επειδή στην εργασία αυτή γίνεται προσπάθεια προσδιορισμού της ηλικίας δερματικών τραυμάτων, κρίθηκε σκόπιμο να γίνει μια σύντομη αναφορά στη μορφολογία του δέρματος.

Το δέρμα αποτελεί ένα εκτεταμένο όργανο που επενδύει την εξωτερική επιφάνεια του σώματος. Η δομή του διαφέρει ανάλογα με τη θέση και τις εξειδικευμένες λειτουργίες του. Οι βασικές λειτουργίες που επιτελεί είναι:

- Προασπιστική, από εξωτερικούς επιβλαβείς παράγοντες.
- Θερμορυθμιστική.
- Εκκριτική και απεκκριτική.
- Αισθητική, για αφή, πίεση, πόνο και αίσθηση θερμοκρασίας.

Το δέρμα αποτελείται από τρεις στιβάδες, την επιδερμίδα, το χόριο ή δερμίδα και τον υποδόριο ιστό ή υποδερμίδα. Περιλαμβάνει επίσης τα εξαρτήματα του δέρματος καθώς και τους σμηγματογόνους, ιδρωτοποιούς και μαστικούς αδένες. (Μιχαήλ Σ.,1975, Stevens A. et al 1993).

4.1 ΕΠΙΔΕΡΜΙΔΑ.

Η επιδερμίδα συνιστά την επιφανειακή στιβάδα του δέρματος, οι καταδύσεις της οποίας δημιουργούν τους ιδρωτοποιούς αδένες, τα τριχοθυλάκια και άλλα επιδερμικά εξαρτήματα. Δομείται από πολύστιβο επιθήλιο και χωρίζεται από έξω προς τα έσω, στις τέσσερις παρακάτω στιβάδες

***Την κερατίνη στιβάδα** (stratum corneum).

***Τη διαυγή στιβάδα** (stratum lucidum), που θεωρείται σαν την εν τω βάθει μοίρα της κερατίνης στιβάδας.

***Την κοκκώδη στιβάδα** (stratum granulosum).

***Τη βλαστική στιβάδα** (stratum germinativum) που συνίσταται από τη **βασική στιβάδα** (stratum basale) και την **ακανθωτή στιβάδα** (stratum spinosum). (Μιχαήλ Σ.,1975, Stevens A. et al 1993).

4.2 ΧΟΡΙΟ Ή ΔΕΡΜΙΔΑ.

Το χόριο αποτελεί τον στηρικτικό ιστό της επιδερμίδας, μέσα στο οποίο βρίσκονται τα εξαρτήματα του δέρματος, τα αιμοφόρα και τα λεμφικά αγγεία και τα νεύρα. Συνίσταται από ινοκύτταρα, ινοβλάστες, κολλαγόνες και δικτυωτές ίνες, αιμοφόρα αγγεία, εξωκυττάρια θεμέλια ουσία με γλυκοζαμινογλυκάνες, και μικρό αριθμό μακροφάγων, λεμφοκυττάρων και σιτευτικών κυττάρων. Χωρίζεται σε δυο στιβάδες:

***Τη θηλώδη στιβάδα** (stratum papillare), επιπολής.

***Τη δικτυωτή στιβάδα** (stratum reticulare) εν τω βάθει.

4.3 ΥΠΟΔΟΡΙΟΣ ΙΣΤΟΣ Ή ΥΠΟΔΕΡΜΙΔΑ.

Ο υποδόριος ιστός αποτελείται στο μεγαλύτερο μέρος του από λιποκύτταρα που χωρίζονται από ινοκολλαγονώδη διαφράγματα και περιέχει τα βασικά νεύρα και αιμοφόρα αγγεία, με τα οποία εφοδιάζεται το υπερκείμενο χόριο. Λειτουργεί σαν θερμομονωτικό υλικό, σαν διαμέρισμα αποθήκευσης θρεπτικών ουσιών αλλά και σαν υλικό απορρόφησης των δονήσεων. (Μιχαήλ Σ.,1975, Τσιρογιάννης Ε., και συν. 1982)

4.4 ΤΑ ΕΞΑΡΤΗΜΑΤΑ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ.

1. Οι τρίχες.

Η επιφάνεια του σώματος των περισσότερων ζωικών ειδών, εκτός από ορισμένες περιοχές όπως ο κενεώνας, η μασχαλαία και η βουβωνική χώρα, καλύπτεται από πυκνό τρίχωμα. Εξάιρεση από τα κατοικίδια ζώα αποτελεί ο χοίρος. Οι τρίχες ξεκινούν από σωληνοειδείς καταδύσεις της επιδερμίδας που ονομάζονται θύλακοι των τριχών και φτάνουν στην επιφάνεια του σώματος. Επίσης διακρίνονται ο βολβός (bulbus pili), η ρίζα (radix pili), το στέλεχος (scapus pili), και οι ανελκτήρες μύες (muscoli arrectorew pilorum) των τριχών. Το χρώμα των τριχών, προσδιορίζει και τον χρωματισμό των ζώων. (Μιχαήλ Σ.,1975, Τσιρογιάννης Ε., και συν. 1982)

2. Τα κεράτινα φύματα του δέρματος. (το κάστανο ή ονύχωμα και το κεντρίον)

3. Τα κέρατα.

4. Οι σπλές, οι χηλές και τα νύχια.

Οι αδένες του δέρματος

1. Οι σμηγματογόνοι αδένες.

2. Οι ιδρωτοποιοί αδένες.

3. Οι μαστικοί αδένες.

5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 ΥΛΙΚΑ - ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

5.1.1 ΣΤΟΧΟΣ ΤΟΥ ΠΕΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΥ.

Ο βασικός σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση με ιστοχημικές μεθόδους των αλλαγών της ενζυμικής δραστηριότητας, που λαμβάνει χώρα στην τραυματική περιοχή, (εμφάνιση, αύξηση, σταδιακή μείωση), σε σχέση με το χρονικό διάστημα από τον τραυματισμό. Τα τραύματα γινόταν στο δέρμα. Συνεπώς η βάση του πειραματικού σχεδιασμού ήταν η δημιουργία δερματικών τραυματικών κακώσεων σε συγκεκριμένους χρόνους και η ιστοχημική διερεύνηση των ενζυμικών αντιδράσεων σε δείγμα (ιστοτεμάχιο), το οποίο λαμβανόταν από την τραυματική περιοχή, σε καθορισμένο χρόνο.

5.1.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ.

Είδος : Κουνέλια.

Φυλή : Νέας Ζηλανδίας.

Αριθμός : 80 πειραματόζωα.

Χρώμα : Λευκό.

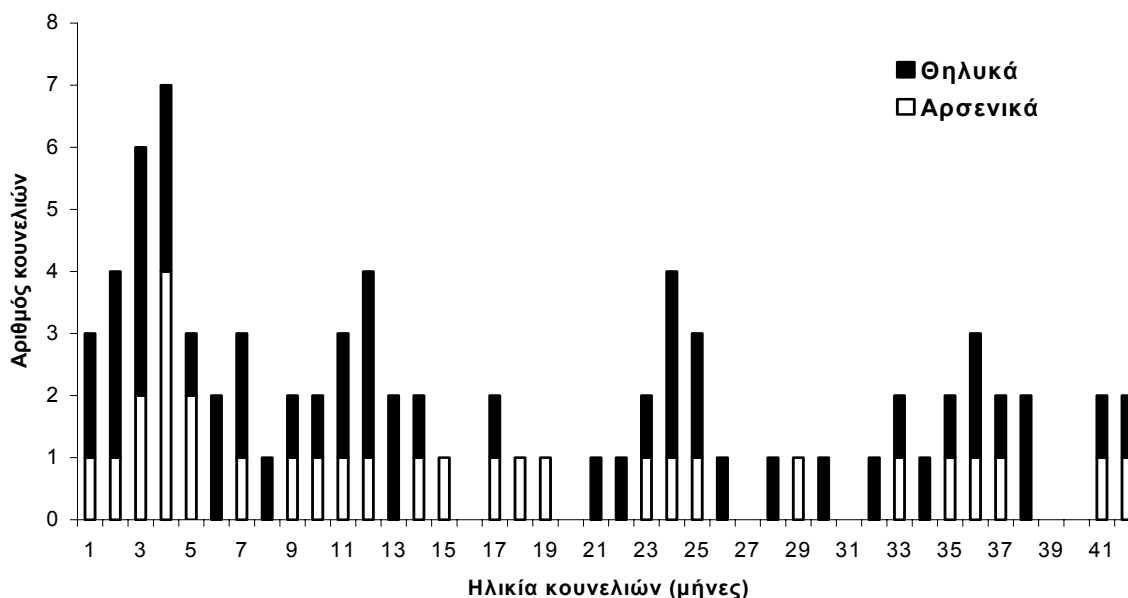
Φύλλο : 50 θηλυκά και 30 αρσενικά.

Ηλικία : Από 1 ως 42 μηνών.

Ζώντος βάρους : 300 – 4.000 γραμμάρια.

Προέλευση : Τα κουνέλια προερχόταν από συστηματικές εκτροφές στις οποίες οι συνθήκες υγιεινής, εκτροφής και διατροφής, ήταν πολύ καλές.

Προληπτικές ή θεραπευτικές παρεμβάσεις : Στα ζώα, ανάλογα με την ηλικία αγοράς τους, είχαν γίνει οι απαραίτητοι εμβολιασμοί (αιμορραγικής νόσου των κουνελιών, κλωστριδιακών λοιμώξεων, κλπ) και είχαν χορηγηθεί κοκκιδιοστατικά και αντιπαρασιτικά σκευάσματα. Τέλος, επιλεγόταν ζώα τα οποία μετά από κλινική εξέταση χαρακτηρίζονταν "κλινικά υγιή". Μετά την μεταφορά τους στους χώρους παραμονής των πειραματόζωων, η παρακολούθησή τους συνεχιζόταν τουλάχιστον 2 φορές την εβδομάδα. Με αυτό τον τρόπο εξασφαλιζόταν η καλή κατάσταση της υγείας των κουνελιών, πράγμα απαραίτητο για την εξαγωγή ορθών αποτελεσμάτων σε οποιασδήποτε φύσης in vivo πειραματισμών.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 2: Κατανομή-αντιστοιχία ηλικίας και φύλου των πειραματόζωων.

5.1.3 ΤΡΟΠΟΣ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΚΑΙ ΘΕΣΗ ΤΩΝ ΤΡΑΥΜΑΤΩΝ (ΤΟΜΩΝ).

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένα, οι τραυματικές κακώσεις που δημιουργούσαμε, γινόταν στο δέρμα. Αυτή την μεθοδολογία ακολουθούν και άλλοι ερευνητές, οι οποίοι πειραματίζονται και διερευνούν τις μεθόδους προσδιορισμού της ηλικίας των τραυματικών κακώσεων. Ο βασικός λόγος χρησιμοποίησης του δερματικού ιστού, σαν ιστός μέτρησης της ηλικίας των τραυματικών κακώσεων, αποτελεί το γεγονός ότι, επειδή το δέρμα περιβάλλει και καλύπτει το σώμα, είναι προφανές ότι κατά την διάρκεια της δημιουργίας ενός τραύματος, σίγουρα θα τραυματιστεί και αυτό. Δεν υπάρχει πρακτικά τραυματισμός, δηλαδή λύση της συνέχειας ενός ιστού, που προκαλείται από εξωγενές αίτιο, χωρίς προηγουμένως να υπάρξει λύση της συνέχειας του δέρματος, δηλαδή δερματικό τραύμα (Betz P. 1994, Betz P. 1995(a), Betz P. 1999, Raekallio J. 1980, Perper A.J. et al 1980).

Μετά από τοπική αναισθησία (με ξυλοκαΐνη), γινόταν με νυστέρι, ευθείες τομές στο δέρμα των κουνελιών. Το μήκος των τομών ήταν 1-2 εκατοστά του μέτρου και το βάθος τους, όσο το πάχος του δέρματος. Ανατομικά οι περιοχές στις οποίες γινόταν οι τομές στο σώμα των κουνελιών, ήταν, το δέρμα της περιοχής των γλουτών, των μηρών και της ωμοπλάτης. Οι περιοχές αυτές επιλέχθηκαν γιατί κάτω από το δέρμα υπάρχουν μεγάλες μυϊκές μάζες και ελαχιστοποιούνται οι περιπτώσεις κακώσεων, από σφάλμα, ζωτικών οργάνων ή συστημάτων. Με την ίδια ακριβώς μεθοδολογία πραγματοποιούνταν και τα μεταθανάτια τραύματα στο πτώμα των κουνελιών, χωρίς προφανώς την χορήγηση τοπικής αναισθησίας.

5.1.4 ΑΡΙΘΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΘΑΝΑΤΙΩΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑΘΑΝΑΤΙΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΕΞΕΤΑΣΤΗΚΑΝ ΚΑΙ ΧΡΟΝΙΚΑ ΔΙΑΣΤΗΜΑΤΑ ΜΕΤΕΞΥ ΤΟΥ ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΗΨΗΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ (ΙΣΤΟΤΕΜΑΧΙΩΝ).

Εξετάστηκαν συνολικά **505 δείγματα (ιστοτεμάχια)** από **δερματικά τραύματα**. Από αυτά, τα **410 δείγματα αντιστοιχούσαν σε προθανάτια** και **95 σε μεταθανάτια** δερματικά τραύματα.

Το **χρονικό διάστημα** από την πρόκληση των **410 προθανάτιων τραυμάτων** ως τη λήψη των αντίστοιχων δειγμάτων κυμαινόταν από **0.5 έως 144 ώρες**. Πιο συγκεκριμένα, τα χρονικά διαστήματα από τον τραυματισμό ως τη λήψη των δειγμάτων ήταν 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 6, 12, 20, 24, 32, 48, 72, 96, 120 και 144 ώρες.

Τα **95 δείγματα μεταθανάτιων** τραυμάτων, προκαλούταν, **0.5 έως 4 ώρες** μετά τον θάνατο των πειραματόζων, και συγκεκριμένα 0.5, 1, 2, 3, 4, μετά θάνατον ώρες. Στα μεταθανάτια τραύματα επίσης, το **χρονικό διάστημα από την πρόκληση των τραυμάτων, ως τη λήψη των δειγμάτων**, κυμαινόταν από **1 έως 32 ώρες**. (1, 2, 3, 3.5, 12, 20, 24, 32 ώρες).

5.1.5 ΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΕΞΕΤΑΣΤΗΚΑΝ ΣΕ ΟΜΑΔΕΣ.

Συνολικά τα 505 δείγματα από προθανάτια και μεταθανάτια τραύματα που εξετάστηκαν, χωρίστηκαν σε 3 ομάδες.

1^η ομάδα : Περιλάμβανε **360 δείγματα προθανάτιων τραυμάτων**, των οποίων η λήψη από την τραυματική περιοχή γινόταν αμέσως μετά τον θάνατο (ευθανασία) των πειραματόζων.

2^η ομάδα : Περιλάμβανε τα υπόλοιπα **50 δείγματα προθανάτιων τραυμάτων**, των οποίων η λήψη από την τραυματική περιοχή γινόταν 6 ώρες έως 72 ώρες, μετά από το θάνατο των ζώων.

3^η ομάδα : Περιλάμβανε δείγματα από τα **95 μεταθανάτια τραύματα**.

5.1.6 ΔΙΑΣΤΑΣΕΙΣ ΚΑΙ ΤΡΟΠΟΣ ΛΗΨΗΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.

Τα δείγματα (ιστοτεμάχια), ήταν κομμάτια δέρματος, σχήματος ορθογωνίου παραλληλογράμμου, μήκους περίπου 3 εκατοστών του μέτρου, πλάτους περίπου 2 εκατοστών και βάθους όσο το πάχος του δέρματος, τα οποία περιείχαν ολόκληρο το τραύμα που είχαμε δημιουργήσει.

Η λήψη των δειγμάτων (ιστοτεμαχίων), γινόταν κάτω από συνθήκες γενικής αναισθησίας ή μετά από ευθανασία των πειραματόζων. Η γενική αναισθησία γινόταν με ενδομυϊκή χορήγηση κεταμίνης (0,5 ml \ χιλιόγραμμα ζ.β.) και ξυλαζίνης (Rompun 0,5 ml \ χιλιόγραμμα ζ.β.) (Bean J. K., et al, 1995). Η λήψη των δειγμάτων μετά από γενική αναισθησία εγκαταλείφθηκε για δυο λόγους. Πρώτο λόγο αποτέλεσε

το γεγονός ότι χανόταν πολύτιμος χρόνος για τη συρραφή και περιποίηση των τραυμάτων που δημιουργούταν από την λήψη των δειγμάτων. Είναι δε γνωστό ότι στις ιστοχημικές ενζυμολογικές εξετάσεις το χρονικό διάστημα μεταξύ λήψης του δείγματος και εξέτασής του, πρέπει να είναι το μικρότερο δυνατό. Ο δεύτερος λόγος ήταν ο μεγάλος αριθμός των δειγμάτων ανά πειραματόζωο και κατά συνέπεια η μεγάλη συνολικά αποσπώμενη επιφάνεια του δέρματος κύρια σε κουνέλια μικρής ηλικίας.

5.1.7 ΨΥΞΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.

Τα δείγματα, αμέσως μετά την λήψη τους από τα πειραματόζωα, ψυχόταν σε υγρό άζωτο (-190 οC), σε θερμός Dewar's για 1 λεπτό περίπου. Με αυτό τον τρόπο πετυχαίναμε η απότομη ψύξη και μικροκρυστάλωση του ιστού, με συνέπεια τη διατήρηση τόσο της ιστολογικής δομής του, (αποφυγή της ρήξης των κυττάρων), όσο και των ενζύμων που περιέχει. Μειονέκτημα αυτής της μεθόδου ψύξης αποτελεί η ρήξη, το ράγισμα που μπορεί να υποστούν οι μαλακοί ιστοί, (σαν ιστοί και όχι σαν κύτταρα), λόγω της απότομης διαστολής τους (Τσαβαρής Ν., 1977, Bancroft J.D., et al 1977, Vacca L.,1985, Meijer A.E.,et al, 1977).Στη συνέχεια άλλα δείγματα μεταφερόταν στον κρυστάτη για κοπή και ιστοχημικές εξετάσεις και άλλα φυλασσόταν σε ειδικό καταψύκτη σε θερμοκρασία - 80οC. Στη θερμοκρασία αυτή παρατηρήθηκε ότι τα ένζυμα παραμένουν σχεδόν αναλλοίωτα, τουλάχιστον για 10 ημέρες. Ειδικά, η δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης διατηρείται σε πολύ καλά επίπεδα για περίπου 24 μήνες (Song J.Y,et al, 1996).

5.1.8 ΤΟΜΕΣ . ΤΕΧΝΙΚΗ ΣΤΟΝ ΚΡΥΟΣΤΑΤΗ.

Ο κρυστάτης ουσιαστικά είναι ένας ψυκτικός θάλαμος μέσα στον οποίο υπάρχει ένας μικροτόμος και δίνει τη δυνατότητα να γίνουν και να παραληφθούν πολύ καλές τομές. Ο κρυστάτης αποτελεί σήμερα μέθοδο επιλογής, για τομές που προορίζονται για εξετάσεις ιστοχημικές, ανοσοιστοχημικές καθώς και ταχεία βιοψία. (Δελίδης Γ., 1989). Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της χρήσης του κρυστάτη είναι η δημιουργία πολλών, λεπτών τομών, σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα από την λήψη των ιστοτεμαχίων (γιατί δεν απαιτείται η διαδικασία μονιμοποίησης και έγλεισης σε παραφίνη) και χωρίς σκληρές διαδικασίες για τα κυτταρικά στοιχεία (ένζυμα) . Για την δημιουργία καλών τομών ιδιαίτερα σε μη μονιμοποιημένους ιστούς, συνιστάται η κοπή φρέσκων και γρήγορα ψυγμένων ιστοτεμαχίων, από άτομα που έχουν γνώσεις και εμπειρία στην τεχνική κοπής στον κρυστάτη (Vacca L., 1985). Κατά την διάρκεια κοπής των ιστοτεμαχίων, ή θερμοκρασία του θαλάμου ρυθμίζεται για μεν τους μαλακούς ιστούς στους -15 έως -20οC, για δε τους σκληρούς στους -23 έως -25οC. Η κοπή ιστοτεμαχίου στη σωστή θερμοκρασία, εξασφαλίζει τη

δημιουργία καλών τομών (Bancroft J.D, et al 1977, Bancroft J.D, 1967, Coodley E.L., 1970, Culling C.F.A., 1974).

Στη δική μας έρευνα, τα δείγματα (ιστοτεμάχια), κοβόταν στον κρουστάτη, σε θερμοκρασία $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, θερμοκρασία που θεωρείται η πιο κατάλληλη για τομές δέρματος. Το ιστοτεμάχιο τοποθετούταν στην τράπεζα κοπής, κάθετα προς το μαχαίρι του κρουστάτη, ώστε στην τομή που κάναμε, να εμφανίζεται κατά σειρά υγιής, τραυματικός και υγιής ιστός (**ΕΙΚ. 18**). (Perper A.J., et al 1980, Fujimoto K., et al 1997). Το πάχος των τομών ήταν 10 μίκρον (μm). Τομές πάχους μικρότερου των 10 μίκρον, μπορεί να δώσουν ασθενέστερη χρώση της ενζυμικής δραστηριότητας (Bell L., et al 1979). Στη συνέχεια, οι τομές αυτές τοποθετώταν σε ειδικά επεξεργασμένες αντικειμενοφόρους (super frost plus) και προωθούνταν για ιστοχημικές εξετάσεις. Σε κάθε δείγμα γινόταν και χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης.

Ορισμένες από τις παραπάνω τομές, τις χρησιμοποιούσαμε για **μάρτυρες**. Οι μάρτυρες περιείχαν ιστό από την τραυματική περιοχή, όπως ακριβώς και τα κανονικά παρασκευάσματά μας, αλλά στη συνέχεια επωαζόταν σε επωαστικό διάλυμα, που δεν περιείχε το αντίστοιχο για το ένζυμο υπόστρωμα.

5.1.9 ΙΣΤΟΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ.

- α -naphthyl phosphate. Sigma. K. N-7000
- Tris. Merck. K-22700382
- Fast red TR. Sigma. K. F-2768.
- Methyl green.
- ΓΛΥΚΕΡΙΝΗ.
- Naphthol AS BI phosphate. Sigma. K. N-2250.
- N:N' Dimethylformamide. Sigma. K. D-8654
- ATP dissodium salt. Sigma. K. 2477.
- Lead nitrate. Sigma. K. L-6258.
- Magnesium sulfate. Merk. K. 1012.
- 2,4 Dinitrophenol. Sigma. K. D-4000.
- Ammonium sulfide. Sigma. K. A-1952.
- α -naphthyl acetate. Sigma. K. N-8505.
- Acetone. Sigma. K. A-4206.
- Fast blue B salt. Sigma. K. D-3502.
- Naphthol ASD. Sigma. K. N-2750.
- Fast blue RR. Sigma. K. F-0500.
- Nuclear fast red. Sigma. K. N-8002.
- Naphthol AS LC acetate. Sigma. K. N-1500.
- Fast garnet GBC. Sigma. K F-0875.

5.1.10 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ.

Οι τομές μετά την επώαση ελεγχόταν καταρχήν και σε συνδυασμό με τους μάρτυρες, για να προσδιοριστεί τυχόν σφάλμα προσδιορισμού ή εντόπισης. Στη συνέχεια γινόταν συστηματική παρατήρηση των τομών σε μικροσκόπιο, χρησιμοποιώντας με τη σειρά τις μεγεθύνσεις X 4, X 10, X 20 και X 40. Τέλος ελεγχόταν ιστολογικά οι τομές με χρώση αιματοξυλίνης-Ηωσίνης.

5.1.11 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ.

Για την εκτίμηση της ενζυμικής δραστηριότητας της τραυματικής περιοχής, δηλαδή την εμφάνιση οργανωμένης ενζυμικής αντίδρασης, την αύξηση της για κάποιο χρονικό διάστημα και στη συνέχεια τη μείωσή της, χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω διαβάθμιση, (κλίμακα):

0	: Δεν παρατηρείται ενζυμική δραστηριότητα.
1 +	: Ελάχιστη ένταση της ενζυμικής δραστηριότητας (μόλις ορατή).
2 +	: Αύξηση της έντασης της ενζυμικής δραστηριότητας (ορατή).
3 +	: Αύξηση της έντασης της ενζυμικής δραστηριότητας (καλά ορατή).
4 +	: Αύξηση της έντασης της ενζυμικής δραστηριότητας (πολύ καλά ορατή).
5 +	: Μέγιστη ένταση της ενζυμικής δραστηριότητας.

5.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΙΣΤΟΧΗΜΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ.

Είναι γεγονός αναμφισβήτητο ότι οι ιστοχημικές ενζυμικές μέθοδοι, από την πρώτη χρησιμοποίησή τους ως τα σήμερα, έχουν τροποποιηθεί πολλές φορές, με γνώμονα πάντα την βελτίωση των αποτελεσμάτων τους. Βάσει λοιπόν των παραπάνω και στη δική μας έρευνα, καταβλήθηκε προσπάθεια για την συλλογή όσο το δυνατό περισσότερων βιβλιογραφικών δεδομένων σχετικών με τη μεθοδολογία των ενζυμικών αντιδράσεων που θέλαμε να διερευνήσουμε. Στη συνέχεια εφαρμόσαμε ορισμένες από αυτές, σημειώσαμε τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά των και επιλέξαμε αυτήν που έδιδε τα καλύτερα, ευκρινέστερα, αποτελέσματα.

5.2.1 ΜΕΘΟΔΟΙ ΙΣΤΟΧΗΜΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΑΛΚΑΛΙΚΗΣ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗΣ.

Πραγματοποιήθηκε ιστοχημικός προσδιορισμός της αλκαλικής φωσφατάσης σε **300 προθανάτια** και **95 μεταθανάτια** τραύματα. *Αρνητικοί μάρτυρες:* Ιστός από την τραυματική περιοχή που αφαιρέθηκε το υπόστρωμα.

Εφαρμόστηκαν δύο τύποι ιστοχημικών μεθόδων για την παρουσίαση της δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης. Αυτοί περιγράφονται αμέσως παρακάτω :

1. Μέθοδος της ταυτόχρονης σύζευξης (Simultaneous Coupling Method).

α. Μέθοδοι της Αζο-βαφής (Azo Dye Methods).

Η μέθοδος αυτή έχει πρώτα περιγραφεί από τους Menton, Junge και Green, το 1944. Η αρχική μέθοδος έχει τροποποιηθεί μεταγενέστερα από πολλούς ιστοχημικούς ερευνητές, μεταξύ των οποίων και ο Comori (1951). Στη μέθοδο χρησιμοποιείται σαν υπόστρωμα το *a*-naphthol phosphate, σε συνδυασμό με ένα κατάλληλο διαζωνικό άλας. Το PH του επωαστικού διαλύματος ρυθμίζεται στο 9.2.

Η αλκαλική φωσφατάση απελευθερώνει από το υπόστρωμα *a*-naphthol, το οποίο στη συνέχεια συζευγνύεται με το διαζωνικό άλας, παράγοντας αδιάλυτη αζοβαφή στα σημεία της ενζυμικής δραστηριότητας. Όσο ταχύτερα προχωρήσει η σύζευξη μεταξύ του *a*-naphthol και του διαζωνικού άλατος, τόσο τα αποτελέσματα είναι καλύτερα. (Bancroft J.D, et al 1977, Culling C.F.A., 1974). Η ταχύτητα προόδου της σύζευξης εξαρτάται κατά κύριο λόγο από την επιλογή του διαζωνικού άλατος, αλλά και από το PH της αντίδρασης (Espada J. et al 1996, Bucher F. et al 1993, Vacca L., 1985, Bancroft J.D, et al 1977, Culling C.F.A., 1974)..

Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια

- * Sodium *a*-naphthyl phosphate
- * Ρυθμιστικό διάλυμα Tris 0,1 M
- * Διαζωνικό άλας Fast red TR

Επωαστικό διάλυμα

- **Sodium *a*-naphthyl phosphate.....10mg
- **Ρυθμιστικό διάλυμα Tris 0,1M, PH 10,0.....10ml
- **Διαζωνικό άλας Fast red TR10mg

Το *a*-naphthyl phosphate διαλύεται στο ρυθμιστικό διάλυμα και στη συνέχεια προστίθεται το διαζωνικό άλας. Ακολουθεί καλή ανάδευση και φιλτράρισμα του επωαστικού διαλύματος κατευθείαν πάνω στις τομές. Το τελικό PH του επωαστικού διαλύματος είναι 9.2-9.4.

Διαδικασία επώασης

- ***Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10-60 λεπτά.
- ***Πλύσιμο σε απεσταγμένο νερό
- ***Αντίχρωση με πράσινο του μεθυλενίου 2% (Methyl green) chloroform extracted.
- ***Καλό ξέπλυμα με νερό της βρύσης.
- ***Τοποθέτηση γλυκερίνης, κάλυψη, παρατήρηση.

Αποτελέσματα

Η δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης χρωματίζεται κόκκινη.

Οι πυρήνες των κυττάρων χρωματίζονται πράσινοι.

ΠΙΝΑΚΑΣ 12 : Μέθοδος της Αζο-βαφής (Azo Dye Coupling Method).

ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΖΟ-ΒΑΦΗΣ (Azo Dye Coupling Method)	
Sodium a-naphthyl phosphate	10mg
Ρυθμιστικό διάλυμα Tris 0.1M, PH 10	10ml
Διαζωνικό άλας Fast red TR	10mg
Τελικό PH της αντίδραση	9.2 – 9.4.
Επώαση	Θερμοκρασία δωματίου για 10-60 λεπτά.
Αντίχρωση	Πράσινο του μεθυλενίου 2%
Δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης	Κόκκινος χρωματισμός
Πυρήνες των κυττάρων	Πράσινος χρωματισμός

β. Μέθοδος της ταυτόχρονης σύλληψης, με τη χρήση Ναφθολών (Substituted Naphthols method).

Η εισαγωγή των ναφθολών (ναφθολικών εστέρων) Naphthol AS-BI Phosphate, Naphthol AS-MX Phosphate, Naphthol AS-CL Phosphate και Naphthol AS-TR Phosphate, για την ανίχνευση της αλκαλικής φωσφατάσης μελετήθηκε πρώτα από τον Gomori (1952), αλλά και άλλοι ερευνητές έχουν ασχοληθεί με αυτή τη μέθοδο (Burstone 1958, 1961). Αυτοί οι εστέρες υδρολύονται γρήγορα από την αλκαλική φωσφατάση παράγοντας επαρκή αδιάλυτα ναφθολικά παράγωγα.

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί προκατασκευασμένο διάλυμα (stock solution) από τις προηγούμενες ναφθόλες διαλυμένες σε N N dimethyl formamide, προσθέτοντας απεσταγμένο νερό και ρυθμιστικό διάλυμα με PH 8,3. Το διάλυμα αυτό μπορεί να διατηρηθεί στο ψυγείο για αρκετούς μήνες. Στη συνέχεια προσθέτουμε μόνο διαζωνικό άλας (Fast red TR, Fast blue RR). Το τελικό επωαστικό διάλυμα πρέπει να χρησιμοποιηθεί αμέσως μετά την παρασκευή του. Η επώαση γίνεται συνήθως στους

37 ° C για 30 λεπτά. (Bucher F. et al 1993, Matsubara S.,et al 1999, Piattelli A.,et al 1997, Bancroft J.D et al 1977, Soni N.K.,et al,1981, Sony J.Y.,et al 1996).

Μέθοδος Naphtol AS-BI phosphate

Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια

- * Naphtol AS-BI Phosphate
- * N: N -Dimethyl formamide
- * Sodium carbonate
- * Απεσταγμένο νερό
- * Ρυθμιστικό διάλυμα Tris (0.2M), PH 8.3
- * Διαζωνικό άλας: Fast red TR

Δημιουργία της Naphtol AS-BI stock solution

- * Naphtol AS-BI phosphate.....25mg διαλυμένα σε
- * N:N -Dimethyl formamide.....10ml
- * Απεσταγμένο νερό.....10ml
- * Molar sodium carbonate.....2-6 σταγόνες

Καλή ανάδευση και προσθήκη μοριακού ανθρακικού νατρίου, μέχρι η τιμή του PH φτάσει στο 8.0. Στη συνέχεια προσθέτουμε:

- * Απεσταγμένο νερό.....300ml
- * Ρυθμιστικό διάλυμα Tris (0.2M), PH 8.3180ml

Το παραπάνω διάλυμα φυλάσσεται στο ψυγείο και μένει σταθερό για αρκετούς μήνες.

Επωαστικό διάλυμα

- **Naphtol AS-BI stock solution.....10ml
- ** Διαζωνικό άλας Fast red TR.....10mg

Καλή ανάδευση και φιλτράρισμα πάνω στις τομές

Διαδικασία επώασης

- *** Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5-15 λεπτά
- *** Πλύσιμο σε νερό βρύσης
- *** Αντίχρωση με Πράσινο του Μεθυλενίου 2% (Methyl green, chloroform extracted)
- *** Καλό ξέπλυμα σε νερό βρύσης
- *** Τοποθέτηση γλυκερίνης, κάλυψη, παρατήρηση.

Αποτελέσματα

Η δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης χρωματίζεται κόκκινη.

Οι πυρήνες των κυττάρων χρωματίζονται πράσινοι.

ΠΙΝΑΚΑΣ 13 : Μέθοδος Naphtol AS-BI phosphate

Μέθοδος Naphtol AS-BI phosphate	
<p><u>Naphtol AS-BI stock solution</u> 25mg Naphtol AS-BI phosphate διαλυμένα σε 10ml N:N –Dimethyl formamide 10ml Απεσταγμένο νερό 2-6 σταγόνες μοριακού ανθρακικού νατρίου μέχρι η τιμή του PH φτάσει στο 8.0. 300ml Απεσταγμένο νερό 180ml Ρυθμιστικό διάλυμα Tris (0.2M), PH 8.3</p>	10ml
Διαζωνικό άλας Fast red TR	10mg
Τελικό PH της αντίδρασης	9.0.
Επώαση	Θερμοκρασία δωματίου για 5-15 λεπτά.
Αντίχρωση	Πράσινο του μεθυλενίου 2%
Δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης	Κόκκινος χρωματισμός
Πυρήνες των κυττάρων	Πράσινος χρωματισμός

Στον πίνακα που ακολουθεί αμέσως παρακάτω, γίνεται μια σύγκριση των δύο μεθόδων δηλαδή της μεθόδου της Αζο-βαφής (μέθοδος με τη χρήση α-naphthyl phosphate) με τη μέθοδο Naphtol AS-BI phosphate, σε σχέση με τα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια και την διαδικασία εκτέλεσής των.

ΠΙΝΑΚΑΣ 14 : Μέθοδοι ιστοχημικού προσδιορισμού της Αλκαλικής Φωσφατάσης. Σύγκριση αυτών, σε σχέση με τα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια.

Μέθοδοι ιστοχημικού προσδιορισμού της Αλκαλικής Φωσφατάσης		
Αντιδραστήρια	Μέθοδος με τη χρήση a-naphthyl phosphate	Μέθοδος με τη χρήση του Napthol AS-BI
Sodium a-naphthyl phosphate	10mg	---
Napthol AS-BI stock solution	---	10ml
Ρυθμιστικό διάλυμα Tris 0.1M, PH 10	10ml	---
Ρυθμιστικό διάλυμα Tris 0.2M, PH 8.3	---	(Υπάρχουν 3.75 ml στο Napthol AS-BI stock solution)
Διαζωνικό άλας Fast red TR	10mg	10mg
Τελικό PH της αντίδραση	9.2 – 9.4	9.2
Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου	10-60 λεπτά	5-15 λεπτά
Αντίχρωση	Πράσινο του μεθυλενίου 2%.	Πράσινο του μεθυλενίου 2%.
Δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης	Κόκκινος χρωματισμός	Κόκκινος χρωματισμός
Πυρήνες των κυττάρων	Πράσινος χρωματισμός	Πράσινος χρωματισμός

5.2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΙΣΤΟΧΗΜΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΑΤΡασης.

Πραγματοποιήθηκε ιστοχημικός προσδιορισμός της ΑΤΡάσης σε **200 προθανάτια** και **95 μεταθανάτια τραύματα**. *Αρνητικοί μάρτυρες*: Ιστός από την τραυματική περιοχή που αφαιρέθηκε το υπόστρωμα.

Η αρχική μέθοδος προσδιορισμού της ΑΤΡασης, παρουσιάστηκε από τους Wachstein και Meisel (1956) και στη συνέχεια τροποποιήθηκε από τον Pearse (1970). Στη συνέχεια ο Culling (1974) τροποποίησε την παραπάνω μέθοδο αφαιρώντας το ρυθμιστικό διάλυμα Tris 0.2M, αυξάνοντας την ποσότητα του απεσταγμένου νερού και προσθέτοντας 2,4 δινιτροφαινόλη σαν ενεργοποιητή του ενζύμου. Τα αποτελέσματα βελτιώθηκαν αλλά δημιουργήθηκε πολύ ίζημα. Στη δική μας έρευνα χρησιμοποιήσαμε την αρχική μέθοδο όπως τροποποιήθηκε από τον Pearse προσθέτοντας και 2,4 δινιτροφαινόλη. Έτσι τα αποτελέσματα ήταν καλά και η ποσότητα του ιζήματος ήταν πολύ μικρή (Τσαβαρής Ν., 1977). Η μέθοδος στηρίζεται στην απελευθέρωση φωσφορικών ιόντων από την αντίδραση μεταξύ του υποστρώματος (ΑΤΡ δινατριούχου άλατος) και του ενζύμου (ΑΤΡ). Τα φωσφορικά ιόντα στη συνέχεια αντιδρούν με το νιτρικό μόλυβδο, παράγοντας φωσφορικό μόλυβδο, ο οποίος μετατρέπεται τελικά σε θειικό μόλυβδο που αποκτά σκούρο καφετί χρωματισμό μετά από την επαφή του με το θειώδες αμμώνιο (Bancroft J.D et al 1977, Fouces V., et al 1993, Gartner L., et al 1977, Saito T., et al, 1980, Tribulova N., et al, 1996, Zinchuk V.S., et al, 1999).

α. Μέθοδος Wachstein και Meisel τροποποιημένη από τους Pearse και Culling.

Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια.

- * ΑΤΡ δινατριούχο άλας.
- * Ρυθμιστικό διάλυμα Tris 0.2M, pH7.2.
- * Διάλυμα νιτρικού μολύβδου (PbNO₃) 2%.
- * Διάλυμα θειικού μαγνησίου (MgSO₄) 2%.
- * Απεσταγμένο νερό.
- * 2,4 δινιτροφαινόλη.

Επωαστικό διάλυμα.

- ** ΑΤΡ δινατριούχο άλας.....20mg.
- ** Ρυθμιστικό διάλυμα Tris 0.2M, pH7.2.....4ml.
- ** Διάλυμα νιτρικού μολύβδου (PbNO₃) 2%.....1ml.
- ** Διάλυμα θειικού μαγνησίου (MgSO₄) 2%.....1ml.
- ** Απεσταγμένο νερό.....5ml.
- ** 2,4 δινιτροφαινόλη.....15mg.

Διαδικασία επώασης.

Χρησιμοποιήθηκαν τομές ψυκτικού μικροτόμου.

- *** Η επώαση γινόταν στη θερμοκρασία των 37°C για 60 λεπτά της ώρας.
- *** Ξέπλυμα σε απεσταγμένο νερό.
- *** Βύθιση των αντικειμενοφόρων με τις τομές σε διάλυμα θειώδους αμμωνίου (ammonium sulphide) 1%, για 1 λεπτό.
- *** Ξέπλυμα σε νερό βρύσης.
- *** Τοποθέτηση γλυκερίνης ή aparthy 's medium, κάλυψη, παρατήρηση.
- Αποτελέσματα.
- Η δραστηριότητα της ATP-ασης χρωματίζεται καφετί σκούρο.
- Παρατηρήθηκε ότι το ίζημα μειώθηκε πολύ.

ΠΙΝΑΚΑΣ 15 : Μέθοδος Wachstein και Meisel τροποποιημένη από τους Pearse και Culling.

Μέθοδος Wachstein και Meisel τροποποιημένη από τους Pearse και Culling.	
ATP δινατριούχο άλας	20 mg.
Ρυθμιστικό διάλυμα Tris 0.2M, PH 7.2	4.0 ml
Διάλυμα νιτρικού μολύβδου (PbNO₃) 2%	1.0 ml.
Διάλυμα θειικού μαγνησίου (MgSO₄) 2%	1.0 ml
Απεσταγμένο νερό	5.0 ml
2,4 δινιτροφαινόλη	15 mg.
Επώαση	Στους 37ο C για 60 λεπτά.
Βύθιση σε διάλυμα θειώδους αμμωνίου (ammonium sulphide) 1%.	1 λεπτό
Δραστηριότητα της ATP-ασης	Καφετί χρωματισμός

β. Μέθοδος Wachstein και Meisel τροποποιημένη από τον Pearse.

Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια.

- * ATP δινατριούχο άλας.
- * Ρυθμιστικό διάλυμα Tris 0.2M, pH7.2.
- * Διάλυμα νιτρικού μολύβδου (PbNO₃) 2%.
- * Διάλυμα θειικού μαγνησίου (MgSO₄) 2%.
- * Απεσταγμένο νερό.

Επωαστικό διάλυμα.

- ** ATP δινατριούχο άλας.....5mg.
- ** Ρυθμιστικό διάλυμα Tris 0.2M, pH7.2.....4ml.
- ** Διάλυμα νιτρικού μολύβδου (PbNO₃) 2%.....0.6ml.
- ** Διάλυμα θειικού μαγνησίου (MgSO₄) 2%.....1ml.
- ** Απεσταγμένο νερό.....5.5ml.

Διαδικασία επώασης.

Χρησιμοποιήθηκαν τομές ψυκτικού μικροτόμου.

*** Η επώαση γινόταν στη θερμοκρασία των 37°C για 30 - 60 λεπτά της ώρας.

*** Ξέπλυμα σε απεσταγμένο νερό.

*** Βύθιση των αντικειμενοφόρων με τις τομές σε διάλυμα θειώδους αμμωνίου (ammonium sulphide) 1%, για 2 λεπτά.

*** Ξέπλυμα σε νερό βρύσης.

*** Τοποθέτηση γλυκερίνης ή aparthy 's medium, κάλυψη, παρατήρηση.

Αποτελέσματα.

Η δραστηριότητα της ATPασης χρωματίζεται καφετί σκούρο.

Παρατηρήθηκε δημιουργία μεγάλης ποσότητας ιζήματος.

ΠΙΝΑΚΑΣ 16 : Μέθοδος Wachstein και Meisel τροποποιημένη από τον Pearse.

Μέθοδος Wachstein και Meisel τροποποιημένη από τον Pearse.	
ATP δινατριούχο άλας	5.0 mg.
Ρυθμιστικό διάλυμα Tris 0.2M, PH 7.2	4.0 ml
Διάλυμα νιτρικού μολύβδου (PbNO₃) 2%	0.6 ml.
Διάλυμα θειικού μαγνησίου (MgSO₄) 2%	1.0 ml
Απεσταγμένο νερό	5.5 ml
Επώαση	Στους 37ο C για 10-60 λεπτά.
Βύθιση σε διάλυμα θειώδους αμμωνίου (ammonium sulphide) 1%.	2 λεπτά.
Δραστηριότητα της ATP- ασης	Σκούρος καφετί χρωματισμός

γ. Μέθοδος Wachstein και Meisel τροποποιημένη από τον Culling.

Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια.

- * ATP δινατριούχο άλας.
- * Απεσταγμένο νερό.
- * Διάλυμα νιτρικού μολύβδου (PbNO₃) 2%.
- * Διάλυμα θειικού μαγνησίου (MgSO₄) 0.25%.
- * 2,4 δινιτροφαινόλη.

Επωαστικό διάλυμα.

- ** ATP δινατριούχο άλας.....10mg.
- ** Απεσταγμένο νερό.....7ml.
- ** Διάλυμα νιτρικού μολύβδου (PbNO₃) 2%..... 1.2ml.
- ** Διάλυμα θειικού μαγνησίου (MgSO₄) 0.25%.....2ml.
- ** 2,4 δινιτροφαινόλη.....16mg.

Διαδικασία επώασης.

Χρησιμοποιήθηκαν τομές ψυκτικού μικροτόμου.

*** Η επώαση γινόταν στη θερμοκρασία των 37°C για 120 λεπτά της ώρας.

*** Ξέπλυμα σε απεσταγμένο νερό.

*** Βύθιση των αντικειμενοφόρων με τις τομές σε διάλυμα θειώδους αμμωνίου (ammonium sulphide) 1%, για 1 λεπτό.

*** Ξέπλυμα σε νερό βρύσης.

*** Τοποθέτηση γλυκερίνης ή aparthy 's medium, κάλυψη, παρατήρηση.

Αποτελέσματα.

Η δραστηριότητα της ATPασης χρωματίζεται καφετί σκούρο.

Παρατηρήθηκε δημιουργία μεγάλης ποσότητας ιζήματος.

ΠΙΝΑΚΑΣ 17 : Μέθοδος Wachstein και Meisel τροποποιημένη από τον Culling.

Μέθοδος Wachstein και Meisel τροποποιημένη από τον Culling.	
ΑΤΡ δινατριούχο άλας	10 mg.
Απεσταγμένο νερό	7.0 ml
Διάλυμα νιτρικού μολύβδου (PbNO₃) 2%	1.2 ml.
Διάλυμα θειικού μαγνησίου (MgSO₄) 2%	2.0 ml
2,4 δινιτροφαινόλη	16 mg.
Επώαση	Στους 37ο C για 120 λεπτά.
Βύθιση σε διάλυμα θειώδους αμμωνίου (ammonium sulphide) 1%.	1 λεπτό
Δραστηριότητα της ΑΤΡ-ασης	Σκούρος καφετί χρωματισμός

Στον πίνακα που ακολουθεί αμέσως παρακάτω, γίνεται μια σύγκριση των μεθόδων ιστοχημικού προσδιορισμού της ΑΤΡασης που χρησιμοποιήσαμε, σε σχέση με τα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια και την διαδικασία εκτέλεσής των.

ΠΙΝΑΚΑΣ 18 : Μέθοδοι ιστοχημικού προσδιορισμού της ΑΤΡασης. Σύγκριση αυτών, σε σχέση με τα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια.

Μέθοδος Wachstein και Meisel τροποποιημένη από τους :			
Αντιδραστήρια	Pearse	Culling	Pearse – Culling
ΑΤΡ δινατριούχο άλας	5.0 mg	10 mg	20 mg
Ρυθμιστικό διάλυμα Tris 0.2M, PH 7.2	4.0 ml	---	4.0 ml
Διάλυμα νιτρικού μολύβδου (PbNO₃) 2%	0.6 ml	1.2 ml	1.0 ml
Διάλυμα θειικού μαγνησίου (MgSO₄) 2%	1.0 ml	2.0 ml	1.0 ml
Απεσταγμένο νερό	5.5 ml	7.0 ml	5.0 ml
2,4 δινιτροφαινόλη	---	16 mg	15 ml
Επώαση στους 37° C	30-60 λεπτά	120 λεπτά	60 λεπτά
Βύθιση σε διάλυμα θειώδους αμμωνίου (ammonium sulphide) 1%.	2 λεπτά	1 λεπτό	1 λεπτό
Δραστηριότητα της ΑΤΡ-ασης	Σκούρο καφετί	Σκούρο καφετί	Καφετί
Δημιουργία ιζήματος	Μεγάλη	Μεγάλη	Μικρή

5.2.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΙΣΤΟΧΗΜΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ "ΜΗ ΕΙΔΙΚΩΝ ΕΣΤΕΡΑΣΩΝ".

Πραγματοποιήθηκε ιστοχημικός προσδιορισμός των μη ειδικών εστερασών σε 250 προθανάτια και 95 μεταθανάτια τραύματα. *Αρνητικοί μάρτυρες:* Ιστός από την τραυματική περιοχή που αφαιρέθηκε το υπόστρωμα.

1. Μέθοδος a-naphthyl acetate. (Nachlas και Seligman τροποποιημένη από τον Pearse).

Η μέθοδος αυτή που εντάσσεται στις ιστοχημικές μεθόδους της "ταυτόχρονης σύλληψης" παρουσιάστηκε για πρώτη φορά από τους Nachlas και Seligman (1949) και τροποποιήθηκε από τους Gomori (1950) και Davis και συν. (1959). Χρησιμοποιεί σαν υπόστρωμα a-naphthyl acetate. Το αποτέλεσμα της δράσης των "μη ειδικών εστερασών" στο υπόστρωμα είναι η απελευθέρωση του a-naphthol κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης. Στη συνέχεια πραγματοποιείται η σύζευξή του με ένα διαζωνικό άλας και κατά συνέπεια η δημιουργία μιας αδιάλυτης έγχρωμης ένωσης (αζοβαφής) στα σημεία της ενζυμικής δραστηριότητας. Η τροποποίηση της αρχικής μεθόδου από τον Gomori, αφορά την χρησιμοποίηση του διαζωνικού άλατος fast blue B. Οι Davies και Seligman αντικατέστησαν το διαζωνικό άλας fast blue B με την pararosanilin HCl θεωρώντας ότι δίδει καλύτερα αποτελέσματα (Dachum W., et al, 1992, Press C.M., et al 1994, Bancroft J.D et al 1977, Perper A.J., 1980).

Μέθοδος a-naphthyl acetate. (Nachlas και Seligman τροποποιημένη από τον Pearse).

Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια.

- * a-naphthyl acetate
- * Ακετόνη
- * Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M , pH 7.4.
- * Διαζωνικό άλας Fast blue B.

Παρασκευή του φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος:

Διάλυμα A: 7.098 g Na₂HPO₄ διαλυμένα σε 500ml απεσταγμένου νερού.

Διάλυμα B: 6.900g NaH₂PO₄ διαλυμένα σε 500ml απεσταγμένου νερού.

Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M, pH 7.4 : 500ml διαλύματος A και 90ml διαλύματος B.

Επώαστικό διάλυμα.

- ** a-naphthyl acetate..... 10mg
- ** Ακετόνη.....0.25ml
- ** Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα..... 10ml

Πολύ καλή ανάδευση.

- ** Διαζωνικό άλας fast blue B 50mg

Καλή ανάδευση και φιλτράρισμα πάνω στις τομές.

Διαδικασία επώασης.

Οι τομές μετά την κοπή τους από τον ψυκτικό κρουτόμο, παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου για 3-5 λεπτά για να στεγνώσουν.

*** Η επώαση γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου και διαρκεί 5 λεπτά.

*** Πλύσιμο σε απεσταγμένο νερό για 5 λεπτά.

*** Τοποθέτηση γλυκερίνης, κάλυψη, παρατήρηση.

Αποτελέσματα.

Η δραστηριότητα των "μη ειδικών εστερασών" χρωματίζεται κόκκινο-καφετί

ΠΙΝΑΚΑΣ 19 : Μέθοδος a-naphthyl acetate. (Nachlas και Seligman τροποποιημένη από τον Pearse).

Μέθοδος a-naphthyl acetate. (Nachlas και Seligman τροποποιημένη από τον Pearse).	
a-naphthyl acetate	10 mg.
Ακετόνη	0.25 ml
Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M, pH 7.4 <u>Παρασκευή του φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος:</u> Διάλυμα A: 7.098 g Na ₂ HPO ₄ διαλυμένα σε 500ml απεσταγμένου νερού. Διάλυμα B: 6.900g NaH ₂ PO ₄ διαλυμένα σε 500ml απεσταγμένου νερού. Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M, pH 7.4: 500ml διαλύματος A και 90ml διαλύματος B.	10 ml.
Διαζωνικό άλας fast blue B	50 mg
Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου	3-5 λεπτά.
Δραστηριότητα των μη ειδικών εστερασών	Κόκκινος - κεφετί χρωματισμός

2. Μέθοδος ναφθόλης AS-LS azo coupling (Burstones).

Είναι μέθοδος "ταυτόχρονης σύλληψης", και ισχύει ότι αναφέρθηκε στη μέθοδο 2.3.1. Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι όλες οι ναφθόλες AS υδρολύονται με αργό ρυθμό, πράγμα που δεν συμβαίνει με το a-naphthyl acetate. Επομένως θέσεις με μικρή ενζυμική δραστηριότητα μπορεί να μην εμφανίσουν θετικό αποτέλεσμα. (Vacca L., 1985).

Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια.

* Naphthol AS-LS acetate.

* Ακετόνη.

- * Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M, pH7.2.
- * Διαζωνικό άλας fast blue RR ή fast garnet GBC.

Επώαστικό διάλυμα.

- ** Naphthol AS-LS acetate.....3mg
- ** Ακετόνη.....0.3ml
- ** Προσθήκη απεσταγμένου νερού.....15ml
- ** Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M, pH7.2.....15ml
- ** Διαζωνικό άλας fast blue RR ή fast garnet GBC.....15mg

Καλή ανάδευση και φιλτράρισμα πάνω στις αντικειμενοφόρες πλάκες που έχουν τις τομές.

Διαδικασία επώασης.

*** Οι τομές του ψυκτικού μικροτόμου επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου, για 10-30 λεπτά.

*** Καλό πλύσιμο με νερό της βρύσης.

*** Τοποθέτηση γλυκερίνης, κάλυψη, παρατήρηση.

Αποτελέσματα.

Η ενζυμική δραστηριότητα των "μη ειδικών εστερασών" χρωματίζεται κόκκινη (αν χρησιμοποιηθεί το fast blue RR) ή μπλε (αν χρησιμοποιηθεί το fast garnet GCB).

ΠΙΝΑΚΑΣ 20 : Μέθοδος ναφθόλης AS-LS azo coupling (Burstones).

Μέθοδος ναφθόλης AS-LS azo coupling (Burstones).	
Naphthol AS-LS acetate	3 mg.
Ακετόνη	0.30 ml
Απεσταγμένο νερό	15 ml
Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M, pH 7.2.	15 ml.
Διαζωνικό άλας fast blue RR ή fast garnet GBC	15 mg
Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου	10 – 30 λεπτά.
Δραστηριότητα των μη ειδικών εστερασών	Κόκκινος χρωματισμός (fast blue RR) Μπλε χρωματισμός (fast garnet GBC)

3. Μέθοδος ναφθόλης ASD (Pearse).

Είναι μέθοδος "ταυτόχρονης σύλληψης", και ισχύει ότι αναφέρθηκε στη μέθοδο 5.2.3.1 και 5.2.3.2.

Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια.

- * Ναφθόλη ASD.
- * N N Dimethylformamide (DMF).
- * Ρυθμιστικό διάλυμα Tris, 0.2M, pH 6.7.
- * Διαζωνικό άλας fast blue RR.

Επώαστικό διάλυμα.

Διάλυμα του υποστρώματος (A).

- ** Ναφθόλη ASD.....10 mg,
- ** N N Dimethylformamide (DMF).....1.0 ml.
- ** Ρυθμιστικό διάλυμα Tris, 0.2M, pH 6.7.....5.0 ml.

Διάλυμα του διαζωνικού άλατος (B).

- ** Διαζωνικό άλας fast blue RR.....15 mg.
- ** Απεσταγμένο νερό.....5.0 ml.

Η ναφθόλη ASD διαλύεται στην N N Dimethylformamide (DMF), και το διαζωνικό άλας fast blue RR στο απεσταγμένο νερό. Ιδανική τιμή για το pH της αντίδρασης θεωρείται αυτή του 6.7, γιατί σε αλκαλικό pH η ναφθόλη ASD διασπάται. Γίνεται ανάμειξη των διαλυμάτων (A) και (B) και φιλτράρισμα του προκύπτοντος διαλύματος κατευθείαν πάνω στις αντικειμενοφόρες πλάκες με τις τομές των ιστών.

Διαδικασία επώασης.

Οι τομές των ιστοτεμαχίων γίνονται σε ψυκτικό μικροτόμο, χωρίς προηγούμενη μονιμοποίησή τους.

- *** Η επώαση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου, για 120 λεπτά.
- *** Πλύσιμο με νερό της βρύσης.
- *** Αντίχρωση με nuclear fast red για 10 λεπτά.
- *** Τοποθέτηση γλυκερίνης, κάλυψη, παρατήρηση.

Αποτελέσματα

Εναπόθεση κοκκίων κυανού χρώματος στα σημεία της ενζυμικής δραστηριότητας των "μη ειδικών εστερασών".

ΠΙΝΑΚΑΣ 21 : Μέθοδος ναφθόλης ASD (Pearse).

Μέθοδος ναφθόλης ASD (Pearse).	
Ναφθόλη ASD	10 mg.
N N Dimethylformamide (DMF)	1.0 ml
Ρυθμιστικό διάλυμα Tris, 0.2M, pH 6.7	5.0 ml
Διαζωνικό άλας fast blue RR	15 mg
Απεσταγμένο νερό	5.0 ml
Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου	120 λεπτά.
Αντίχρωση με nuclear fast red	10 λεπτά
Δραστηριότητα των μη ειδικών εστερασών	Μπλε χρωματισμός

Στον πίνακα που ακολουθεί αμέσως παρακάτω, γίνεται μια σύγκριση των μεθόδων ιστοχημικού προσδιορισμού των μη ειδικών εστερασών που χρησιμοποιήσαμε, σε σχέση με τα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια και την διαδικασία εκτέλεσής των.

ΠΙΝΑΚΑΣ 22 : Μέθοδοι ιστοχημικού προσδιορισμού των μη ειδικών εστερασών. Σύγκριση αυτών, σε σχέση με τα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια.

Μέθοδοι ιστοχημικού προσδιορισμού των μη ειδικών εστερασών			
Αντιδραστήρια	a-naphthyl acetate	Ναφθόλης AS-LS	Ναφθόλης ASD
a-naphthyl acetate	10 mg	---	---
Naphthol AS-LS acetate	---	3.0 mg	---
Ναφθόλη ASD	---	---	10 mg
Ακετόνη	0.25 ml	0.30 ml	---
N N Dimethylformamide (DMF).	---	---	1.0 ml
Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M , pH 7.4.	10 ml	---	---
Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M, pH7.2	---	15 ml	---
Ρυθμιστικό διάλυμα Tris, 0.2M, pH 6.7	---	---	5.0 ml
Απεσταγμένο νερό	----	15 ml	5.0 ml
Διαζωνικό άλας Fast blue B	50 mg	---	---
Διαζωνικό άλας fast blue RR	---	15 mg	15 mg
Διαζωνικό άλας fast garnet GBC	---	(15 mg)	---
Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου	3 - 5 λεπτά	10 - 30 λεπτά	120 λεπτά
Αντίχρωση με nuclear fast red	---	---	10 λεπτά
Δραστηριότητα των μη ειδικών εστερασών	Κόκκινο - καφετί	Κόκκινο ή Μπλε	Μπλε

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1 ΠΡΟΘΑΝΑΤΙΑ ΤΡΑΥΜΑΤΑ

Εξετάστηκαν ιστοχημικά **410 δείγματα** (ιστοτεμάχια) από προθανάτια δερματικά τραύματα. Τα δείγματα αυτά, όπως αναφέρθηκε αναλυτικά στο κεφάλαιο “Υλικά και Μεθοδολογία”, χωρίστηκαν σε δύο ομάδες. **Η 1^η ομάδα** περιλάμβανε **360 δείγματα** προθανάτιων τραυμάτων, των οποίων η λήψη από την τραυματική περιοχή γινόταν αμέσως μετά τον θάνατο (ευθανασία) των πειραματόζωνων, ενώ **η 2^η ομάδα** περιλάμβανε τα υπόλοιπα **50 δείγματα** προθανάτιων τραυμάτων, των οποίων η λήψη από την τραυματική περιοχή γινόταν 6 ώρες έως 72 ώρες, μετά από το θάνατο των ζώων.

6.1.1 ΠΡΟΘΑΝΑΤΙΑ ΤΡΑΥΜΑΤΑ ΤΗΣ 1^{ΗΣ} ΟΜΑΔΑΣ. (360 δείγματα)

1. Ενζυμική δραστηριότητα της Αλκαλικής Φωσφατάσης στην τραυματική περιοχή. (ΕΙΚ. 39, 40, 41, 42, 43, 44.)

Στο φυσιολογικό (μη τραυματισμένο) δέρμα με τις μεθόδους ανίχνευσης της ενζυμικής δραστηριότητας που χρησιμοποιήθηκαν, η επιδερμίδα χρωματίζεται ελάχιστα, σε αντίθεση με τα εξαρτήματα του δέρματος, τα τοιχώματα των αγγείων και τους ινοβλάστες που χρωματίζονται.

Στο τραυματισμένο δέρμα παρατηρήθηκε αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης περίπου 3.5 ώρες μετά το τραυματισμό, ενώ η μέγιστη ένταση της εμφανίστηκε στις 32 ώρες. Ποσοστό 2.0 % του συνόλου των εξετασθέντων δειγμάτων δεν έδωσε θετική αντίδραση. Αναλυτικά, η ενζυμική δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης στην τραυματική περιοχή της 1^{ης} ομάδας των προθανάτιων δερματικών τραυμάτων, αναφέρεται στον παρακάτω πίνακα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 23 : Ενζυμική δραστηριότητα της Αλκαλικής Φωσφατάσης στην τραυματική περιοχή, προθανάτιων δερματικών τραυμάτων.

ΧΡΟΝΙΚΟ ΔΙΑΣΤΗΜΑ ΑΠΟ ΤΟΝ ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΟ ΣΕ ΩΡΕΣ	Μέθοδος Naphtol AS-Bi phosphate	Μέθοδος a-naphtyl phosphate
0.5 έως 3.0	0	0
3.5	0	1+
4	0	2+
6	0 ή 1+	2+
12	1+	3+
20	1+	3+
24	1+ ή 2+	4+
32	2+	5+
48	1+	4+
72	1+	3+
120	0	2+
144	0	1+

2. Ενζυμική δραστηριότητα της ATPάσης στην τραυματική περιοχή. (ΕΙΚ. 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38.)

Στο φυσιολογικό (μη τραυματισμένο) δέρμα, με τις μεθόδους ανίχνευσης της ενζυμικής δραστηριότητας που χρησιμοποιήθηκαν, δεν χρωματίζεται η κερατίνη στοιβάδα. Η ακανθωτή στοιβάδα παρουσιάζει ασθενή χρωματισμό. Μέσου βαθμού χρωματισμό παρουσιάζουν η κοκκώδης και η βασική στοιβάδα. Τα εξαρτήματα του δέρματος, οι ανεκκτήρες μύες των τριχών, οι ινωβλάστες και τα τοιχώματα των αγγείων του δέρματος, παρουσιάζουν έντονο χρωματισμό.

Αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας της ATPάσης παρατηρήθηκε περίπου 2.0 ώρες μετά το τραυματισμό ενώ η μέγιστη τιμή της εμφανίστηκε στις 20 ώρες. Ποσοστό 1.5 % του συνόλου των εξετασθέντων δειγμάτων δεν έδωσε θετική αντίδραση. . Αναλυτικά, η ενζυμική δραστηριότητα της ATPάσης στην τραυματική περιοχή της 1^{ης} ομάδας των προθανάτιων δερματικών τραυμάτων, αναφέρεται στον παρακάτω πίνακα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 24 : Ενζυμική δραστηριότητα της ΑΤΡασης, στην τραυματική περιοχή, προθανάτιων δερματικών τραυμάτων.

ΧΡΟΝΙΚΟ ΔΙΑΣΤΗΜΑ ΑΠΟ ΤΟΝ ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΟ ΣΕ ΩΡΕΣ	Μέθοδος Wachstein - Meisel (τροποποιημένη από τους Pearse και Culling)	Μέθοδος Wachstein και Meisel (τροποποιημένη από τον Pearse)	Μέθοδος Wachstein και Meisel (τροποποιημένη από τον Culling)
0.5	0	0	0
1	0	0	0
1.5	0	0	0
2	1+	0	0
2.5	1+	1+, (Ιζημα)	0
3	2+	1+, “	0
3.5	2+	1+, “	0
4	2+	1+, “	1+ (Ιζημα)
6	3+	1+, “	1+, “
12	4+	2+, “	1+, “
20	5+	3+, “	2+, “
24	4+	3+, “	1+, “
32	4+	2+, “	1+, “
48	3+	1+, “	1+, “
72	2+	1+, “	0, “
120	1+	0, “	0, “
144	1+	0, “	0, “

3. Ενζυμική δραστηριότητα των μη ειδικών εστερασών, στην τραυματική περιοχή. (ΕΙΚ. 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28.)

Στο φυσιολογικό (μη τραυματισμένο) δέρμα, με τις μεθόδους ανίχνευσης της ενζυμικής δραστηριότητας που χρησιμοποιήθηκαν, εμφανίζεται χρωματισμός μεταξύ της κοκκώδους και κερατίνης στοιβάδας. Επίσης εξαρτήματα του δέρματος όπως οι

ρίζες, οι θύλακοι και οι κολεοί (έσω και έξω) των τριχών και οι ινοβλάστες του δέρματος χρωματίζονται έντονα.

Στο τραυματισμένο δέρμα παρατηρήθηκε αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας των μη ειδικών εστερασών, περίπου 1.0 ώρα μετά το τραυματισμό ενώ η μέγιστη ένταση της εμφανίστηκε στις 24 ώρες. Ποσοστό 1.2 % του συνόλου των εξετασθέντων δειγμάτων δεν έδωσε θετική αντίδραση. . Αναλυτικά, η ενζυμική δραστηριότητα των μη ειδικών εστερασών στην τραυματική περιοχή της 1^{ης} ομάδας των προθανάτιων δερματικών τραυμάτων, αναφέρεται στον παρακάτω πίνακα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 25 : Ενζυμική δραστηριότητα των μη ειδικών εστερασών, στην τραυματική περιοχή, προθανάτιων δερματικών τραυμάτων.

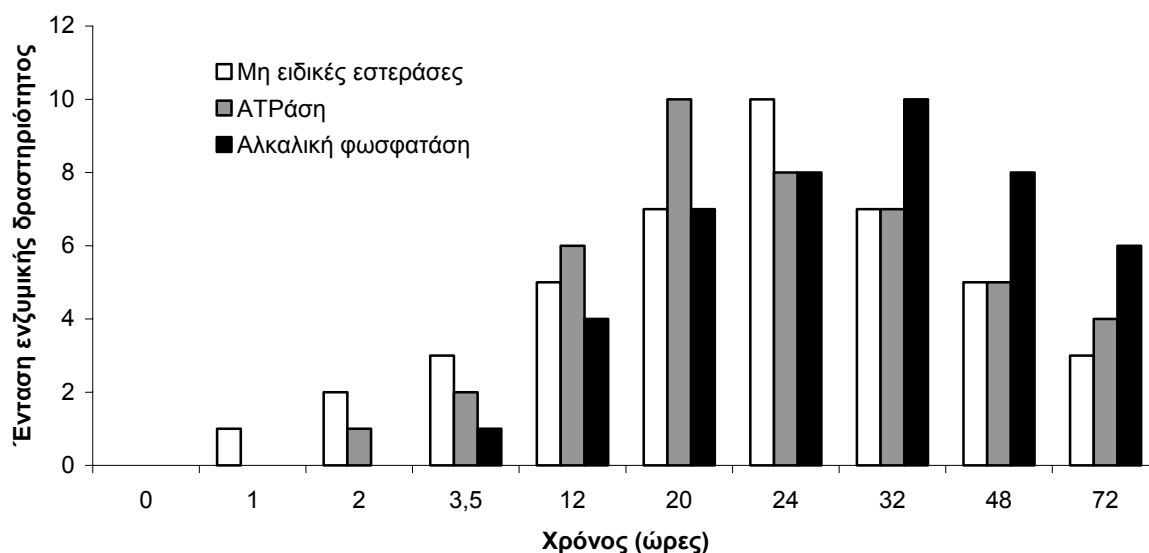
ΧΡΟΝΙΚΟ ΔΙΑΣΤΗΜΑ ΑΠΟ ΤΟΝ ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΟ ΣΕ ΩΡΕΣ	Μέθοδος a-naphthyl acetate (Nachlas και Seligman Τροπ. από Pearse)	Μέθοδος ναφθόλης AS-LS (Burstones)	Μέθοδος ναφθόλης ASD (Pearse)
0.5	0	0	0
1	1+	0	0
1.5	1+	0	0
2	2+	0	0
2.5	2+	0	0
3	2+	0	0
3.5	2+	1+	0
4	3+	1+	1+
6	3+	1+	1+
12	4+	2+	1+
20	4+	2+	2+
24	5+	3+	2+
32	4+	2+	1+
48	3+	1+	1+
72	2+	1+	0
120	1+	0	0
144	1+	0	0

6.1.2 ΠΡΟΘΑΝΑΤΙΑ ΤΡΑΥΜΑΤΑ ΤΗΣ 2^{ΗΣ} ΟΜΑΔΑΣ (50 δείγματα).

Στα 50 από τα 410 δείγματα προθανάτιων τραυμάτων στα οποία οι ιστοχημικές εξετάσεις γινόταν 6 ως 72 ώρες μετά το θάνατο των πειραματόζων, παρατηρήθηκαν στην τραυματική περιοχή, μεταβολές στην ενζυμική δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης, των μη ειδικών εστερασών και της ATPάσης παρόμοια με αυτή των 360 προθανάτιων τραυμάτων.

ΠΙΝΑΚΑΣ 26 : Χρόνος εμφάνισης, χρόνος μέγιστης ενζυμικής δραστηριότητας και ποσοστό % αρνητικών ενζυματικών αντιδράσεων, σε 410 προθανάτια δερματικά τραύματα, της 1^{ης} και 2^{ης} ομάδας .

Ένζυμο	Αριθμός εξετασθέντων τραυμάτων	Χρόνος εμφάνισης	Χρόνος μέγιστης ενζυμικής δραστηριότητας	% αρνητικών ενζυμικών αντιδράσεων
Αλκαλική φωσφατάση	300 (73%)	3.5 ± 0.1 h	32 ± 0.2 h	2.0 (6 δείγματα)
ATPάση	200 (49%)	2.0 ± 0.1 h	20 ± 0.2 h	1.5 (3 “)
Μη ειδικές εστεράσες	250 (61%)	1.0 ± 0.1 h	24 ± 0.2 h	1.2 (3 “)



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 3: Χρόνος εμφάνισης και χρόνος μέγιστης ενζυμικής δραστηριότητας σε 410 προθανάτια δερματικά τραύματα, της 1^{ης} και 2^{ης} ομάδας .

6.2 ΜΕΤΑΘΑΝΑΤΙΑ ΤΡΑΥΜΑΤΑ (95 δείγματα). (ΕΙΚ. 30, 45.)

Εξετάστηκαν ιστοχημικά **95 δείγματα** (ιστοτεμάχια) από μεταθανάτια δερματικά τραύματα. Χρησιμοποιήθηκαν το ίδιο αντιδραστήρια και οι ίδιες μέθοδοι για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης, της ΑΤΡασης και των μη ειδικών εστερασών, με τις αντίστοιχες των προθανάτιων τραυμάτων.

Στον παρακάτω πίνακα εμφανίζεται ο αριθμός των δειγμάτων από μεταθανάτια δερματικά τραύματα, τα οποία εξετάστηκαν ιστοχημικά, για την διερεύνηση της ενζυμικής δραστηριότητας στην τραυματικής περιοχής. Τα τραύματα αυτά χωρίστηκαν σε ομάδες, ανάλογα με τον χρόνο δημιουργίας των, πάντοτε μετά τον θάνατο. **Η λήψη των ιστοτεμαχίων κάθε ομάδας, γινόταν 1, 2, 3, 3.5, 12, 20, 24 και 32 ώρες μετά τον τραυματισμό.**

Σε κανένα από τα δείγματα των μεταθανάτιων τραυμάτων που εξετάστηκαν, δεν παρατηρήθηκε ενζυμική δραστηριότητα στην τραυματική περιοχή.

ΠΙΝΑΚΑΣ 27 : Αριθμός των δειγμάτων από μεταθανάτια δερματικά τραύματα, τα οποία εξετάστηκαν ιστοχημικά, για την διερεύνηση της ενζυμικής δραστηριότητας στην τραυματικής περιοχής.

ΕΝΖΥΜΑ	Ομάδες μεταθανάτιων τραυμάτων, ανάλογα με τον χρόνο του μεταθανάτιου τραυματισμού											
	0.5 ώρες Μετά Θάνατον		1 ώρα Μ. Θ.		2 ώρες Μ. Θ.		3 ώρες Μ. Θ.		4 ώρες Μ. Θ.		Σύνολο ανά ομάδα	
	Αριθμός Δειγμάτων	Ενζυμική Δραστηρ	Αρ. Δ	Ενζ. Δ	Αρ Δ	Ενζ. Δ	Αρ. Δ	Ενζ. Δ	Αρ. Δ	Ενζ. Δ	Αρ Δ	Ενζ Δ
ΑΛΚΑΛΙΚΗ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗ	10	0	10	0	5	0	5	0	5	0	35	0
ΑΤΡαση	10	0	5	0	5	0	5	0	5	0	30	0
ΜΗ ΕΙΔΙΚΕΣ ΕΣΤΕΡΑΣΕΣ	10	0	5	0	5	0	5	0	5	0	30	0
ΣΥΝΟΛΟ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΝΑ ΕΝΖΥΜΟ	30	0	20	0	15	0	15	0	15	0	95	0

7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

7.1 ΠΕΡΙ ΤΡΑΥΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΦΛΕΓΜΟΝΩΝ.

Οι φλεγμονές και ιδιαίτερα οι φλεγμονώδεις διεργασίες τραυματικού τύπου , έχουν μελετηθεί σχολαστικά στον άνθρωπο, πράγμα που δεν ισχύει απόλυτα στα ζώα. Όμως, στις περισσότερες μελέτες που έγιναν στα κατοικίδια ζώα ή στα πειραματόζωα, δεν λήφθηκε σοβαρά υπόψη, η "φλεγμονική ιδιομορφία" που συνδέεται με το είδος του ζώου (Τσιρογιάννης Ε., και συν., 1982).

Νεώτερες έρευνες απέδειξαν ότι οι φλεγμονώδεις διεργασίες διαφοροποιούνται σε μικρό ή μεγάλο βαθμό ,τόσο μεταξύ των ζωικών ειδών, όσον και μεταξύ ενός ζωικού είδους και του ανθρώπου. Σαν παράδειγμα φλεγμονικής ιδιομορφίας μεταξύ των ζωικών ειδών, μπορεί να αναφερθεί η περιτονίτιδα των βοοειδών, στην οποία παρατηρούνται πολλές ινιδώδεις εναποθέσεις και συγκολλήσεις, ενώ στον σκύλο και στο άλογο, σε όμοιες περιπτώσεις περιτονίτιδας, παρατηρείται μια ορώδης μέχρι οροπυώδης φλεγμονή του περιτοναίου. Αυτό δείχνει ότι το άλογο και ο σκύλος αντιδρούν περισσότερο με ορώδης φλεγμονές και λιγότερο με εξίδρωση του ινώδους, πιθανώς λόγω της ενζυμικού τύπου λύσης του ινώδους (ινωδολυσης). Ανάλογες είναι και οι ποσοτικές διαφοροποιήσεις στο σχηματισμό ινών. Έχει αποδειχτεί ότι η τάση σχηματισμού ινών είναι στους ποντικούς μικρή ενώ στον σκύλο εντονότερη. Τέλος, υπάρχουν διαφορές σχετικές με την χρονική παρουσία των κυτταρικών στοιχείων της φλεγμονής. (Τσιρογιάννης Ε., και συν., 1982).

Οι φλεγμονικές ιδιομορφίες που συνδέονται με το είδος του ζωικού οργανισμού, δεν έχουν μόνο θεωρητικό ενδιαφέρον, αλλά διαδραματίζουν σοβαρό ρόλο στον προσδιορισμό της ηλικίας των φλεγμονωδών εξεργασιών. Η ηλικία με τη σειρά της, είναι ένας από τους σοβαρούς παράγοντες, που συνεκτιμούνται τόσο για να καθοριστεί η πρόγνωση, η εξέλιξη και η θεραπεία μιας φλεγμονής, όσον και για γνωματεύσεις κτηνιατροδικαστικής φύσης.

7.2 ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗΝ ΤΡΑΥΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ, ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ ΤΩΝ ΤΡΑΥΜΑΤΩΝ.

Οι ιστοχημικές μέθοδοι και τεχνικές, χρησιμοποιούνται στον εντοπισμό και στην διερεύνηση της λειτουργίας κυτταρικών και εξωκυτταρικών στοιχείων, μεμονωμένων κυττάρων και οργανικών συμπλεγμάτων. Η εξέλιξη των μεθόδων της ενζυμικής ιστοχημείας, συνέβαλε καθοριστικά στην μελέτη της κατανομής των ενζύμων μέσα στα κύτταρα, καθώς και την συσχέτιση τους με τις κυτταρικές λειτουργίες (Komminoth P.,1999). Όπως είναι σήμερα γνωστό, τα ένζυμα επιδρούν

καθοριστικά τόσο στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού μεταβολισμού όσο και στις διάφορες λειτουργίες των κυττάρων. Επιπλέον, ανάλογα με τους σκοπούς που εξυπηρετούν, είναι τοποθετημένα σε συγκεκριμένους ενδοκυτταρικούς σχηματισμούς. Οι Raekallio (1961, 1964), Mustakallio (1961), Montagna (1962), και Pullar (1965), για πρώτη φορά μελέτησαν συστηματικά την κατανομή των ενζύμων στον δέρμα του ανθρώπου, χρησιμοποιώντας μεθόδους και τεχνικές της ενζυμικής ιστοχημείας. Οι ίδιες μέθοδοι, χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για τις πρώτες μελέτες του προσδιορισμού της ηλικίας των τραυματικών κακώσεων που έγιναν ως γνωστόν στο δέρμα (Raekallio J., 1984, Raekallio J., 1980, Perper A.J, et al 1980, Raekallio J.,1972).

Στις τραυματικές κακώσεις του δέρματος, μπορούν μικροσκοπικά να διακριθούν 2 ζώνες. Η κεντρική ζώνη όπου παρατηρείται μείωση της ζωτικότητας των κυττάρων του συνδετικού ιστού (αρνητική ζωική αντίδραση) σαν συνέπεια της μηχανικής βλάβης του τραύματος, της μείωσης της παροχής του αίματος εξαιτίας της αγγειακής καταστροφής και της φλεγμονής. Τα κύτταρα στη περιοχή αυτή παρουσιάζουν μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας 1-4 ώρες μετά τον τραυματισμό. Το φαινόμενο αυτό θεωρείται ένα από τα πρωιμότερα σημεία της επικείμενης νέκρωσης της κεντρική ζώνη του τραύματος.

Στη περιφερική ζώνη του τραύματος παρατηρείται σημαντική αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας (θετική ζωική αντίδραση). Η αύξηση αυτή αφορά τόσο τη δραστηριότητα των ενζύμων που ήδη υπάρχουν όσο και την ποσότητα τους, πράγμα που έχει αποδειχθεί στις αμινοπεπτιδάσες και στις φωσφατάσες με ποσοτική μέτρηση. Η αύξηση της ποσότητας των ενζύμων στη περιφερική ζώνη της τραυματικής περιοχής προέρχεται από τα κύτταρα της περιοχής αυτής, από το πλάσμα που εξαγγειώνεται, καθώς και από τα λευκοκύτταρα που εισβάλλουν στην περιοχή. Συνολικά η αύξηση της δραστηριότητας και της ποσότητας των ενζύμων εντάσσεται στην αμυντική διαδικασία που προβάλλει ο οργανισμός σε περίπτωση τραυματισμού .(Gallo R., 1997, Betz P.,1994, Perper A.J, et al 1980, Raekallio J.,1972, Berg S., 1972).

Στον πίνακα που αμέσως ακολουθεί, αναφέρεται ο χρόνος έναρξης της μείωσης της ενζυμικής δραστηριότητας, στην κεντρική ζώνη του τραύματος.

ΠΙΝΑΚΑΣ 28: Χρόνος έναρξης της μείωσης της ενζυμικής δραστηριότητας, στην κεντρική ζώνη προθανάτιου δερματικού τραύματος του ανθρώπου.

ΕΝΖΥΜΟ	ΕΝΑΡΞΗ ΜΕΙΩΣΗΣ (από ... έως)
Αλκαλική Φωσφατάση	3 ^η – 8 ^η ώρα
Μη ειδικές Εστεράσες	1 ^η - 3 ^η ώρα
ΑΤΡαση	1 ^η – 2 ^η ώρα

Οι ενζυμικές ιστοχημικές μέθοδοι μπορούν να συνεισφέρουν πολλά στον προσδιορισμό της ηλικίας των δερματικών τραυμάτων των ζώων. Εφαρμόζονται σε δερματικά τραύματα οποιασδήποτε αιτιολογίας τραυματισμού. Οι μέθοδοι αυτές είναι απλές στην εφαρμογή τους, δεν απαιτούν εξειδικευμένα αντιδραστήρια (όπως οι ανοσοιστοχημικές μέθοδοι) και δίδουν αξιόπιστα αποτελέσματα περίπου μία ώρα μετά την δημιουργία του τραύματος. Επίσης παραμένουν αξιόπιστες (σε περιπτώσεις προθανάτιων τραυματισμών) ακόμα και όταν εφαρμόζονται 3-5 ημέρες μετά θάνατο, δηλαδή σε περίοδο αρχόμενης σήψης.

7.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ ΤΩΝ ΤΡΑΥΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΚΩΣΕΩΝ (ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΑΣ).

7.3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ 1^{ΗΣ} ΟΜΑΔΑΣ

Στη δική μας μελέτη η αύξηση της ενζυμική δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης στην τραυματική περιοχή εμφανίζεται 3.5 ώρες ενώ των μη ειδικών εστερασών και της ΑΡΤάσης 1.0 ώρα και 2.0 ώρες αντίστοιχα μετά τον τραυματισμό. Η μέγιστη ένταση της ενζυμικής δραστηριότητας για την αλκαλική φωσφατάση, τις μη ειδικές εστεράσες και της ΑΤΡάση παρατηρείται στις 32, 24 και 20 ώρες μετά των τραυματισμό.

ΠΙΝΑΚΑΣ 29 : Χρόνος εμφάνισης και χρόνος μέγιστης τιμής της ενζυμικής δραστηριότητας μετά τον τραυματισμό, στην περιφερική ζώνη προθανάτιων δερματικών τραυμάτων στα πειραματόζωα (κουνέλια).

ΕΝΖΥΜΟ	ΧΡΟΝΟΣ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ	ΧΡΟΝΟΣ ΜΕΓΙΣΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ
Αλκαλική Φωσφατάση	3.5 +/- 0.1 ώρες	32 +/- 0.2 ώρες
Εστεράσες	1 +/- 0.1 ώρες	24 +/- 0.2 ώρες
ΑΤΡαση	2 +/- 0.1 ώρες	20 +/- 0.2 ώρες

Ο χρόνος εμφάνισης της ενζυμικής δραστηριότητας σε ανθρώπινα δερματικά τραύματα σύμφωνα με τον Betz, προσδιορίζεται για τις μη ειδικές εστεράσες περίπου στη 1 ώρα, για την ΑΤΡάση περίπου στις 4 ώρες και για την αλκαλική φωσφατάση επίσης στις 4 ώρες μετά τον τραυματισμό. Σε αντίστοιχους πειραματισμούς από τον Raekallio ο χρόνος εμφάνισης της ενζυμικής δραστηριότητας σε ανθρώπινα δερματικά τραύματα προσδιορίστηκε για τις μη ειδικές εστεράσες περίπου στη 1 ώρα, για την ΑΤΡάση επίσης στη 1 ώρα και για την αλκαλική φωσφατάση περίπου στις 8 ώρες μετά των τραυματισμό. Η μέγιστη ένταση της ενζυμική δραστηριότητα για την αλκαλική φωσφατάση προσδιορίζεται στις 32 ώρες, για τις μη ειδικές εστεράσες στις 24 ώρες και στην ΑΤΡάση στις 20 ώρες μετά τον τραυματισμό.

ΠΙΝΑΚΑΣ 30 : Χρόνος εμφάνισης και χρόνος μέγιστης τιμής της ενζυμικής δραστηριότητας μετά τον τραυματισμό, στην περιφερική ζώνη προθανάτιων δερματικών τραυμάτων του ανθρώπου.

ΕΝΖΥΜΟ	ΧΡΟΝΟΣ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ.	ΧΡΟΝΟΣ ΜΕΓΙΣΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ
Αλκαλική Φωσφατάση	4 ή 8 ώρες	32 ώρες
Εστεράσες	1 ώρα	24 ώρες
ΑΤΡαση	1 ή 4 ώρες	24 ώρες

Όπως γίνεται φανερό, υπάρχουν διαφοροποιήσεις στο χρόνο εμφάνισης και αύξησης της ενζυμικής δραστηριότητας μεταξύ των δερματικών τραυμάτων του ανθρώπου και των κουνελιών. Επίσημες επιστημονικές αναφορές, που να συγκρίνουν τους παραπάνω χρόνους στον άνθρωπο και στα κουνέλια δεν έχουν ανεβρεθεί, τουλάχιστον από εμάς. Υπάρχουν όμως κάποιες πειραματικές μελέτες πάνω σε ινδικά χοιρίδια, οι οποίες αναφέρονται αμέσως παρακάτω.

Ο Fatten (1970) πραγματοποίησε μελέτες ιστοχημικού προσδιορισμού της ηλικίας τραυμάτων τόσο στον άνθρωπο όσον και σε ινδικά χοιρίδια. Διαπίστωσε ότι η κινητοποίηση των λευκοκυττάρων άρχιζε την 4^η ενώ στον άνθρωπο την 8^η μετά τον τραυματισμό ώρα. Ο χρόνος εμφάνισης της ενζυμικής δραστηριότητας των μη ειδικών εστερασών στα ινδικά χοιρίδια ήταν περίπου 10 λεπτά, ενώ στον άνθρωπο 1 ώρα μετά τον τραυματισμό, ενώ οι αντίστοιχοι χρόνοι για την αλκαλική φωσφατάση ήταν 3 ώρες για τα ινδικά χοιρίδια και 8 ώρες για τον άνθρωπο.

Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα των Berg και Ebel, οι οποίοι κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι γενικά ο χρόνος εμφάνισης της ενζυμικής δραστηριότητας στην

τραυματική περιοχή, είναι διαφορετικός στα ζώα από ότι στον άνθρωπο και συνήθως μικρότερος (Mant K.A., 1973).

7.3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ 2^{ΗΣ} ΟΜΑΔΑΣ

Πολλοί ερευνητές υποστηρίζουν ότι ορισμένα ένζυμα αντιστέκονται στις μεταθανάτιες αλλοιώσεις και αντέχουν μέχρι τη σήψη. Ο Goffin (1969,1972) απέδειξε ότι η αλκαλική φωσφατάση, η όξινη φωσφατάση και οι μη ειδικές εστεράσες, μπορούν να διατηρηθούν αντιστεκόμενες στις μεταθανάτιες αλλοιώσεις, μέχρι την έναρξη της σήψης.

Στη δική μας έρευνα, όπως αναφέρθηκε στα αποτελέσματα, εξήχθηκαν παρόμοια αποτελέσματα. Έτσι, στα 50 από τα 410 δείγματα προθανάτιων τραυμάτων στα οποία οι ιστοχημικές εξετάσεις γινόταν 6 ως 72 ώρες μετά το θάνατο των πειραματόζωων, παρατηρήθηκαν στην τραυματική περιοχή, μεταβολές στην ενζυμική δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης, των μη ειδικών εστερασών και της ΑΤΡάσης παρόμοια με αυτή των 360 προθανάτιων τραυμάτων.

Ένα από τα σοβαρά λοιπόν πλεονεκτήματα της εφαρμογής ιστοχημικών ενζυμικών μεθόδων για τον προσδιορισμό της ηλικίας των τραυματικών κακώσεων είναι ότι η καταγραφή της ενζυμικής δραστηριότητας διατηρείται 72 ώρες μετά τον θάνατο, κάτι που αποδείχτηκε και στις δικές έρευνες .

7.3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ 3^{ΗΣ} ΟΜΑΔΑΣ

Σήμερα, είναι γενικά αποδεκτό από το σύνολο των ερευνητών οι οποίοι ασχολούνται με τον προσδιορισμό της ηλικίας των τραυματικών κακώσεων, με ενζυμικές ιστοχημικές μεθόδους, ότι στα μεταθανάτια δερματικά τραύματα στον άνθρωπο, δεν παρουσιάζεται ενζυμική δραστηριότητα στην τραυματική περιοχή. Υπάρχουν όμως κάποιοι ερευνητές, που υποστηρίζουν ότι είναι δυνατόν να παρατηρηθεί μικρή αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας των μη ειδικών εστερασών στα μεταθανάτια τραύματα (Perper A.J., 1980, Betz P., 1994). Την άποψη αυτή στηρίζουν στο γεγονός, ότι στην κοιλότητα που δημιουργείται σε ένα δερματικό τραύμα έστω και μεταθανάτιο, αφενός υπάρχουν κατεστραμμένα κύτταρα, αφετέρου μπορεί να διεκπεραιωθούν στοιχεία από το αίμα του πτώματος τα οποία οπωσδήποτε περιέχουν μια ποσότητα ενζύμων. Αυτή η ποσότητα μπορεί να δώσει, τουλάχιστον κατά τα λεγόμενά τους μια μικρής έντασης ενζυμική αντίδραση.

Στις δικές μας έρευνες τα μεταθανάτια δερματικά τραύματα των κουνελιών δεν παρουσίασαν ενζυμικές δραστηριότητα, σε κανένα από τα εξεταζόμενα ένζυμα. Για να καταλήξουμε στο συμπέρασμα αυτό, εξετάσαμε ιστοχημικά 95 δείγματα (ιστοτεμάχια) από μεταθανάτια δερματικά τραύματα, χρησιμοποιώντας τις ίδιες μεθόδους και τεχνικές για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας της

αλκαλικής φωσφατάσης, της ΑΤΡασης και των μη ειδικών εστερασών, με τις αντίστοιχες των προθανάτιων τραυμάτων. Σε κανένα όμως από τα προαναφερθέντα δείγματα των μεταθανάτιων τραυμάτων που εξετάστηκαν, δεν παρατηρήθηκε ενζυμική δραστηριότητα στην τραυματική περιοχή.

7.3.4 ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ορισμένοι ερευνητές υποστηρίζουν, ότι το ποσοστό των ανθρώπινων προθανάτιων δερματικών τραυμάτων που παρουσιάζει αρνητική ενζυμική αντίδραση είναι μεγαλύτερο. Ο Betz συγκεκριμένα υποστηρίζει ότι μόνο το 40% των τραυμάτων στις μη ειδικές εστεράσες, το 21% στην ΑΤΡαση και το 29% στην αλκαλική φωσφατάση δίνουν θετική ενζυμική αντίδραση. (Betz P., 1994).

Στη δική μας έρευνα ο αριθμός των προθανάτιων τραυμάτων τα οποία δεν έδωσαν θετική ενζυμική αντίδραση ήταν πολύ μικρός (2.0 % για την αλκαλική φωσφατάση, 1.2 % για τις μη ειδικές εστεράσες και 1.2 % για την ΑΤΡαση). Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι σε όλες τις περιπτώσεις προθανάτιων τραυμάτων με αρνητική ενζυμική αντίδραση, πραγματοποιούνταν επανάληψη της ιστοχημικής ενζυματικής μεθόδου. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα το 37% περίπου των αρχικά αρνητικών δειγμάτων, να δώσουν στη συνέχεια θετική αντίδραση.

7.3.5 ΣΧΕΣΗ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΝΤΑΣΗΣ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΤΡΑΥΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ - ΦΥΛΟΥ

Ορισμένοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι δείγματα δερματικών τραυμάτων που προέρχονται από ανθρώπους νεαρής ηλικίας δίδουν εντονότερες ενζυμικές αντιδράσεις (Betz P., 1994, Perper A.J., 1980, Raekallio J., 1984).

Αυτό δεν καταγράφηκε στις δικές μας έρευνες σε αντίστοιχα δείγματα από κουνέλια. Παρά το γεγονός ότι γιαυτό τον λόγο χρησιμοποιήσαμε πειραματόζωα – κουνέλια ηλικίας από 1^{ος} έως 42 μηνών στα πειράματά μας, ο χρόνος εμφάνισης και η ένταση της ενζυμικής αντίδρασης δεν εξαρτάται από την ηλικία και το φύλο των πειραματόζωων.

7.4 ΙΣΤΟΧΗΜΙΚΕΣ ΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ (ΕΠΙΛΟΓΗ ΜΕΘΟΔΩΝ).

Οι μέθοδοι της ενζυμικής ιστοχημείας, που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης, της ΑΤΡασης και των μη ειδικών εστερασών στην τραυματική περιοχή, είναι μέθοδοι ποιοτικού και όχι ποσοτικού προσδιορισμού. Κατά συνέπεια, θετικό αποτέλεσμα σημαίνει ο χρωματισμός του ενζύμου στην συγκεκριμένη περιοχή που εξετάζουμε.

Επιπλέον όμως, είναι φυσικό ότι αυξημένη συγκέντρωση των ενζύμων συνεπάγεται και αύξηση της έντασης του χρωματισμού που παίρνουν τα ένζυμα κατά την διάρκεια των ιστοχημικών ενζυμικών μεθόδων. Το γεγονός αυτό προσδίδει στις παραπάνω μεθόδους κατά κάποιον τρόπο και “ποσοτικά” χαρακτηριστικά, με το σκεπτικό ότι αυξημένη ένταση του χρωματισμού των ενζύμων στην τραυματική περιοχή, συνεπάγεται και αυξημένη ποσότητα των εξεταζόμενων ιστοχημικά ενζύμων. Σύμφωνα με αυτή την λογική, δημιουργήσαμε μια κλίμακα από το 0 έως το 5+, με την οποία και βαθμολογήσαμε το αποτέλεσμα κάθε πειραματισμού μας, και αξιολογήσαμε συγκριτικά τις ιστοχημικές μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε ένζυμο. Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί ότι για την σωστή αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των ιστοχημικών μεθόδων και τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν, απαιτούνται:

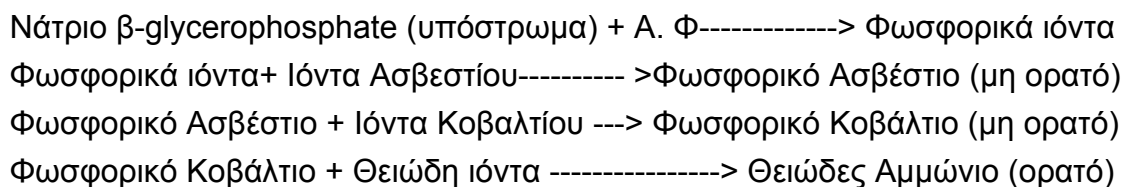
- Μεγάλη εξοικείωση και τριβή με τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται.
- Επιλογή της μεθόδου με το ευκρινέστερο αποτέλεσμα, πράγμα που αναλυτικά θα αναφερθεί αμέσως παρακάτω.

Όσον αφορά τις μεθόδους ιστοχημικού προσδιορισμού της αλκαλικής φωσφατάσης, αναφέρουμε τα εξής:

Η αλκαλική φωσφατάση, όπως προαναφέρθηκε, προσδιορίστηκε για πρώτη φορά από τους Gomori και Takamatsu (1939). Αργότερα ο Burston (1958), εισήγαγε την μέθοδο της ταχείας σύζευξης που έχει μεγαλύτερη ακρίβεια και σταθερότητα. Οι τύποι των ιστοχημικών μεθόδων που εφαρμόζονται για την παρουσίαση της δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης, περιγράφονται αμέσως παρακάτω :

- Μέθοδος Gomori - φωσφορικού ασβεστίου.

Η μέθοδος αυτή, όπως προαναφέρθηκε, παρουσιάστηκε για πρώτη φορά από δύο ερευνητές, τον Gomori από τις Η.Π.Α. και τον Takamatsu από την Ιαπωνία. Μεταγενέστερα βέβαια, ακολούθησαν διάφορες τροποποιήσεις της ίδιας μεθόδου. Σύμφωνα με αυτήν, το διάλυμα που επωάζεται περιέχει β - glycerophosphate, νιτρικό ασβέστιο και χλωριούχο μαγνήσιο. Το σχήμα της αντίδρασης είναι: (Vacca L., 1985, Perper A.J., 1980, Bancroft J.D., et al, 1977).



Αν λοιπόν το επωαστικό διάλυμα περιέχει μονοφωσφορικό εστέρα (π.χ sodium β-glycerophosphate) και ιόντα ασβεστίου (π.χ νιτρικό ασβέστιο), επιπλέον δε κάποιο ενεργοποιητή της αλκαλικής φωσφατάσης (π.χ χλωριούχο μαγνήσιο), γίνεται υδρόλυση του μονοφωσφορικού εστέρα και η απελευθερούμενη φωσφορική ρίζα ενώνεται με τα υπάρχοντα ιόντα του ασβεστίου σχηματίζοντας φωσφορικό ασβέστιο.

Το φωσφορικό ασβέστιο που είναι αδιάλυτη ένωση, καθιζάνει (κατακρημνίζεται) στα σημεία της ενζυμικής δραστηριότητας. Αν στη συνέχεια προστεθεί νιτρικό κοβάλτιο, έχουμε τον σχηματισμό φωσφορικού κοβαλτίου, το οποίο αντιδρώντας με διάλυμα θειούχου αμμωνίου, δίδει σαν τελικό προϊόν θειούχο κοβάλτιο, που έχει μαύρο χρώμα. Με αυτό τον τρόπο γίνεται ορατή η περιοχή της ενζυμικής δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε αρχικά από εμάς, αλλά πολύ σύντομα εγκαταλείφθηκε, λόγω κακής τελικής εικόνας της τραυματικής περιοχής (έντονος μελανός χρωματισμός) και δυσκολίας προμήθειας του sodium β -glycerophosphate, που θεωρείται ναρκωτική ουσία και υπόκειται σε ειδικό καθεστώς προμήθειας.

- Μέθοδος της ταυτόχρονης σύζευξης (Simultaneous Coupling Method).

A. Μέθοδοι της Αζο-βαφής (Azo Dye Methods). Στη μέθοδο αυτή, όπως προαναφέρθηκε, χρησιμοποιείται σαν υπόστρωμα το α -naphthol phosphate, σε συνδυασμό με ένα κατάλληλο διαζωνικό άλας. Το PH του επωαστικού διαλύματος ρυθμίζεται στο 9.2. Η αλκαλική φωσφατάση απελευθερώνει από το υπόστρωμα α -naphthol, το οποίο στη συνέχεια συζευγνύεται με το διαζωνικό άλας, παράγοντας αδιάλυτη αζοβαφή στα σημεία της ενζυμικής δραστηριότητας. Όσο ταχύτερα προχωρήσει η σύζευξη μεταξύ του α -naphthol και του διαζωνικού άλατος, τόσο τα αποτελέσματα είναι καλύτερα. Η ταχύτητα προόδου της σύζευξης εξαρτάται κατά κύριο λόγο από την επιλογή του διαζωνικού άλατος, αλλά και από το PH της αντίδρασης (Lamb J.E. 1998, Liu C., et al 1987, Vacca L., 1985, Bancroft J.D., et al, 1977).

B. Μέθοδος της ταυτόχρονης σύλληψης, με τη χρήση Ναφθολών (Substituted Naphthols method). Η εισαγωγή των ναφθολών αυτών για την ανίχνευση της αλκαλικής φωσφατάσης μελετήθηκε πρώτα από τον Gomori (1952), αλλά και άλλοι ερευνητές έχουν ασχοληθεί με αυτή τη μέθοδο (Burstone 1958, 1961). Μελετήθηκαν τέσσερις ναφθολικοί εστέρες

- Naphthol AS-BI Phosphate
- Naphthol AS-MX Phosphate
- Naphthol AS-CL Phosphate
- Naphthol AS-TR Phosphate

Αυτοί οι εστέρες υδρολύονται γρήγορα από την αλκαλική φωσφατάση παράγοντας επαρκή αδιάλυτα ναφθολικά παράγωγα. Πολλοί ερευνητές συμφωνούν ότι η ενζυμική εντόπιση με τη μέθοδο αυτή πλεονεκτεί έναντι των άλλων μεθόδων. Οι ναφθόλες σε συνδυασμό διαζωνικά άλατα διευρύνουν τις τιμές του PH της ενζυμικής αντίδρασης. Μειονέκτημα της μεθόδου αυτής αναφέρεται το υψηλό κόστος των χρησιμοποιημένων ναφθολών (Meijer A.E., et al 1980, Yoshiaki I., et al, 1997, Bancroft J.D., et al, 1977).

Γ. Μέθοδος της μετά-σύζευξης (Post Coupling Method). Αυτή η τεχνική διαφέρει από την παραπάνω μέθοδο στο ότι η σύζευξη με το διαζωνικό άλας γίνεται μετά την επώαση. Έχει επομένως μεγάλη σημασία το προϊόν της ενζυμικής υδρόλυσης να είναι και να παραμένει αδιάλυτο στις θέσεις της ενζυμικής δραστηριότητας, κατά τη διάρκεια του πλυσίματος το οποίο ακολουθεί την επώαση. Η τομή μεταφέρεται από το επωαστικό διάλυμα, πλένεται σε αποσταγμένο νερό και στη συνέχεια μεταφέρεται σε διάλυμα του διαζωνικού άλατος. Η σύζευξη των δύο αντιδρώντων (προϊόντων του υποστρώματος και διαζωνικού άλατος) παράγει αζοβαφή που καθιζάνει στις θέσεις της ενζυμικής δραστηριότητας. Το θεωρητικό πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι η αποφυγή του ανασταλτικού αποτελέσματος που μπορεί να έχουν τα διαζωνικά άλατα στην ενζυμική δραστηριότητα. Το άριστο PH για τη σύζευξη μεταξύ του άλατος και του a-naphthol μπορεί να χρησιμοποιηθεί χωρίς να έχει σχέση με το άριστο PH της ενζυμικής δραστηριότητας. Επίσης οι τομές μπορούν να επωαστούν για μακρύτερο χρόνο χωρίς να διαχυθεί το τελικό προϊόν της αντίδρασης. Το κύριο μειονέκτημα αυτής της μεθόδου που συνιστά και το λόγο της περιορισμένης σήμερα χρήσης της είναι η δυσκολία ανεύρεσης κατάλληλου υποστρώματος το οποίο να υδρολύεται γρήγορα από το ένζυμο και να παράγει ικανοποιητική ποσότητα αδιάλυτου ιζήματος. Γιαυτό το λόγο και στην δική μας μελέτη δεν χρησιμοποιήθηκε αυτή η μέθοδος.

ΠΙΝΑΚΑΣ 31 : Σύγκριση των μεθόδων Naphtol AS-BI phosphate και a-naphthyl phosphate, όσον αφορά την ευκρίνεια των αποτελεσμάτων τα οποία δίδουν.

ΗΛΙΚΙΑ ΤΟΥ ΤΡΑΥΜΑΤΟΣ (ΣΕ ΩΡΕΣ)	Μέθοδος Naphtol AS-BI phosphate	Μέθοδος a-naphthyl phosphate
0.5 έως 3.0	0	0
3.5	0	1+
4	0	2+
6	0 ή 1+	2+
12	1+	3+
20	1+	3+
24	1+ ή 2+	4+
32	2+	5+
48	1+	4+
72	1+	3+
120	0	2+
144	0	1+

Τα στοιχεία του παραπάνω πίνακα, αναφέρονται και στον πίνακα 23, αλλά για άλλο σκοπό. Σε χρονικό διάστημα 3.5h μετά τον τραυματισμό, ενώ η πρώτη από τις παραπάνω μεθόδους δίνει αρνητικό αποτέλεσμα, η δεύτερη μέθοδος δίνει το πρώτο θετικό αποτέλεσμα. Οι μέθοδοι των υποκαθιστωμένων ναφθολών όταν αρχικά εφαρμόστηκαν θεωρήθηκαν σαν καλύτερες από τις αντίστοιχες των απλών ενώσεων (α-naphthyl phosphate), γιατί παρουσίαζαν αξιοσημείωτη σταθερότητα σε όξινο περιβάλλον. Με τη χρήση τους όμως διαπιστώθηκαν ορισμένα μειονεκτήματα τα σπουδαιότερα από τα οποία αναφέρονται αμέσως παρακάτω:

* Η διαλυτότητα των ναφθολών αυτών είναι πολύ χαμηλή και έτσι δεν επιτυγχάνονται ψηλές συγκεντρώσεις των στο διάλυμα του υποστρώματος. Γιαυτόν το λόγο συνίσταται οι ναφθόλες αυτές να διαλύονται σε μικρή ποσότητα ακετόνης ή διμέθυλφορμαμίδης, πριν αναμειχθούν με το ρυθμιστικό διάλυμα (Gahan P., 1984)

* Είναι ενώσεις με μόριο μεγαλύτερο από το α naphthol, και έχουν ποικιλία πολικών (τελικών) ομάδων, τα οποία σε περιπτώσεις μικρής ποσότητας ενζύμου, δεν συζεύγνυνται εύκολα. Επομένως θέσεις με μικρή ενζυμική δραστηριότητα μπορεί να μην εμφανίσουν θετικό αποτέλεσμα (Vacca L., 1985).

* Έχουν μικρότερη ικανότητα σύνδεσης από τα α naphthol κατά την διάρκεια της ενζυμικής αντίδρασης (Gahan P., 1984, Bancroft J.D., et al, 1977).

Για τις μεθόδους ιστοχημικού προσδιορισμού της ATPασης, αναφέρουμε τα εξής:

- Μέθοδος Wachstein και Meisel τροποποιημένη από τους Pearse και Culling.

Η αρχική μέθοδος προσδιορισμού της ATPασης, παρουσιάστηκε από τους Wachstein και Meisel (1956) και στη συνέχεια τροποποιήθηκε από τον Pearse Bancroft J.D., et al, 1977 (1970). Στη συνέχεια ο Culling (1974) τροποποίησε την παραπάνω μέθοδο αφαιρώντας το ρυθμιστικό διάλυμα Tris 0.2M, αυξάνοντας την ποσότητα του αποσταγμένου νερού και προσθέτοντας 2,4 δινιτροφαινόλη σαν ενεργοποιητή του ενζύμου. Τα αποτελέσματα βελτιώθηκαν αλλά δημιουργήθηκε πολύ ίζημα (Mizutani Y., et al 1995). Στη δική μας έρευνα χρησιμοποιήσαμε την αρχική μέθοδο όπως τροποποιήθηκε από τον Pearse προσθέτοντας και 2,4 δινιτροφαινόλη. Έτσι τα αποτελέσματα ήταν καλά και η ποσότητα του ιζήματος ήταν πολύ μικρή (Τσαβαρής Ν., 1977). Η μέθοδος στηρίζεται στην απελευθέρωση φωσφορικών ιόντων από την αντίδραση μεταξύ του υποστρώματος (ATP δινατριούχου άλατος) και του ενζύμου (ATP). Τα φωσφορικά ιόντα στη συνέχεια αντιδρούν με το νιτρικό μόλυβδο, παράγοντας φωσφορικό μόλυβδο, ο οποίος μετατρέπεται τελικά σε θειικό μόλυβδο που αποκτά σκούρο καφετί χρωματισμό μετά από την επαφή του με το θειώδες αμμώνιο (Espinosa V., et al, 1996, Bancroft J.D., et al, 1977).

ΠΙΝΑΚΑΣ 32 : Σύγκριση των μεθόδων Wachstein – Meisel (τροποποιημένη από τους Pearse και Culling), Wachstein - Meisel (τροποποιημένη από τον Pearse) και Wachstein - Meisel (τροποποιημένη από τον Culling), , όσον αφορά την ευκρίνεια των αποτελεσμάτων τα οποία δίδουν.

ΗΛΙΚΙΑ ΤΟΥ ΤΡΑΥΜΑΤΟΣ (ΣΕ ΩΡΕΣ)	Μέθοδος Wachstein και Meisel (τροποποιημένη από τους Pearse και Culling)	Μέθοδος Wachstein και Meisel (τροποποιημένη από τον Pearse)	Μέθοδος Wachstein και Meisel (τροποποιημένη από τον Culling)
0.5	0	0	0
1	0	0	0
1.5	0	0	0
2	1+	0	0
2.5	1+	1+, (Ιζημα)	0
3	2+	1+, “	0
3.5	2+	1+, “	0
4	2+	1+, “	1+ (Ιζημα)
6	3+	1+, “	1+, “
12	4+	2+, “	1+, “
20	5+	3+, “	2+, “
24	4+	3+, “	1+, “
32	4+	2+, “	1+, “
48	3+	1+, “	1+, “
72	2+	1+, “	0, “
120	1+	0, “	0, “
144	1+	0, “	0, “

Τα στοιχεία του παραπάνω πίνακα, αναφέρονται και στον πίνακα 24, αλλά για άλλο σκοπό. Για τις μεθόδους ιστοχημικού προσδιορισμού των μη ειδικών εστερασών, αναφέρουμε τα παρακάτω:

Μέθοδος a-naphthyl acetate. (Nachlas και Seligman τροποποιημένη από τον Pearse). Όπως αναφέρεται αναλυτικά στο κεφάλαιο «υλικά και μέθοδοι», η μέθοδος αυτή που εντάσσεται στις ιστοχημικές μεθόδους της "ταυτόχρονης σύλληψης" παρουσιάστηκε για πρώτη φορά από τους Nachlas και Seligman (1949) και τροποποιήθηκε από τους Gomori (1950) και Davis και συν. (1959). Χρησιμοποιεί σαν

υπόστρωμα a-naphthyl asetate. Το αποτέλεσμα της δράσης των "μη ειδικών εστερασών" στο υπόστρωμα είναι η απελευθέρωση του a-naphthol κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης. Στη συνέχεια πραγματοποιείται η σύζευξή του με ένα διαζωνικό άλας και κατά συνέπεια η δημιουργία μιας αδιάλυτης έγχρωμης ένωσης (αζοβαφής) στα σημεία της ενζυμικής δραστηριότητας. Η τροποποίηση της αρχικής μεθόδου από τον Gomori, αφορά την χρησιμοποίηση του διαζωνικού άλατος fast blue B (Vacca L., 1985, Bancroft J.D., et al, 1977).

- Μέθοδος ναφθόλης AS-LS azo coupling (Burstones). Είναι και αυτή μέθοδος "ταυτόχρονης σύλληψης".
- Μέθοδος ναφθόλης ASD (Pearse). Είναι μέθοδος "ταυτόχρονης σύλληψης", και ισχύει ότι αναφέρθηκε στις παραπάνω μεθόδους.

ΠΙΝΑΚΑΣ 33 : Σύγκριση των μεθόδων a-naphthyl acetate (Nachlas και Seligman τροποποιημένη από τον Pearse), ναφθόλης AS-LS (Burstones) και ναφθόλης ASD (Pearse), καθώς και των αποτελεσμάτων που αυτές δίδουν.

ΗΛΙΚΙΑ ΤΟΥ ΤΡΑΥΜΑΤΟΣ (ΣΕ ΩΡΕΣ)	Μέθοδος a-naphthyl acetate (Nachlas και Seligman Τροπ. από Pearse)	Μέθοδος ναφθόλης AS-LS (Burstones)	Μέθοδος ναφθόλης ASD (Pearse)
0.5	0	0	0
1	1+	0	0
1.5	1+	0	0
2	2+	0	0
2.5	2+	0	0
3	2+	0	0
3.5	2+	1+	0
4	3+	1+	1+
6	3+	1+	1+
12	4+	2+	1+
20	4+	2+	2+
24	5+	3+	2+
32	4+	2+	1+
48	3+	1+	1+
72	2+	1+	0
120	1+	0	0
144	1+	0	0

Όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα, (του οποίου τα στοιχεία αναφέρονται και στον πίνακα 25, για άλλο σκοπό) η μέθοδος στην οποία καταλήξαμε, ήταν αυτή του *a-naphthyl acetate* δηλαδή των Nachlas και Seligman τροποποιημένη από τον Pearse. Η μέθοδος αυτή έδωσε πολύ ευκρινή αποτελέσματα, από την 1^η μετά τον τραυματισμό ώρα και επιπλέον είναι ευκολότερη στην εφαρμογή της από τις υπόλοιπες δύο μεθόδους. Θεωρούμε ότι η μεγαλύτερη ευκρίνεια των αποτελεσμάτων της μεθόδου των Nachlas και Seligman (τροποποιημένης από τον Pearse) οφείλεται στο γεγονός ότι όλες οι ναφθόλες AS υδρολύονται με αργό ρυθμό, πράγμα που δεν συμβαίνει με το *a-naphthyl acetate*. Επομένως θέσεις με μικρή ενζυμική δραστηριότητα μπορεί να μην εμφανίσουν θετικό αποτέλεσμα (Vacca L., 1985).

7.5 ΑΛΛΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ ΤΩΝ ΤΡΑΥΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΚΩΣΕΩΝ. ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ – ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στην αρχή του κεφαλαίου II (Κεφ. II – 1), έχουν στο παρελθόν χρησιμοποιηθεί και συνεχίζουν να χρησιμοποιούνται, εκτός των ιστοχημικών μεθόδων, πολλές άλλες μέθοδοι, τόσο για τον προσδιορισμό της ηλικίας των τραυματικών κακώσεων, όσο και για την διαφορική διάγνωση των προθανάτιων από τις μεταθανάτιες τραυματικές κακώσεις.

Αρχικά και μέχρι το 1960 περίπου, ο υπολογισμός των παραπάνω παραμέτρων, βασιζόταν κύρια στους μακροσκοπικούς χαρακτήρες των τραυματικών κακώσεων. Τα αποτελέσματα όμως που παίρναμε, δεν ήταν πάντοτε αξιόπιστα, ιδιαίτερα όταν το πτώμα βρισκόταν σε κατάσταση σήψης. Προέκυψε λοιπόν η αναγκαιότητα της ανεύρεσης εργαστηριακών μεθόδων, που θα επιβεβαίωναν και θα ενίσχυαν επιστημονικά τα μακροσκοπικά ευρήματα.

7.5.1 ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.

Οι ιστολογικές μέθοδοι προσδιορισμού της ηλικίας των τραυματικών κακώσεων, και διαφορικής διάγνωσης των προθανάτιων από τα μεταθανάτια τραύματα, στηρίζονται στην μελέτη των μικροσκοπικών (ιστολογικών) χαρακτηριστικών των τραυματικών κακώσεων, καθώς και στην διαφοροποίησή των κατά την διάρκεια της διαδικασίας της επούλωσης και αναγέννησής των. (μετανάστευση των λευκοκυττάρων, κινητοποίηση των ινοκυττάρων, των ινοβλαστών, των αγγειοπλαστών κλπ.) (Perper J.A., 1980).

Βασικό μειονέκτημα των μεθόδων αυτών συνιστά το γεγονός ότι η λευκοκυτταρική αντίδραση στην τραυματική περιοχή, δεν καταγράφεται πριν την παρέλευση περίπου 8 - 10 ωρών από τον τραυματισμό. Πιο απλά, για να γίνουν

εμφανείς οι διαφοροποιήσεις των ιστολογικών χαρακτήρων της τραυματικής περιοχής, πρέπει να περάσουν τουλάχιστον **8 - 10 ώρες από την πρόκληση κάποιου προθανάτιου τραύματος**. Το γεγονός αυτό δεν ικανοποιούσε τις ιατροδικαστικές αναζητήσεις, γιατί στις περισσότερες περιπτώσεις ο χρόνος επιβίωσης μετά από σοβαρό τραυματισμό, είναι μικρότερος από 8 ώρες (Betz P., 1999, Betz P., 1994, Raekallio J., 1980, Raekallio J., 1972) . Επίσης στην περίπτωση της αρχόμενης σήψης, τα ιστολογικά στοιχεία δεν μπορούν να αξιοποιηθούν.

ΠΙΝΑΚΑΣ 34 : Χρονικό διάστημα από τον τραυματισμό μέχρι την εμφάνιση ορισμένων ιστολογικών στοιχείων της τραυματικής περιοχής.

ΧΡΟΝΟΣ ΑΠΟ ΤΟΝ ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΟ	ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ
0 έως 4 ώρες	Δεν διακρίνεται κανένα στοιχείο.
4 έως 8 ώρες.	Λίγα ουδετερόφιλα , πιθανή ύπαρξη μακροφάγων.
8 έως 12 ώρες	Στην περιφερική ζώνη αυξάνεται ο αριθμός των ουδετερόφιλων κοκκιοκυττάρων, εμφάνιση μακροφάγων και πολυμορφοπύρηνων και δραστηριοποίηση των ινοβλαστών. Σχέση κοκκιοκυττάρων με μακροφάγα 5 : 1.Στην κεντρική ζώνη δεν έχει ακόμα αρχίσει η νέκρωση.
16 έως 24 ώρες	Αύξηση του αριθμού των μακροφάγων, σχέση κοκκιοκυττάρων με μακροφάγα 0.4:1, αύξηση των ινοβλαστών. Εμφάνιση μονοπύρηνων.
24 έως 48 ώρες	Αύξηση της ινικής στο μέγιστο.Ο αριθμός των μακροφάγων φτάνει στο μέγιστο στην περιφερική ζώνη. Εμφάνιση της νέκρωσης στην κεντρική ζώνη.
2 έως 4 ημέρες.	Έναρξη επιθηλιοποίησης κύρια στα μικρού μεγέθους τραύματα. Μετανάστευση των ινοβλαστών στην Περιφέρεια του τραύματος.

<u>4 έως 12 μέρες</u>	
Από 4η μέρα_____→	Νέες κολλαγόνες ίνες
4η-5η μέρα_____→	Δημιουργία νέων τριχοειδών.
6η μέρα_____→	Τα λεμφοκύτταρα φτάνουν στο μεγαλύτερο αριθμό.
8η-12 μέρα_____→	Μείωση των φλεγμονωδών κυττάρων, των ινοβλαστών και των τριχοειδών. Αύξηση των κολλαγόνων ινών.

7.5.2 ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Οι βιοχημικές μέθοδοι, στηρίζονται στον προσδιορισμό των τιμών της ισταμίνης και της σεροτονίνης, στην τραυματική περιοχή (Buffoni F. et al 1993, Kampmann H., et al, 1980, Raekallio J., 1980, Raekallio J., 1972).

7.5.3 ΟΙ ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.

Οι ανοσοιστοχημικές μέθοδοι στηρίζονται στον προσδιορισμό ουσιών όπως selectin, fibronectin, tenascin, collagen type I, III, V, VI, κλπ.

Η P-selectin ανιχνεύεται πολύ νωρίς στην τραυματική περιοχή, ενώ η E-selectin μετά από 1.5 ημέρες, μετά τον τραυματισμό. Η fibronectin επίσης ανιχνεύεται 10-30 λεπτά μετά τον τραυματισμό, ενώ η κανονική της εμφάνιση γίνεται 5 ημέρες μετά τον τραυματισμό. Στο μη τραυματισμένο δέρμα βρίσκεται στη βασική μεμβράνη, στα προσαρτήματα του δέρματος κλπ. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αναγέννηση των ιστών, στην επούλωση των τραυμάτων, και στην κυτταρική προσκόλληση και μετανάστευση. Πρόσφατες έρευνες την θεωρούν σαν δείκτη της ζωτικότητας των τραυμάτων. (Betz P, 1995(a), Betz P., et al 1992(b), Grellner W. et al 1998, Ohshima T. 2000, Agren M.S. et al 1994). Η πρώτη εμφάνιση της tenascin στην τραυματική περιοχή, γίνεται την 2^η ημέρα μετά τον τραυματισμό, ενώ η μέγιστη εμφάνισή της γίνεται 5 ημέρες μετά τον τραυματισμό (Betz P., et al 1993(b), Betz P, 1995(a), Castellucci M., et al 1991). Η πρώτη εμφάνιση της laminin στην τραυματική περιοχή, γίνεται την 1.5 ημέρες μετά τον τραυματισμό (Betz P., et al 1992(c), Ohshima T. 2000). Όλες οι παραπάνω ουσίες, εκτός από την P-selectin, εμφανίζονται 1-5 ημέρες μετά τον τραυματισμό (Ohshima T. 2000, Ohshima T. et al 1998, Betz P, 1995(a)). Η πρώτη εμφάνιση των κυττοκερατινών 5 και 13 στην επιδερμίδα της τραυματικής περιοχής με ανοσοιστοχημικές μεθόδους, γίνεται την 5^η ημέρα μετά τον τραυματισμό. Η μέγιστη εμφάνισή της γίνεται 18 ημέρες περίπου μετά τον τραυματισμό (Betz P., et al 1993(c)).

Η σύνθεση του κολλαγόνου κατά την διάρκεια της επούλωσης των τραυμάτων διερευνήθηκε ανοσοιστοχημικά από τους Eisenmenger και συν και Betz και συν., με στόχο τον προσδιορισμό της ηλικίας των τραυματικών κακώσεων. Το κολλαγόνο τύπου I, εμφανίζεται το νωρίτερο 4 ημέρες μετά τον τραυματισμό και συγκεκριμένα γύρω από τα κύτταρα της ινοβλάστης, ενώ η παρουσία του ανιχνεύεται μέχρι την 6^η μέρα μετά τον τραυματισμό. Το κολλαγόνο τύπου III, εμφανίζεται το νωρίτερο 2-3 ημέρες μετά τον τραυματισμό και η παρουσία του διατηρείται μέχρι 2.5 μήνες. Το ίδιο ακριβώς συμβαίνει και στην περίπτωση του κολλαγόνου τύπου V. Το κολλαγόνο τύπου IV και τύπου VII, που αποτελούν στοιχεία της βασικής μεμβράνης, εμφανίζονται το νωρίτερο 3-4 ημέρες μετά τον τραυματισμό, ενώ η ουσιαστική τους εμφάνιση γίνεται 8-21 ημέρες μετά τον τραυματισμό. (Eisenmenger W. et al, 1988, Betz P., et al 1993(a), Betz P., et al 1993(d), Betz P., et al 1993(e), Betz P., et al 1992(c), Betz P., et al 1993(d))

Ο Oehmichen και συν., πειραματίστηκαν με την σύνθεση των DNA και RNA στα κύτταρα της βασικής στοιβάδας του δέρματος της τραυματικής περιοχής. (Sato Y., et al, 2000, Hausmann R. et al 1999, Oehmichen et al, 1997).

Ο Dressler και συν. και Betz και συν., εξέτασαν με ανοσοιστοχημικές μεθόδους την προσκόλληση μορίων ICAM VCAM στα ενδοθηλιακά αγγειακά κύτταρα. (Dressler J. et al 2000, Dressler J. et al 1999, Dressler J. et al 1997, Betz P. et al 1997)

Ο Walcher για τον ίδιο λόγο, χρησιμοποίησε την προσδιορισμό της αιμοσιδηρίνης, χρησιμοποιώντας βαφή με Prussian blue. Η αιμοσιδηρίνη εμφανίζεται 9 ημέρες μετά τον τραυματισμό. (Ohshima T. 2000)

Ο Betz και συν., επίσης χρησιμοποίησαν μεθόδους προσδιορισμού την παραγωγής p53, για τον προσδιορισμό της ηλικίας των τραυματικών κακώσεων. (Betz, P., 1995 (a), Hausmann R., et al 1998).

7.5.4 ΜΕΘΟΔΟΣ ELISA

Η μέθοδος ELISA, χρησιμοποιήθηκε επίσης για τον προσδιορισμό των κυττοκινών και ιδιαίτερα της interleukin (IL-1α), (IL-1β), (IL-6) και (IL-10) και μέσω αυτών για τον προσδιορισμό της ηλικίας των τραυματικών κακώσεων. Οι κυττοκίνες είναι γλυκοπρωτείνες που παράγονται από διάφορα είδη κυττάρων όπως τα ουδετερόφιλα τα μακροφάγα και τα λεμφοκύτταρα και παίζουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα του οργανισμού τη αιμοποίηση στην κυτταρική αναγέννηση κλπ. (Kondo T., et al 1996). Ο χρόνος εμφάνισής τους μετά τον τραυματισμό είναι 30-180 λεπτά της ώρας για την (IL-10), 3 ώρες για την (IL-1β) και 6-12 ώρες για τις (IL-1α) και (IL-6) τραυματισμό (Ohshima T. 2000, Kondo T., et al 1999).

ΠΙΝΑΚΑΣ 35 : Προσδιορισμός της ηλικίας των τραυματικών κακώσεων

ΟΥΣΙΑ	ΣΥΝΤΟΜΟΤΕΡΗ ΕΜΦΑΝΗΣΗ	ΚΑΝΟΝΙΚΗ ΕΜΦΑΝΗΣΗ	ΚΑΘΥΣΤΕΡΙΜΕΝΗ ΕΜΦΑΝΗΣΗ
Fibronectin	10-30 λεπτών	➤ 4 ωρών	Μήνες
Tenascin	2-3 Ημέρες	➤ 5 ημερών	"
E-selectin	1.5 ημέρες		
<u>Κολλαγόνο</u>			
Τύπου I	4-6 ημέρες	➤ 6 ημερών	"
Τύπου III	2-3 ημέρες		2.5 Μήνες
Τύπου IV	4 ημέρες	➤ 8-21 ημερών	"
Τύπου V	3 ημέρες	➤ 6-7 ημερών	2.5 Μήνες
Τύπου VI	3 ημέρες	➤ 6-7 ημερών	"
Τύπου VII	4 ημέρες	➤ 8-21 ημερών	"
<u>Μυοινοβλάστη</u>			
<u>Θετική για :</u>			
Laminin	1.5 ημέρες	➤ 16-31 ημερών	"
Heparin sulfate			
Proteoglycan	1.5 ημέρες		"
Smooth muscle cell α – actin	5 Ημέρες		"
<u>Cytokeratin 5, 13</u>	5 ημέρες	➤ 18 ημερών	
<u>Epithelial basement membrane</u>	4-8 ημέρες	➤ 13-21 ημερών	
Η αιμοσιδηρίνη	9 ημέρες		
<u>Κυττοκίνες</u> (interleukin)			
(IL-1 ^α)	6-12 ώρες		
(IL-1 ^β)	3 ώρες		
(IL-6)	6-12 ώρες		
(IL-10)	0.5-3 ώρες		

Παραπάνω παραθέσαμε τον πίνακα 34, με την εμφάνιση των ουσιών που χρησιμοποιούμε για τον προσδιορισμό της ηλικίας των τραυματικών κακώσεων με άλλες μη ιστοχημικές μεθόδους. (Betz, P., 1995 (a),)

7.5.5 ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΟΥ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

Η μέθοδος του ανοσοφθορισμού χρησιμοποιείται για την διαπίστωση ινικής σε ιστολογικές τομές πρόσφατων τραυμάτων, όχι μόνο για τραύματα του δέρματος, αλλά και του λιπώδους ιστού.

7.5.6 ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ

Γίνεται χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σε ειδικά επεξεργασμένα τεμάχια της τραυματικής περιοχής, για την διαπίστωση της προθανάτιας ή μεταθανάτιας δημιουργίας ενός τραύματος. Τα νημάτια της ινικής στα προθανάτια τραύματα είναι στερεά καθηλωμένα, σε αντίθεση με τα εύκολα αποκολλούμενα νημάτια των μεταθανάτιων τραυμάτων.

ΠΙΝΑΚΑΣ 36: Δυνατότητα συντομότερου προσδιορισμού της ηλικίας των τραυματικών κακώσεων, με διάφορες μεθόδους.

ΜΕΘΟΔΟΙ	ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΣΕ ΩΡΕΣ ΜΕΤΑ ΤΟΝ ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΟ
ΙΣΤΟΧΗΜΙΚΕΣ	Από την 1 ^η ώρα
ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΕΣ	8 – 12 ώρες
ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΙΚΕΣ	48 – 72 ώρες

Οι ενζυμικές ιστοχημικές μέθοδοι προσδιορισμού της ηλικίας των τραυματικών κακώσεων, παρά το γεγονός ότι είναι παλαιότερες από κάποιες από τις προαναφερθείσες ανοσοιστοχημικές, πλεονεκτούν για τους παρακάτω λόγους:

- Εφαρμόζονται σε δερματικές τραυματικές κακώσεις, οποιασδήποτε αιτιολογίας τραυματισμού.
- Είναι απλές στην εφαρμογή τους.
- Δεν απαιτούν εξειδικευμένα αντιδραστήρια (όπως οι ανοσοιστοχημικές μέθοδοι).
- Δίδουν αξιόπιστα αποτελέσματα σε σύντομο χρόνο μετά τον τραυματισμό (περίπου μία ώρα μετά την δημιουργία του τραύματος), σε σχέση με άλλες μεθόδους.

- Παραμένουν αξιόπιστες (σε περιπτώσεις προθανάτιων τραυματισμών) ακόμα και όταν εφαρμόζονται 3-5 ημέρες μετά θάνατο, δηλαδή σε περίοδο αρχόμενης σήψης.
- Χρησιμοποιούνται με μικρές τροποποιήσεις, για τον προσδιορισμό της ηλικίας εγκαυμάτων, καθώς και τραυματικών κακώσεων οστών, χόνδρων και μυών.(Miyaki K.,et al, 1994, Prosperi E., et al 1982, Perper A.J., 1980, Sugimura K.,et al 1980)

Παρά τα όσα παραπάνω έχουν αναφερθεί, για την εξαγωγή σωστού συμπεράσματος τόσο για την ηλικία όσον και για την προ- ή μεταθανάτια δημιουργία ενός τραύματος, πρέπει απαραίτητα να ληφθούν υπόψη και τα ευρήματα της νεκροψίας - νεκροτομής που αναφέρονται στο ίδιο επιστημονικό πεδίο.

Η συνεισφορά των παραπάνω ιστοχημικών μεθόδων στην ιατροδικαστική διερεύνηση των τραυματικών κακώσεων σε συνδυασμό με τα ευρήματα της νεκροψίας είναι καθοριστική.

8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

8.1 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΔΗΚΤΙΚΩΝ ΚΑΚΩΣΕΩΝ

Οι δήξεις των σκύλων τόσο στα αιγοπρόβατα, όσο και σε άλλα ζωικά είδη μπορούν να προκαλέσουν :

Δηκτικές τραυματικές κακώσεις από γύσσοντα όργανα (κυνόδοντες, τομείς και κορυφές των προγομφίων και των γομφίων οδόντων), από θλώντα όργανα (προγόμφιοι και γομφίοι), τραυματικές κακώσεις που συνοδεύονται από αποσπάσεις τεμαχίων ιστών (στις μεγάλες μυϊκές μάζες ή όπου υπάρχουν όργανα που εξέχουν από το σώμα των “ζώων θυμάτων”)

Θλαστικές κακώσεις δηλαδή εκχυμώσεις, εκδορές, διασχίσεις, αιματώματα και αιμορραγικές διηθήσεις των υποδόριων ιστών (κύρια από τους προγόμφιους και γομφίους).

Σκελετικές κακώσεις κύρια κατάγματα σπονδύλων, πλευρών, καθώς επίσης και των οστών των άκρων .

Οι θέσεις των δηκτικών κακώσεων.

Παραθέτουμε πίνακα με το ποσοστό (%) ανεύρεσης των δηκτικών τραυματικών κακώσεων ανά περιοχή του σώματος, σε νεκρά και ζωντανά ζώα θύματα.

ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΡΑΥΜΑΤΟΣ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΑΝΕΥΡΕΣΗΣ ΤΡΑΥΜΑΤΩΝ ΣΕ ΝΕΚΡΑ ΖΩΑ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΑΝΕΥΡΕΣΗΣ ΤΡΑΥΜΑΤΩΝ ΣΕ ΖΩΝΤΑΝΑ ΖΩΑ
ΚΕΦΑΛΗ	10 %	27%
ΤΡΑΧΗΛΟΣ ΚΑΙ ΛΑΙΜΟΣ	70 %	20%
ΘΩΡΑΚΑΣ	25%	14%
ΚΟΙΛΙΑΚΗ ΚΟΙΛΟΤΗΤΑ	55%	26%
ΓΛΟΥΤΟΙ, ΜΗΡΟΙ, ΠΕΡΙΝΕΟ	35%	60%
ΠΡΟΣΘΙΑ ΑΚΡΑ	15%	25%
ΟΠΙΣΘΙΑ ΑΚΡΑ	45%	60%

Η βαρύτητα των δηκτικών κακώσεων.

Η βαρύτητα δηλαδή η σοβαρότητα των δηκτικών κακώσεων για την υγεία και την ζωή των «ζώων θυμάτων», είναι συνάρτηση πολλών παραγόντων, μεταξύ των οποίων πρωταρχικής σημασίας οι θέσεις, το βάθος και ο αριθμός των κακώσεων, σε κάθε «ζώο θύμα».

Οι συνέπειες από τις δηκτικές κακώσεις.

Οι συνηθισμένες συνέπειες των δηκτικών κακώσεων, συνιστούνται, αφενός μεν στο θάνατο των ζώων, αμέσως ή λίγο αργότερα από την πρόκληση της δήξης, αφετέρου δε στη διάφορου βαθμού αναπηρία που προκαλούν. Οι συνέπειες αυτές εξαρτώνται άμεσα από τη φυσιογνωμία της κάκωσης (θέση, αριθμός, βάθος κ.λ.π.) και από το χρονικό διάστημα μεταξύ τραυματισμού και έναρξης της θεραπείας των τραυμάτων.

Στοιχεία της δηκτικής κάκωσης που βοηθούν στην ταυτοποίηση των σωματομετρικών χαρακτηριστικών των “σκύλων δραστών”.

Ο συνδυασμός της θέσης, του σχήματος και του βάθους των δηκτικών κακώσεων, που ουσιαστικά δείχνει το οδοντικό αποτύπωμα, μπορεί να υποδείξει τα σωματομετρικά χαρακτηριστικά των «σκύλων δραστών», πάντα σε συνδυασμό με τα σωματομετρικά χαρακτηριστικά των «ζώων θυμάτων».

ΣΩΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	ΘΕΣΕΙΣ ΤΩΝ ΚΑΚΩΣΕΩΝ	ΒΑΘΟΣ ΤΩΝ ΚΑΚΩΣΕΩΝ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΤΩΝ ΚΑΚΩΣΕΩΝ
ΜΕΓΑΛΟΣΩΜΟΙ ΣΚΥΛΟΙ	ΣΤΑ ΥΨΗΛΟΤΕΡΑ ΣΗΜΕΙΑ ΤΟΥ ΣΩΜΑΤΟΣ (Κεφαλή, Τράχηλος, Λαιμός, Ράχη, Οσφύς, κλπ)	ΒΑΘΙΕΣ ΚΑΚΩΣΕΙΣ ΜΕ ΕΚΤΕΤΑΜΕΝΕΣ ΒΛΑΒΕΣ ΣΤΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ.	ΜΙΚΡΟΣ ΣΥΝΗΘΩΣ ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΚΩΣΕΩΝ, ΑΛΛΑ ΜΕ ΜΕΓΑΛΥΤΕΡΟ ΖΗΜΙΟΓΟΝΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ ΛΟΓΩ ΤΗΣ ΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΜΕΓΑΛΟΥ ΒΑΘΟΥΣ ΤΩΝ.
ΜΙΚΡΟΣΩΜΟΙ ΣΚΥΛΟΙ	ΣΕ ΠΙΟ ΧΑΜΗΛΑ ΣΗΜΕΙΑ ΤΟΥ ΣΩΜΑΤΟΣ (Άκρα, Μηροί, Γλουτοί, Μαστοί, κλπ)	ΚΑΚΩΣΕΙΣ ΜΙΚΡΟΤΕΡΟΥ ΒΑΘΟΥΣ	ΜΕΓΑΛΟΣ ΣΥΝΗΘΩΣ ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΚΩΣΕΩΝ.

8.2 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ ΤΩΝ ΤΡΑΥΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΚΩΣΕΩΝ ΜΕ ΙΣΤΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ.

1. Περί τραυμάτων και φλεγμονών.

Οι φλεγμονώδης διεργασίες συμπεριλαμβανομένων και αυτών του τραυματικού τύπου, διαφοροποιούνται σε μικρό ή μεγάλο βαθμό, τόσο μεταξύ των ζωικών ειδών, όσον και μεταξύ ενός ζωικού είδους και του ανθρώπου. Οι φλεγμονικές ιδιομορφίες που συνδέονται με το είδος του ζωικού οργανισμού, δεν έχουν μόνο θεωρητικό ενδιαφέρον, αλλά διαδραματίζουν σοβαρό ρόλο στον προσδιορισμό της ηλικίας των φλεγμονωδών εξεργασιών.

2. Μεταβολές της ενζυμικής δραστηριότητας στην τραυματική περιοχή.

Στις τραυματικές κακώσεις του δέρματος, μπορούν μικροσκοπικά να διακριθούν 2 ζώνες. Η κεντρική ζώνη όπου παρατηρείται μείωση της ζωτικότητας των κυττάρων του συνδετικού ιστού (αρνητική ζωική αντίδραση). Τα κύτταρα στη περιοχή αυτή παρουσιάζουν μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας 1-4 ώρες μετά τον τραυματισμό. Το φαινόμενο αυτό θεωρείται ένα από τα πρωιμότερα σημεία της επικείμενης νέκρωσης της κεντρική ζώνη του τραύματος. Στη περιφερική ζώνη του τραύματος παρατηρείται σημαντική αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας (θετική ζωική αντίδραση). Η αύξηση αυτή αφορά τόσο τη δραστηριότητα των ενζύμων που ήδη υπάρχουν όσο και την ποσότητα τους, πράγμα που έχει αποδειχθεί στις αμινοπεπτιδάσες και στις φωσφατάσες με ποσοτική μέτρηση. Η αύξηση της δραστηριότητας και της ποσότητας των ενζύμων εντάσσεται στην αμυντική διαδικασία που προβάλλει ο οργανισμός σε περίπτωση τραυματισμού

3. Προσδιορισμός της ηλικίας των τραυματικών κακώσεων (δική μας έρευνα).

α. Παρατηρήσαμε αύξηση της ενζυμική δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης στην τραυματική περιοχή εμφανίζεται 3.5 ώρες ενώ των μη ειδικών εστερασών και της ΑΡΤάσης 1.0 ώρα και 2.0 ώρες αντίστοιχα μετά τον τραυματισμό. Η μέγιστη ένταση της ενζυμικής δραστηριότητας για την αλκαλική φωσφατάση, τις μη ειδικές εστεράσες και της ΑΤΡάση παρατηρείται στις 32, 24 και 20 ώρες μετά των τραυματισμό. Οι επιστήμονες που μελέτησαν και μελετούν την ηλικία των τραυματικών κακώσεων, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι γενικά ο χρόνος εμφάνισης της ενζυμικής δραστηριότητας στην τραυματική περιοχή, είναι διαφορετικός στα ζώα από ότι στον άνθρωπο και συνήθως μικρότερος, πράγμα που συμφωνεί με την δική μας μελέτη.

β. Διατήρηση της ενζυμικής δραστηριότητας ακόμα και σε αρχόμενη σήψη.

Ένα από τα σοβαρά πλεονεκτήματα της εφαρμογής ιστοχημικών ενζυμικών μεθόδων για τον προσδιορισμό της ηλικίας των τραυματικών κακώσεων είναι ότι η καταγραφή της ενζυμικής δραστηριότητας διατηρείται 72 ώρες μετά τον θάνατο, κάτι που αποδείχτηκε και στις δικές έρευνες .

γ. Μεταθανάτια τραύματα.

Στα μεταθανάτια δερματικά τραύματα τόσο στον άνθρωπο, όσο και στα κουνέλια, δεν παρουσιάζεται ενζυμική δραστηριότητα στην τραυματική περιοχή.

δ. Σχέση του χρόνου εμφάνισης και της έντασης της ενζυμικής δραστηριότητας του τραύματος με την ηλικία και το φύλο.

Ο χρόνος εμφάνισης και η ένταση της ενζυμικής αντίδρασης δεν εξαρτάται από την ηλικία και το φύλο των πειραματόζωων .

4. Ιστοχημικές ενζυμικές μέθοδοι για την καταγραφή της ενζυμικής δραστηριότητας.

Οι μέθοδοι της ενζυμικής ιστοχημείας, που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης, της ATPασης και των μη ειδικών εστερασών στην τραυματική περιοχή, είναι μέθοδοι ποιοτικού και όχι ποσοτικού προσδιορισμού. Για την σωστή αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των ιστοχημικών μεθόδων και τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν απαιτούνται, επιλογή της μεθόδου με το ευκρινέστερο αποτέλεσμα και μεγάλη εξοικείωση με τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται.

Η μέθοδος ιστοχημικού προσδιορισμού της αλκαλικής φωσφατάσης που μας έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα ήταν η μέθοδος της Αζο-βαφής (Azo Dye Methods).

Η μέθοδος ιστοχημικού προσδιορισμού της ATPασης που μας έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα ήταν η μέθοδος Wachstein και Meisel τροποποιημένη από τους Pearse και Culling.

Η μέθοδος ιστοχημικού προσδιορισμού των μη ειδικών εστερασών που μας έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα ήταν η, μέθοδος a-naphthyl acetate. (Nachlas και Seligman τροποποιημένη από τον Pearse).

5. Άλλες μέθοδοι προσδιορισμού της ηλικίας των τραυματικών κακώσεων και διαφορικής διάγνωσης των προθανάτιων από τα μεταθανάτια τραύματα.

Μακροσκοπική παρατήρηση των τραυματικών κακώσεων. Τα αποτελέσματα δεν είναι πάντοτε αξιόπιστα, ιδιαίτερα όταν το πτώμα βρίσκεται σε κατάσταση σήψης.

Οι ιστολογικές μέθοδοι, στηρίζονται στην μελέτη των μικροσκοπικών (ιστολογικών) χαρακτηριστικών των τραυματικών κακώσεων, καθώς και στην διαφοροποίησή των κατά την διάρκεια της διαδικασίας της επούλωσης και αναγέννησής των. Βασικό

μειονέκτημα των μεθόδων αυτών συνιστά το γεγονός ότι η λευκοκυτταρική αντίδραση στην τραυματική περιοχή, δεν καταγράφεται πριν την παρέλευση περίπου 8 - 10 ωρών από τον τραυματισμό. Επίσης στην περίπτωση της αρχόμενης σήψης, τα ιστολογικά στοιχεία δεν μπορούν να αξιοποιηθούν.

Οι βιοχημικές μέθοδοι, στηρίζονται στον προσδιορισμό των τιμών της ισταμίνης και της σεροτονίνης, στην τραυματική

Οι ανοσοιστοχημικές μέθοδοι στηρίζονται στον προσδιορισμό ουσιών όπως selectin, fibronectin, tenascin, collagen type I, III, V, VI, κλπ. Μειονέκτημα των μεθόδων αυτών αποτελεί το γεγονός ότι μπορούν να δώσουν θετικό αποτέλεσμα 48 – 72 ώρες μετά τον τραυματισμό.

Η μέθοδος ELISA, χρησιμοποιήθηκε επίσης για τον προσδιορισμό των κυττοκινών και ιδιαίτερα της interleukin (IL-1α), (IL-1β), (IL-6) και (IL-10) και μέσω αυτών για τον προσδιορισμό της ηλικίας των τραυματικών κακώσεων.

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σε ειδικά επεξεργασμένα τεμάχια της τραυματικής περιοχής, για την διαπίστωση της προθανάτιας ή μεταθανάτιας δημιουργίας ενός τραύματος.

Οι ενζυμικές ιστοχημικές μέθοδοι προσδιορισμού της ηλικίας των τραυματικών κακώσεων, παρουσιάζουν τα παρακάτω πλεονεκτήματα :

Εφαρμόζονται σε δερματικές τραυματικές κακώσεις, οποιασδήποτε αιτιολογίας τα τραυματισμού.

Είναι απλές στην εφαρμογή τους.

Δεν απαιτούν εξειδικευμένα αντιδραστήρια (όπως οι ανοσοιστοχημικές μέθοδοι).

Δίδουν αξιόπιστα αποτελέσματα σε σύντομο χρόνο μετά τον τραυματισμό (περίπου μία ώρα μετά την δημιουργία του τραύματος), σε σχέση με άλλες μεθόδους.

Παραμένουν αξιόπιστες (σε περιπτώσεις προθανάτιων τραυματισμών) ακόμα και όταν εφαρμόζονται 3-5 ημέρες μετά θάνατο, δηλαδή σε περίοδο αρχόμενης σήψης.

Χρησιμοποιούνται με μικρές τροποποιήσεις, για τον προσδιορισμό της ηλικίας εγκαυμάτων, καθώς και τραυματικών κακώσεων οστών, χόνδρων και μυών

9. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

9.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΔΗΚΤΙΚΩΝ ΚΑΚΩΣΕΩΝ ΣΤΑ ΖΩΑ.

Διερευνούνται οι δηκτικές κακώσεις που προκλήθηκαν από σαρκοφάγα ζώα («ζώα δράστες») και συγκεκριμένα από σκύλους, σε αιγοπροβατοειδή («ζώα θύματα»).

Οι βασικοί στόχοι της εργασίας αυτής ήταν τόσο η διερεύνηση των δηκτικών τραυμάτων από κτηνιατροδικαστική άποψη, όσο και η προσπάθεια εντοπισμού των «ζώων δραστών», από την μελέτη των δηκτικών κακώσεων που αυτά προκαλούν.

Το πειραματικό τμήμα της παρούσας εργασίας, δεν είχε την έννοια και τη μεθοδολογία της εργαστηριακής αναπαραγωγής δηκτικών κακώσεων. Βασικός του στόχος ήταν η ανεύρεση, η καταγραφή και η επεξεργασία στοιχείων από δηκτικές κακώσεις, που προκλήθηκαν σε φυσικό περιβάλλον, χωρίς δική μας παρέμβαση. Συνολικά εξετάστηκαν 3.992 παραγωγικά «ζώα – θύματα», και συγκεκριμένα 591 αιγοειδή, 3.206 προβατοειδή, 47 κουνέλια και 148 ορνιθοειδή. Όλα τα ζώα που εξετάστηκαν, είχαν υποστεί δηκτικές τραυματικές κακώσεις, οι οποίες είχαν προκαλέσει θάνατο ή διάφορης βαρύτητας τραυματισμό. Γιαυτό διαχωρίστηκαν σε 2 ομάδες, την ομάδα των νεκρών και την ομάδα των τραυματισμένων ζώων. Τα ζώα κάθε ομάδας εξετάστηκαν με τον ίδιο μεθοδολογικά τρόπο και στη συνέχεια διαχωρίστηκαν σε μικρότερες υποομάδες, ανάλογα με το είδος, την ηλικία το φύλο και τη σωματική τους διάπλαση. Μελετήθηκε ο αριθμός, το σχήμα, το βάθος, το είδος, οι θέσεις και η σοβαρότητα των δηκτικών κακώσεων που είχαν προκληθεί. Έτσι προέκυψε η συχνότητα πρόκλησης δηκτικών κακώσεων στις διάφορες περιοχές του σώματος των «ζώων θυμάτων». Στα τραυματισμένα ζώα, εφαρμόστηκε θεραπευτική αγωγή.

Επίσης εξετάστηκαν 225 «σκύλοι δράστες», που είχαν συλληφθεί επαυτοφώρω στον τόπο της ζημιάς. Καταγράφηκαν η φυλή, το φύλο και τα σωματομετρικά τους χαρακτηριστικά, τα οποία συγκρίθηκαν τόσο με τα σωματομετρικά χαρακτηριστικά των «ζώων θυμάτων», όσο και με τα χαρακτηριστικά των δηκτικών κακώσεων που αυτοί προκάλεσαν.

9.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ ΤΩΝ ΤΡΑΥΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΚΩΣΕΩΝ ΜΕ ΙΣΤΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ, ΣΤΑ ΖΩΑ.

Ο προσδιορισμός της ηλικίας των τραυματικών κακώσεων, καθώς και η διάκριση των προθανάτιων από τα μεταθανάτια τραύματα, τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα, συνιστά ένα μεγάλο και σοβαρό ιατροδικαστικό πρόβλημα μέχρι και σήμερα. Πρώτος ο Cohnheim το 1867 διερεύνησε αυτό το θέμα, βασίζοντας τις έρευνες του σε παρατηρήσεις πάνω στην εξέλιξη της επούλωσης των τραυμάτων. Πράγματι κατά τη διάρκεια της επούλωσης ενός τραύματος γίνονται σοβαρές ιστολογικές και ενζυμικές

διεργασίες, εμφανείς μικροσκοπικά και ιστοχημικά, βάση των οποίων μπορεί να καθοριστεί η ηλικία του τραύματος. Στη συνέχεια οι ερευνητές που ασχολήθηκαν με τον υπολογισμό της ηλικίας των τραυμάτων χρησιμοποίησαν διάφορες ιστολογικές, ιστοχημικές, βιοχημικές και ανοσοιστοχημικές μεθόδους, για να φτάσουν στο επιθυμητό αποτέλεσμα. Οι ιστοχημικές μέθοδοι προσδιορισμού των δερματικών τραυμάτων στηρίζονται όπως προαναφέραμε στον προσδιορισμό των μεταβολών των ενζυμικών αντιδράσεων της τραυματικής περιοχής. Οι βιοχημικές μέθοδοι προσδιορίζουν τις τιμές της ισταμίνης και της σεροτονίνης, οι ιστολογικές καταγράφουν την εμφάνιση διάφορων κυτταρικών στοιχείων στην τραυματική περιοχή (ουδετερόφιλα, μακροφάγα, λεμφοκύτταρα, ινοβλάστες, κλπ) και τέλος οι ανοσοιστοχημικές μέθοδοι στηρίζονται στον προσδιορισμό των fibronectine, tenascin, collagen type I, III, V, VI.

Υλικά και μέθοδοι

Χρησιμοποιήθηκαν 80 κουνέλια φυλής Νέας Ζηλανδίας, 50 θηλυκά και 30 αρσενικά, ηλικίας 1-42 μηνών. Έγιναν τραύματα μετά από τοπική αναισθησία, μήκους 1.0 – 2.0 cm και βάθους ίσου με το πάχος του δέρματος. Η λήψη των δειγμάτων (ιστοτεμαχίων), γινόταν κάτω από συνθήκες γενικής αναισθησίας ή μετά από ευθανασία των πειραματόζωνων.

Εξετάστηκαν 505 δείγματα από δερματικά τραύματα. Από αυτά 410 ανήκαν σε προθανάτια και 95 σε μεταθανάτια δερματικά τραύματα.

Στα 410 προθανάτια τραύματα, το χρονικό διάστημα από την πρόκληση των τραυμάτων ως τη λήψη των δειγμάτων κυμαινόταν από 0.5 έως 144 ώρες (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 6, 12, 20, 24, 32, 48, 72, 96, 120, 144 ώρες).

Τα 95 μεταθανάτια τραύματα, γινόταν, 0.5 έως 4 ώρες μετά τον θάνατο των πειραματόζωνων (0.5, 1, 2, 3, 4, ώρες). Στα μεταθανάτια τραύματα επίσης, το χρονικό διάστημα από την πρόκληση των τραυμάτων, ως τη λήψη των δειγμάτων, κυμαινόταν από 1 έως 32 ώρες.(1, 2, 3, 3.5, 12, 20, 24, 32 ώρες).

Τα δείγματα χωρίστηκαν σε 3 ομάδες.

Η πρώτη ομάδα περιλάμβανε 360 προθανάτια δερματικά τραύματα, από τα οποία τα δείγματα παραλήφθηκαν αμέσως μετά την ευθανασία (ή την αναισθησία) των αντίστοιχων πειραματόζωνων.

Η δεύτερη ομάδα περιλάμβανε 50 προθανάτια δερματικά τραύματα, από τα οποία τα δείγματα παραλήφθηκαν, 6 έως 72 ώρες, μετά την ευθανασία (ή την αναισθησία), των αντίστοιχων πειραματόζωνων.

Η τρίτη ομάδα περιλάμβανε 95 μεταθανάτια δερματικά τραύματα, τραύματα δηλαδή που προκλήθηκαν μετά τον θάνατο των αντίστοιχων πειραματόζωνων.

Τα δείγματα αμέσως μετά τη λήψη τους βυθιζόταν σε υγρό άζωτο για μονιμοποίηση. Στη συνέχεια γινόταν τομές σε ψυκτικό μικροτόμο, σε θερμοκρασία -20 βαθμούς Κελσίου, πάχους περίπου 10 μικρόμετρα (μm) και αμέσως μετά πραγματοποιούταν ιστοχημικές εξετάσεις για τον προσδιορισμό της αλκαλικής φωσφατάσης, των μη ειδικών εστερασών και της ATP-άσης. Στα δείγματα γινόταν και χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης.

Οι μάρτυρες ήταν ιστοί από την τραυματική περιοχή, οι οποίοι επώαστηκαν χωρίς υπόστρωμα.

Αλκαλική φωσφατάση

Πραγματοποιήθηκε ιστοχημικός προσδιορισμός της αλκαλικής φωσφατάσης σε 300 προθανάτια τραύματα χρησιμοποιώντας την μέθοδο azo dye coupling (μέθοδος της αζοβαφής). *Αντιδραστήρια* : Sodium a-naphthyl phosphate 10 mg, ρυθμιστικό διάλυμα Tris 0.1M (stock solution), pH 10.0 10 ml, διαζωνικό άλας, fast red TR 10 mg. Το τελικό pH του υποστρώματος ρυθμίζεται στο pH=9.2. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10-60 λεπτά, πλύσιμο σε απεσταγμένο νερό, αντίχρωση με 2% πράσινο του μεθυλενίου. Πλύσιμο σε νερό βρύσης, τοποθέτηση γλυκερίνης και επικάλυψη. Η ενζυμική δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης χρωματίζεται κόκκινο-κοκκικοκαφέ και οι πυρήνες των κυττάρων πράσινοι.

Μη ειδικές εστεράσες

Πραγματοποιήθηκε ιστοχημικός προσδιορισμός των μη ειδικών εστερασών σε 250 προθανάτια τραύματα, χρησιμοποιώντας την μέθοδο Naclac and Selingman τροποποιημένη από τον Pearse. *Αντιδραστήρια* : Sodium a-naphthyl acetate 10 mg, ακετόνη 0.25 ml, φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M (stock solution), pH=7.4, 10ml, διαζωνικό άλας, fast blue B salt 50 mg. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και πλύσιμο με απεσταγμένο νερό για 5 λεπτά, τοποθέτηση γλυκερίνης και επικάλυψη. Η ενζυμική δραστηριότητα των μη ειδικών εστερασών χρωματίζεται καφέ-κόκκινο.

ΑΤΡάση

Πραγματοποιήθηκε ιστοχημικός προσδιορισμός της ΑΤΡάσης σε 200 προθανάτια τραύματα, χρησιμοποιώντας την μέθοδο Wachstein και Meisel τροποποιημένη από τον Pearse. *Αντιδραστήρια* : ATP δινατριούχο άλας 2 mg, ρυθμιστικό διάλυμα Tris 0.2M, pH=7.2, 0.4 ml, διάλυμα νιτρικού μολύβδου 2 %, 0.1 ml διάλυμα θειικού μαγνησίου 2 % 0.1 ml, απεσταγμένο νερό 0.5 ml και 2,4-δινιτροφαινόλη 1.5 mg. Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 60 λεπτά, πλύσιμο με απεσταγμένο νερό, βύθιση σε 1 % θειούχο αμμώνιο για 1 λεπτό, πλύσιμο σε νερό βρύσης, τοποθέτηση γλυκερίνης και επικάλυψη. Η ενζυμική δραστηριότητα της ΑΤΡάσης χρωματίζεται καφέ-μαύρες εναποθέσεις.

Ο προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης, των μη ειδικών εστερασών και της ATP-άσης στα μεταθανάτια τραύματα, γινόταν με την ίδια μεθοδολογία, όπως των αντίστοιχων προθανάτιων.

Αποτελέσματα

Προθανάτια τραύματα

Εξετάστηκαν ιστοχημικά δείγματα από 410 (360+50) προθανάτια δερματικά τραύματα.

Αλκαλική φωσφατάση

Αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης παρατηρήθηκε περίπου 3.5 ώρες μετά το τραυματισμό ενώ η μέγιστη ένταση της εμφανίστηκε στις 32 ώρες. Ποσοστό 2 % του συνόλου των εξετασθέντων δειγμάτων δεν έδωσε θετική αντίδραση. Στο φυσιολογικό (μη τραυματισμένο) δέρμα, η επιδερμίδα δεν χρωματίζεται με την μέθοδο αυτή, σε αντίθεση με τα προσαρτήματα του δέρματος, τα αγγειακά τοιχώματα και οι ινοβλάστες που χρωματίζονται.

Μη ειδικές εστεράσες

Αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας των μη ειδικών εστερασών παρατηρήθηκε περίπου 1.0 ώρα μετά το τραυματισμό ενώ η μέγιστη ένταση της εμφανίστηκε στις 24 ώρες. Ποσοστό 1.2 % του συνόλου των εξετασθέντων δειγμάτων δεν έδωσε θετική αντίδραση. Στο φυσιολογικό (μη τραυματισμένο) δέρμα εμφανίζεται έντονος χρωματισμός μεταξύ της κοκκιώδους και κερατοειδούς στοιβάδας. Επίσης οι θήκες των τριχών και οι ινοβλάστες του δέρματος χρωματίζονται έντονα.

ATPάση

Αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας της ATPάσης παρατηρήθηκε περίπου 2.0 ώρες μετά το τραυματισμό ενώ η μέγιστη τιμή της εμφανίστηκε στις 20 ώρες. Ποσοστό 1.5 % του συνόλου των εξετασθέντων δειγμάτων δεν έδωσε θετική αντίδραση. Στο φυσιολογικό (μη τραυματισμένο) δέρμα δεν χρωματίζεται η κερατοειδής στοιβάδα. Μέσου βαθμού χρωματισμού παρουσιάζουν η κοκκιώδης και η βασική στοιβάδα. Τα προσαρτήματα του δέρματος, τα αγγειακά τοιχώματα, οι μύες των τριχών και οι ινοβλάστες του δέρματος παρουσιάζουν έντονη χρωματισμό.

50 από τα 410 δείγματα, στα οποία οι ιστοχημικές εξετάσεις γινόταν 6 ως 72 ώρες μετά το θάνατο των πειραματόζωνων, παρατηρήθηκαν μεταβολές της ενζυμικής δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης, των μη ειδικών εστερασών και της ATPάσης, παρόμοιες με αυτές των 360 προθανάτιων τραυμάτων.

Μεταθανάτια τραύματα.

Στα 95 μεταθανάτια τραύματα που εξετάστηκαν συνολικά δεν παρατηρήθηκε ενζυμική δραστηριότητα στην τραυματική περιοχή.

Σε όλα τα πειράματά μας ο χρόνος εμφάνισης και η ένταση της ενζυμικής αντίδρασης δεν εξαρτάται από την ηλικία και το φύλο των πειραματόζωνων.

Πίνακας Α: Χρόνος εμφάνισης, χρόνος μέγιστης ενζυμικής δραστηριότητας και ποσοστό % αρνητικών ενζυματικών αντιδράσεων σε 410 προθανάτια δερματικά τραύματα.

Ένζυμο	Αριθμός εξετασθέντων τραυμάτων	Χρόνος εμφάνισης	Χρόνος μέγιστης ενζυμικής δραστηριότητας	% αρνητικών ενζυμικών αντιδράσεων
Αλκαλική φωσφατάση	300 (73%)	3.5 ± 0.1 h	32 ± 0.2 h	2.0
ΑΤΡάση	200 (49%)	2.0 ± 0.1 h	20 ± 0.2 h	1.5
Μη ειδικές εστεράσες	250 (61%)	1.0 ± 0.1 h	24 ± 0.2 h	1.2

10. SUMMARY

Histochemical investigation of enzymatic activity in rabbit skin wounds for the determination of the wound age.

Two zones may be histologically distinguished around the antemortem wound. A central zone where a decrease in the vitality of the cells of the connective tissue (negative vital reaction) appears in the immediate vicinity of the wound edge (Raekallio 1972, 1980, 1984). This comes as a consequence of the mechanical damage caused by the injury, and the reduction of the blood supply caused by the local destruction of the blood vessels and inflammation. The cells of that area show a progressive loss of enzyme activity 1-4 hours following the injury infliction. All the above are considered as early signs of the forthcoming necrosis in the central zone of the trauma. In the peripheral zone, a significant increase of the enzyme activity is exhibited (positive vital reaction). Both the activity and the quantity of the enzymes increase as shown by quantitative measurements of aminopeptidases and phosphatases (Raekallio 1972, Gallo 1997). This increase comes from the cells in the peripheral zone of the traumatic area, from the plasma outside blood vessels and from the lymphocytes that evade the area. In total all the above are part of the defense system of the body in cases of injury (Raekallio 1972, 1980, Gallo 1997).

The determination of wound age as well as the distinction between antemortem and postmortem wounds, both in human and animals, is one of the most important medico legal problems, up to now (Benz 1994, Raekallio 1972). During wound healing, serious histological and enzyme processes take place, which are visible microscopically and histochemically. Researchers that dealt with human wound age estimation (Benz 1994, Raekallio 1972, 1970, 1980, Berg 1972) have used several histochemical, biochemical, histological and immunohistochemical methods.

The histological methods determine the age of the wound according to the chronological order of appearance of the cellular elements (neutrophili, granulocytes, macrophages, lymphocytes, etc) (Benz 1994, Raekallio 1972, 1984, Perper et al 1980). The histological methods are simple to apply but have the disadvantage of giving clear results 8-16 hours (h) after the infliction of the injury. The histochemical methods defined the wound age according to the changes of enzyme activity in the wound area. The biochemical methods determine the values of histamine and

serotonin and the immunohistochemical methods may also be used to determine the age of the human skin wound (determination of Fibronectin, Tenascin, Collagen type I, III, VI and V) (Dachum et al 1992, Benz 1995, Hausmann et al 1997).

MATERIALS AND METHODS

Treatment of experimental animals

Eighty New Zealand white rabbits, (50 females, 30 males) one to 42 months old were used (figure 1). Incisions 1.0 to 2.0 cm long were inflicted on the skin of rabbits after local anaesthesia. The specimens were taken after euthanasia or under general anaesthesia. A total of 505 specimens of skin wounds were examined, of which 410 were antemortem and 95 were postmortem skin wounds. The post infliction interval ranged from 0.5 h to 144 h (0.5h, 1h, 1.5h, 2h, 2.5h, 3h, 3.5h, 4h, 6h, 12h, 20h, 24h, 32h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h), in the antemortem skin wounds. The postmortem skin wounds were inflicted from 0.5h to 4h (0.5h, 1h, 2h, 3h, 4h) after death. The specimens from the 95 postmortem skin wounds were removed at time intervals ranging from 1h to 32h after postmortem infliction (1h, 2h, 3h, 3.5h, 12h, 20h, 24h, 32h).

The specimens were divided into 3 groups.

The first group contained 360 antemortem skin wounds in which the specimens were removed immediately after the death (or anesthesia) of the experimental animals.

The second group contained 50 antemortem skin wounds in which the specimens were removed from 6h to 72h after the death (or anesthesia) of the experimental animals.

The third group contained specimens from 95 postmortem skin wounds

The specimens were frozen in liquid nitrogen immediately after taking. The specimens were cut in sections of 10 microns in cryostat at -20°C and right after without fixation the histochemical examination was performed (Fujimoto et al 1997, Sony et al 1996). The enzymatic activity of nonspecific esterases, adenosine triphosphatase (ATPase) and alkaline phosphatase was investigated. Additionally each specimen was stained by hematoxylin-eosin to detect the typical morphology of the lesions in the wound area.

The control specimens comprised of tissues from injuries incubated without substrate.

Alkaline phosphatase

A total of 300 antemortem skin wounds were examined. The azo dye coupling method was used for the histochemical determination of alkaline phosphatase activity (Bancroft 1977, Espada et al, 1998). Reagents: sodium α -naphthyl phosphate 10 mg, Tris buffer 0.1M (stock solution), pH 10.0 10 ml, diazonium salt fast red TR 10 mg. The pH of the incubating medium was 9.2. The specimens were incubated at room temperature for 10-60 min, were washed in distilled water, were counterstained in 2 % methyl green solution (chloroform extracted), washed with running tap water and mounted in glycerin jelly. Alkaline phosphatase activity appeared as a reddish-brown stain.

Nonspecific esterases

A total of 250 antemortem skin wounds were examined. The Nachlas and Seligman method modified by Pearse (Raekallio 1972, 1980) was used for the histochemical determination of nonspecific esterases activity. Reagents: sodium α -naphthyl acetate 10 mg, acetone 0.25 ml, phosphate buffer 0.1 M (stock solution), pH 7.4 10 ml and diazonium salt fast blue B salt 50 mg. The specimens were incubated at room temperature for about 5 min, washed in distilled water for 5 min and mounted in glycerin jelly. The nonspecific esterases activity appeared as a reddish-brown stain.

Adenosine triphosphatase (ATPase)

A total number of 200 antemortem skin wounds were examined. The Wachstein and Meisel method modified by Pearse (Bancroft et al 1977) was used for the histochemical determination of ATPase activity. Reagents: ATP disodium salt 2 mg, Tris buffer 0.2 M, pH 7.2 0.4 ml, lead nitrate 2 % 0.1ml, magnesium sulphate 2 % 0.1 ml, distilled water 0.5 ml and 2,4-dinitrophenol 1.5 mg. The specimens were incubated at 37°C, for about 60 min, washed in distilled water, immersed in 1 % ammonium sulfide for 1 min, rinsed under running tap water and were mounted in glycerin jelly. ATPase activity appeared as a brownish-black deposit.

The enzyme activity of alkaline phosphatase, of nonspecific esterases and ATPase was determined in the postmortem skin wounds according the histochemical methods used for the determination of antemortem skin wounds.

RESULTS

Antemortem wounds: A number of 410 antemortem wounds were examined.

Alkaline phosphatase: In normal skin the epidermal layer showed no staining. In the skin appendages, vessel walls and dermal fibroblasts, positive reactions were

remarked. In the vital skin wounds, the increase of alkaline phosphatase activity appeared about 3.5 h after wounding. Maximum enzyme activity was reached for alkaline phosphatase about 32 h after wounding while 2 % of the examined specimens gave a negative result (table 1, figure 2).

Nonspecific esterases: In normal skin there was an intense site of esterases activity between the stratum granulosum and stratum corneum. The root sheaths, the upper bulbs of the active hair follicles and the dermal fibroblasts showed strong reactions. In the vital skin wounds, the increase of nonspecific esterases activity appeared about 1 h after wounding. Maximum enzyme activity was reached for nonspecific esterases about 24 h after wounding while 1.2 % of the examined specimens gave a negative result (table 1, figure 2).

ATPase: In the normal skin, the skin appendages, vessel walls, muscoli arrectores pilorum and dermal fibroblasts, gave positive reactions. A moderate reaction was detectable in the stratum granulosum and stratum basale. In the vital skin wounds, the increase of ATPase activity, appeared about 2 h after wounding. Maximum enzyme activity was reached for ATPase about 20 h after wounding while 1.5 % of the examined specimens gave a negative result (table 1, figure 2).

Fifty sections of the 410 total antemortem skin wounds were sampled for the enzyme histochemical examination 6 h to 72 h after death (or anesthesia), which also exhibited changes of the activity of alkaline phosphatase, nonspecific esterases and ATPase similar to the 360 antemortem skin wounds.

TABLE A: Earliest appearance, maximum enzyme activity and per cent negative enzymatic reactions in 410 antemortem rabbits skin wounds examined .

Enzyme	Examined wounds	Earliest appearance	Maximum enzyme activity	% negative reaction
Alkaline phosphatase	300 (73%)	3.5 ± 0.1 h	32 ± 0.2 h	2.0
ATPase	200 (49%)	2.0 ± 0.1 h	20 ± 0.2 h	1.5
Nonspecific esterases	250 (61%)	1.0 ± 0.1 h	24 ± 0.2 h	1.2

Postmortem wounds: Sections from 95 postmortem wounds were examined and showed no increase in the enzyme activities (table 2).

TABLE B: Number (No) of postmortem skin wounds (p.m.) that were examined histochemically and the enzyme activity (E.A) detected. These wounds were divided into groups according to the time of infliction of the wounds, after death.

Enzyme	Postmortem (p.m) examined wounds											
	0.5h p.m.		1h p.m.		2h p.m.		3h p.m.		4h p.m		Total	
	No	E.A	No	E.A	No	E.A	No	E.A	No.	E.A	No	E.A
Alkaline phosphatase	30	0	25	0	20	0	10	0	10	0	95	0
ATPase	30	0	25	0	20	0	10	0	10	0	95	0
Nonspecific esterases	30	0	25	0	20	0	10	0	10	0	95	0

Our results clearly showed that the intensity and the appearance of enzyme activity did not depend on the sex and the age of rabbits.

DISCUSSION

The enzymatic histochemical methods we applied may greatly contribute to the determination of the age of the animals skin wound. These methods are simple, can be applied to many animal species, without expensive and specific reagents and they give reliable and reproducible results after a minimum of 1 hour post wounding. In our experiments the enzymatic reactions appeared for the alkaline phosphate about 3.5 h, for nonspecific esterases about 1 h and for ATPase about 2 h after wounding. The maximum values for alkaline phosphatase, for nonspecific esterases and for ATPase were achieved in approximately 32 h, 24 h and 20 h after wounding. It is important in practice that the histochemical vital reactions are recognizable several hours (up to 144 h) after wounding. According to others authors (Benz 1994), the approximate time of appearance of enzymatic activity in human skin wounds, was, 1 h for nonspecific esterases, 1-4 h for ATPase and 4-8 h for alkaline phosphatase.

In our experiments the number of antemortem rabbit skin wounds that did not give a positive enzymatic result was very small (2.0 % for alkaline phosphatase, 1.2 % for nonspecific esterases and 1.5 % for ATPase). It should be mentioned that in all negative result cases the experiment was repeated. That caused a positive result of the 34 % of the specimens originally giving a negative result. Other researchers (Benz 1994), claim that in some cases antemortem human skin wounds don't exhibit an increase in the enzymatic activity, as expected. The advantage of the methods we used in our experiments is that the changes of the enzyme activity were reliable up to 72 h after death (Raekallio 1984).

In our experiments no enzymatic reactions were given by the postmortem wounds, for that reason these methods may be used in order to distinguish antemortem and postmortem skin wounds. Though some researchers maintain that there might be a small increase of the nonspecific esterases in postmortem wounds (Benz 1994, Raekallio 1984, Perper 1980).

Some authors accept that young human skin wounds give more pronounced enzymatic reactions because the healing time is shorter (Benz 1994, Raekallio 1984). That was not observed in our experiments in rabbits. Bleeding, caehexia, cold environment and cranial fractures do not delay the inflammatory reactions (Benz 1994, Raekallio 1984, Burg 1972). Some other investigators studied burns using enzymatic histochemistry (Prosperi et al 1982, Cejkova et al 1989, Stal et al 1995).

Because the above methods are basically qualitative, it is important to use the appropriate method so that the coloring is as intense as possible and the result easily detectable (Lamb 1998). Comparison of our results given by the azo dye coupling and naphthol AS-BI methods, in the case of alkaline phosphatase, confirms the above statement. In a 3.5 h time interval after wound infliction the first method gave a clearly positive result, the second one gave difficult to distinguish results. A similar result was observed by the comparison of Nachlas-Seligman and Pearse methods for the nonspecific esterases. That may be attributed to the slow hydrolysis rate of naphthols AS-BI and AS. Therefore, sites with low enzymatic activity, may give non-clearly positive results. In our experimental the renewal of the diazonium salts and the buffers used every six months was essential as it had an immediate result on the intensity of the coloring of the enzyme reaction (Perper 1980, Bancroft 1977).

The above methods of enzymatic histochemistry are considered to be reliable and their contribution to the medicolegal wound age determination and differentiation

between antemortem and postmortem skin wounds in combination with the rest of the necropsy findings is crucial.

LEGENDS FOR FIGURES

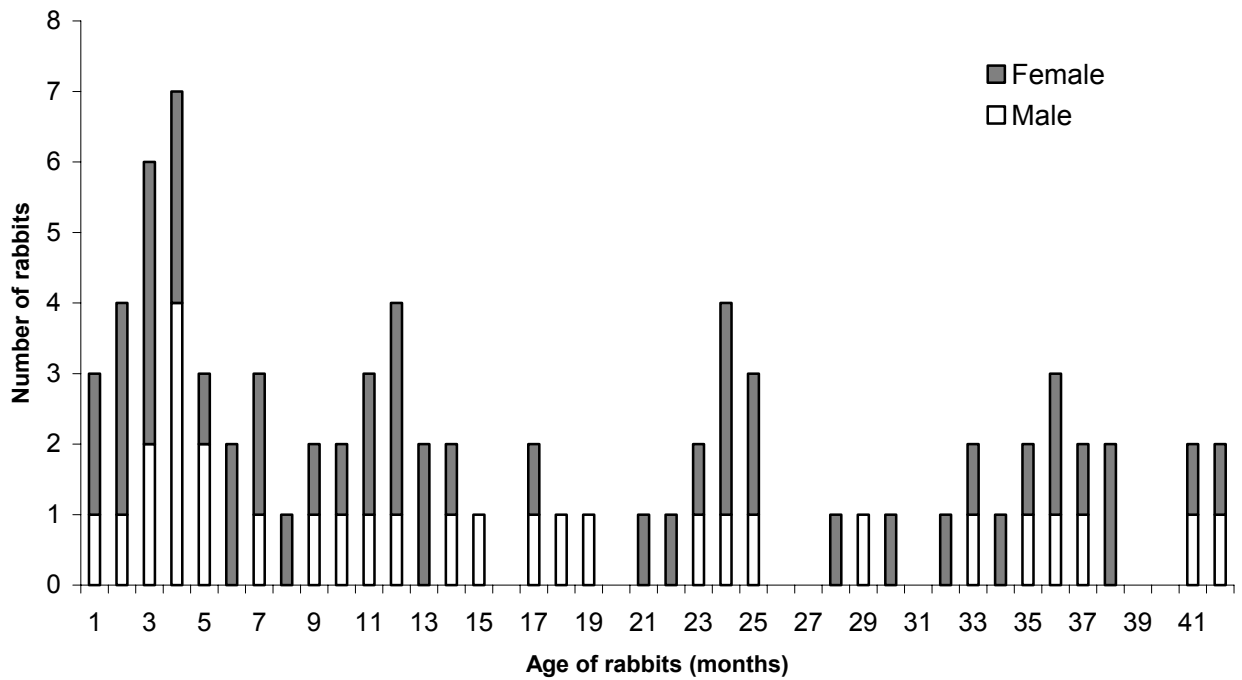


Figure A. Distribution of age and sex in 80 rabbits.

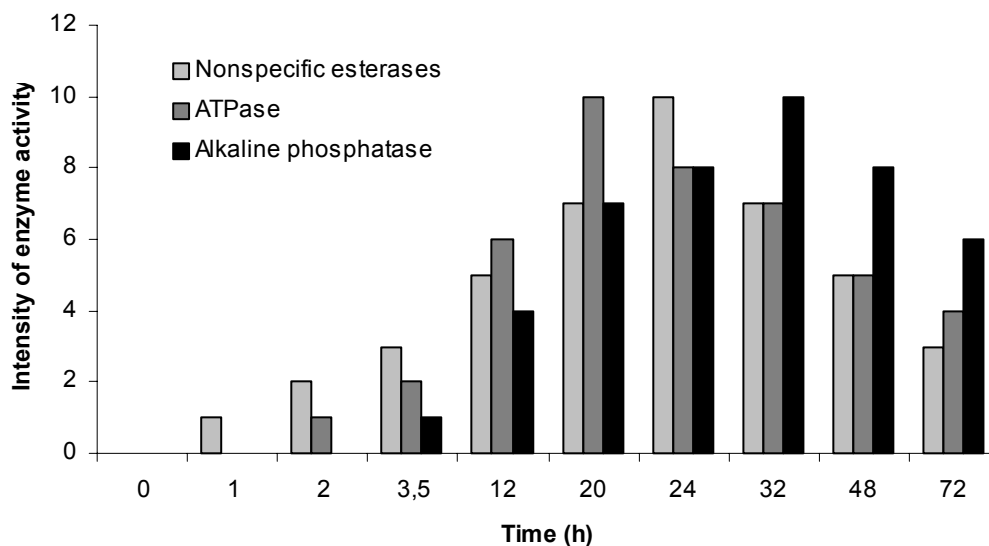


Figure B. The time of appearance and of maximum intensity of enzyme reactions in antemortem rabbits skin wounds.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Αγιουτάντης Γ., 1980, « Ιατροδικαστικά Θέματα», Παρισιάνος, 2^η Έκδοση, Αθήνα, 227-243.

Agren M.S., Taplin C.J., Woessner J.F., 1992, "Collagenase in wound healing: effect of wound age and type", *J Invest Dermat*, 99, 709-14.

Agren M.S., 1994, "Gelatinase activity during wound healing", *Br J of Dermatol*, 131, 634-40.

Aksu M.N., Gobetti J.P., 1996, «The Past and Present Legal Weight of Bite Marks as Evidence», *Am. J. of For. Sci. and Path.*, 17, 2:136-40.

Anderson C.R., 1992, «Animal bites. Guidelines to current management.», *Postgrad Medicine*, 92, 1: 139-46, 149.

Aslam A., Dickinson J.C., 1999, «Dogs Bite Bones too a Tale of Fractures in Adult Hands.», *Injury Int. J.*, 30, 374-76.

Avner J.R., Baker M.D., 1991, «Dog Bites in Children.», *Pediatrics*, 88:55-7.

Bancroft J. D., 1967, "An introduction to Histochemical Techniques", 177-196 , Churchill Livingstone , London.

Bancroft J. D., Stevens A., 1977, "Theory and practice of histological and histochemical techniques", 65-74, 287-298, Churchill Livingstone, London and New York.

Bean J. K., Verwoerd H. L., 1995, " Injury –and age- linked differences in wound healing", *Acta Otolaryngol*, 115, 317-21.

Beaver B. V., 1994, «Owners Complaints about Canine Behavior.», *JAVMA*, 204:350-51.

Bell L., Williams L., 1979, " Histochemical demonstration of alkaline phosphatase in human large intestine", *Histochemistry*, 60, 85-89.

Betz P., 1999, «Histological parameters for the age estimation of Human», S Rechtsmedizin, 9, 163-69.

Betz P., Nerlich A., Tubel J., Wiest I., 1997, "Detection of cell death in human skin wounds of various ages by an in situ end labeling of nuclear DNA fragments", », Int. J. Leg. Med., 110 240-43.

Betz, P., 1995 (a), "Immunohistochemical parameters for the age estimation of human skin wounds". Am J Foren Med Path 16(3), 203-9.

Betz P., Tubel J., Eisenmenger W., 1995 (b), "Immunohistochemical analysis of markers for different macrophage phenotypes and their use for a forensic wounds age estimation", Int. J. Leg. Med., 107, 197-200.

Betz P., 1994, «Histological and Enzyme Histochemical Parameters for the Age Estimation of Human Skin Wounds», Int. J. Leg. Med., 107:60-8.

Betz P., Nerlich A., Wilske J., Penning R., Eisenmenger W., 1993 (a), " The immunohistochemical analysis of fibronectin, collagen type III and laminin in putrefied skin", Foren Sci Int, 61 35-42.

Betz P., Nerlich A., Wilske J., Penning R., Eisenmenger W., 1993 (b), " Localization of tenascin in human skin wounds: an immunohistochemical study", Int. J. Leg. Med., 105:352-58.

Betz P., Nerlich A., Wilske J., Penning R., Eisenmenger W., 1993 (c), " The time dependent expression of keratins 5 and 13, during the reepithelialization of human skin wounds", Int. J. Leg. Med., 105:229-32.

Betz P., Nerlich A., Wilske J., Tubel J., Penning R., Eisenmenger W., 1993 (d), " Immunohistochemical localization of collagen type I and VI in human skin wounds", Int. J. Leg. Med., 106:31-34..

Betz P., Nerlich A., Wilske J., 1993 (e), "Analysis of the immunohistochemical localization of collagen type III and V in human skin wounds", Int. J. Leg. Med., 105:329-32.

Betz P., Nerlich A., Wilske J., 1992 (a), "The time-dependent appearance of myofibroblasts in the granulation tissue of human skin wounds", *Int. J. Leg. Med.*, 105:99-103.

Betz P., Nerlich A., Wilske J., Penning R., Eisenmenger W., 1992 (b), "Immunohistochemical localization of fibronectin as a tool for the age determination of human skin wounds", *Int. J. Leg. Med.* 105, 21-26.

Betz P., Nerlich A., Wilske J., Tubel J., Wiest I., Penning R., Eisenmenger W., 1992 (c), "Time-dependent pericellular expression of collagen type IV, laminin and heparin sulfate proteoglycan in myofibroblasts", *Int. J. Leg. Med.* 105, 169-72.

Betz P., Nerlich A., Wilske J., Tubel J., Wiest I., Penning R., Eisenmenger W., 1992 (d), "Time-dependent rearrangement of the epithelial basement membrane in human skin wounds: immunohistochemical localization of collagen IV and VII", *Int. J. Leg. Med.* 105, 93-97.

Betz P., Penning R., Eisenmenger W., 1991, "Lipophages of the skin as an additional parameter for the timing of the skin wounds", *S Rechtsmedizin* 1:139-42.

Berg S., 1972 "The timing of skin wounds", *Z Rechtsmed* 70, 121-35.

Brandenburg M. A., Quick G., 2000, «Hand Injuries. Fractures, Dislocations and Dog Bites», *Consultant*, 40,2:285-96.

Bucher F., Hofer R., 1993, "Histological and enzyme histochemical changes in the kidney of male bullhead", *J. of Fish Biol.*, 403-9.

Buffoni F., Banchelli G., Cambi S., 1993, "Skin wound healing, some biochemical parameters in guinea pig", *J Pharm Pharmacol*, 45,780-90.

Burt J. D., Burns A. J., Muzaffar A. R., Hobart P. C., 2000, «Total Soft-Tissue Reconstruction of the Middle and Lower Face.», *Plas. Recon. Surg.*, 105, 7:2440-47.

Calkins C. M., Bensard D., Partrick D. A., 2001, «Life-Threatening Dog Attacks: A Devastating Combination of Penetrating and Blunt Injuries», *J. of Pediatric Sur.*, 36, 8:1115-1117.

Cassani Martinez C., Morales S. M., 2001, «Animal Caused Accident in Childhood. Results from La Fe Hospital in Valencia.», *Rev. Esp. Ped.*, 56:501-7.

Castellucci M., Classen L. I., Kaufmann P., 1991, "The human placenta : a model for tenascin expression", *Biomaterials*, 12, 865-71.

Cejkova J., Lojda Z., Vaheri A., 1989, " Histochemical study of alkali-burned in rabbit anterior eye segment ", *Histochemistry*, 92, 441-48.

Chang F.Y. et al., 1997, « Dig Bite Incidence in the City of Pittsburgh», *Am. J. of Public Health*, 88:10:1703-5.

Clarence M.Fraser, 1998, «The Merck veterinary Manual], Rahway U.S.A, 634-637.

Clark M.A. et al, 1991, «Fatal and Near-Fatal Animal Bite Injuries», *Journal of Forensic Sciences*, 36,4:1257-61.

Classen H., Kampen W.U, 1996, " Localization of collagen and alkaline phosphatase activity during mineralization and ossification of human first rib cartilage", *Histochem Cell Biol*, 105, 213-19.

Cluroe A.D., 1995, «Superficial Soft-Tissue Injury», *Am. J. of For. Sci. and Path.*, 16, 2:142-6.

Cohle S.D.,1990, «Fatal Big Cat Attacks»,*The American Journal of forensic Medicine and Pathology*, 11:3:208-212.

Coodley E.L., 1970, "Diagnostic Enzymology", Lea and Febiger, Philadelphia, 9-13,140-43.

Culling C. F. A., 1974, "Handbook of histopathological and histochemical techniques", 315-339, Butterwords, London and Boston.

Cummings J. M., Boullier J. A., 2000, «Scrotal Dog Bites», *The J. of Urol.*, 164:57-8.

Dachum W, Jiazhen Z., 1992, "Localization and quantification of the nonspecific esterase in injured skin for the timing of wounds", *Forensic Sci Int* 53, 203-13.

Δελίδης Γ., 1989, “Πρακτική τεχνική ιστολογίας, ιστοχημείας, ανοσοιστοχημείας”, Αθήνα, 11-13, 22-27.

Derssler J., Premysel S., Muller E., 2000, “Expression of adhesion molecules in skin wounds: diagnostic value in legal medicine”, *For. Sci. Int.*, 113, 173-76.

Derssler J., Bachmann L., Koch R., Muller E., 1999, “Estimation of wound age VCAM-1 in human skin”, *Int. J. Legal Med.* 112, 159-62.

Derssler J., Bachmann L., Koch R., Muller E., 1998, “Enhanced expression of selectins in human skin wounds”, *Int J Legal Med*, 112, 39-44.

Derssler J., Bachmann L., Kasper M., Hauck J.G., Muller E., 1997, “Time dependence of the expression of ICAM-1 in skin wounds”, *Int. J. Legal Med.* 110, 299-304.

Διαμαντίδης Γ., 1990, “Εισαγωγή στη Βιοχημεία”, University Studio Press, Θεσσαλονίκη, 33-63.

Dire D.J., Hogan D.E., 1994, «A Prospective Evaluation of Risk Factors for Infection from Dog-Bite Wounds», *Acad. Emergency Med.*, 1:258-66.

Egger G., Spindel S., Porta S., 1988, “Characteristics of ingress and life span of neutrophil at a site of acute inflammation determined with the sephadex model in rats”, *Exp Pathol*, 35: 209-11.

Eisenmenger W., Nerlich A., Gluck G., 1988, “The significance of collagen in determining the age of a wound”, *J. Rechtsmed*, 100, 79-100.

Emily P.P., Harvey C.E., 1993, «Small Animal Dentistry», Mosby, St. Louis, 29 20.32, 43-5.

Eriksson A., 1991, «Injuries Caused by Animals», *Injury*, 22:295-8.

Espada J., Horobin R. W., Stockert J., 1998, “Fluorescent cytochemistry of phosphatases using an azodye method”, *Histochem Cell Biol* 110, 482-7.

Espinosa V., Galleguillos M., Mancilla M., Garrido J., 1996, “ATP-diphosphohydrolase activity in rat tissue”, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 39, 905-15.

Ettinger S. J., 1995, «Veterinary Internal Medicine, Diseases of the Dog and Cat», 4th Ed., Saunders W.B. Company, Philadelphia, 1097-1110.

Fourie L., 1995, «Fracture of the Maxilla Following Dog Bite to the Face.», *Injury*, 26:61-2.

Fujimoto K., Noda T., 1997, "A simple and reliable quick-freezing", *Histochem cell Biol* 107, 81-4.

Fouces V., Torrella J.R., Viscor G., 1993, "A histochemical ATPase method for the determination of the muscle capillary network", *J Histochem Cytochem*, 41,283-89.

Gahan P.B., 1984," *Plant Histochemistry and Cytochemistry*", Academic Press, London, New York, 51-99, 190-225.

Gallo R., 1997, "Endothelial cell alkaline phosphatase activity during wound repair". *J Int. Derm Inc* 22, 597-603.

Gartner L., Hiatt J., Siebel W., 1977, "Histochemical localization of ATPase in the developing first molar of the albino mouse", *Histochemistry*, 52, 17-24.

Gershman K.A., et al, 1994, «Which Dogs Bite? A Study of Risk Factors», *Pediatrics*, 93: 913-7.

Gerstein D. A., Philips T. J., Rogers G. S., 1993, "Wound healing and aging", *Dermat Clin*, 11, 749-57.

Goodson W. H., Hunt T. K., 1979, "Wound healing and aging", *J Invest Dermatol*, 73, 88-91.

Grant I., Belcher H.J., 2000, «Injuries to the Hand from Dog Bites», *J. of Hand Surg.*, 25, 1:26-28.

Greigo R.D., Rosen T., Orengo I.F., 1995, "Dog, Cat and Human Bites: a review", *J.of Amer. Acad. Of Derm.*, 33:1019-29.

Grellner W., Dimmeler S., Madea B., 1998, "Immunohistochemical detection of fibronectin in postmortem incised wounds", *For. Science Int.*, 97, 109-116.

Gu X. M., Terenghi G., Polak J.M.,1995, "Regeneration pattern of blood vessels in cultured keratinocyte grafts assessed by confocal laser scanning microscopy" Br J Dermat, 132, 376-83.

Guy N.C., Luesher U.A., Dohoo S.E., Spangler E., Miller J.B, (a), 2001, «Demographic and Aggressive Characteristics of Dogs in a Veterinary Caseload.», Applied Animal Behavior Science, 74:15-28.

Guy N.C., Luesher U.A., Miller J.B, (b), 2001, «A Case Series of Biting Dogs: Characteristics of the Dogs, their Behavior and their Victims.», Applied Animal Behavior Science, 74:43-57.

Harvey C.E., 1993, «Canine Teeth of Dogs», JAVMA, 202:1789-90.

Hattaway D., 1997, «Dogs and Insurance», JAVMA, 210(8):1134-36.

Hausmann R., Nerlich A., Benz P., 1998, "The time related expression of p53 protein in human skin wounds. Immunohistochemical Analysis", Int J Legal Med 111(4), 169-72.

Hausmann R., Kaiser A., Lang C., Betz P., 1999, "A quantitative immunohistochemical study on the time-dependent course of acute inflammatory cellular response to human brain injury" Int J Legal Med, 112, 227-32.

Ηλιάκης Κ., 1962, « Ιατροδικαστική», Σπυρόπουλος, 508-509.

Hollinshead M., Sanderson J., Vaux D. J., 1998, "Vector alkaline phosphatase substrate blue III. One substrate for histochemistry and high resolution fluorescence imagine", Histochemical Journal, 30, 577-81.

Holt D. R., Regan M. C., 1992, " Effect of wound healing in healthy human beings", Surgery, 112, 293-98.

Hunthausen W., 1997, «Effects of Aggressive Behavior on Canine Welfare», JAVMA, 210, 8:1134-36.

Joshua P.A., 1980, « Microscopic Diagnosis in Forensic Pathology», Charter 1, Charles Thomas,3-34 .

Kampmann H., Garbe G., 1980, "Investigation on the morphology and biochemistry of wound healing after injury", *Rechtsmed*, 84, 291-99.

Κατσαούνης Ν., 1980, «Προβατοτροφία», Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κυριακίδη Θεσσαλονίκη, 37-45, 107-30.

Kawaguchi Y., Matsui H., Tsuji H., 1996, "Back muscle injury after posterior lumbar spine surgery. Histologic and enzymatic analysis", *Spine*, 8, 941-44.

Kelman I., Bruce A., 1990, "Models of wound healing", *J of Trauma*, 30, 149-55.

King, Dodd, Newson, Roth, 1989, «The Necropsy Book», New York State College of Veterinary Medicine, Cornell University Publication, Ithaca, New York, 2-8, 56.

Knight B., 1983, "The Coroner's Autopsy", Churchill Livingstone, London, New York, 50-55, 288-90.

Komminoth P., Zuber C., 1999, "Histochemistry and cell biology: what's in a name?", *Histochem Cell Biol*, 112, 405-15.

Kondo T., Ohshima T., 1996, "The dynamics of inflammatory cytokines in the healing process of mouse skin wounds", *Int J Legal Med* 108, 231-36.

Kondo T., Ohshima T., Eisenmenger W., 1999, "Immunohistochemical and morphometrical study on the temporal expression of interleukin 1 α , in human skin wounds, for forensic wound age determination", *Int J Legal Med* ,112, 249-52.

Kramer R.W., Frey A.J., 1996, «What is your Diagnosis? Bite Wound Communication with the Oropharynx», *JAVMA*, 15:200-4.

Kramer F., Mencke N., 2001, « Flea Biology and Control », Springer, London, New York, Berlin, 17-29, 149-61.

Kucan J.O., Baack B.R., Demarest G., Smoot E.G., 1989, «Mauling by Pit Bull Terries», *J. Trauma*, 29:517-20.

Lamb J.E., Browne M., 1998, "Alkaline Phosphate activity measurement in UK by AMP buffered methods", *Ann Clin Biochem* 35, 120-27.

Langley J., 1992, «Incidence of Dog Bites in New Zealand», *New Z. Med. J.* 105:33-5.

Langley R.L., 1994, «Fatal Animal Attacks in North Carolina Over an 18-Year Period», 15,2:160-67.

Lauridson J.R., Myers L., 1993, «Evaluation of Fatal Dog Bites: The View of the Medical Examiner and Animal Behaviorist», *J. Foren. Sci.*, 38,3:726-31.

Lee K.A., 1992, «Death Due to Superficial Soft Injuries», *Am. J. of For. Sci. and Path.*, 13:179-85.

Leyhausen P., 1979, «Cat Behavior», New York, Garland STM, 20-27,110-112.

Linklater K.A., Smith M.C., 1996,«Diseases and Disorders of the Sheep and Goat», Wolfe-Mosby, 176-7.

Liu C., Sanghivi R., Burnell J.M., Howard G.A., 1987, “Simultaneous demonstration of bone alkaline and acid phosphatase activities in plastic embedded sections and differential inhibition of the activities”, *Histochemistry*, 86, 556-65.

Mant K.A., 1973, “Modern trends in Forensic Medicine-3”, Butterworths, London, 64-92.

Matsubara S., Yamada T., Minakami H., Sato I., 1999, “Polymorphonuclear leukocytes in the fetal membranes are activated in pathiens with pretherm delivery: Ultrastructural and enzyme histochemical evidence”, *Placenta*, 20, 185-88.

Matsubara S., Takizawa T., Sato I., 2000, “Enzyme histochemistry on human trophoblasts: the effect of fixation delay on enzyme activity”, *Histochem. Cell Biol.*,113, 287-92.

Mason A., Zabel D.,Manders E. K., 2000, «Occult Craniocerebral Injuries from Dog Bites in Young Children», *Ann. Plastic Surg.*, 45,5:531-34.

Meijer A.E., Van der Loos C., 1980, "Demonstration of alkaline and acid phosphatase with the histochemical substrate Naphthol AS-BI phosphate", *Histochemistry*, 67, 23-29.

Meijer A.E., Benson D., Scholte H., 1977, "The influence of freezing and freeze-drying of tissue specimens on enzyme activity", *Histochemistry*, 51, 297-303.

Miyaki K., Murakami K., Segami N., 1994, "Histological and histochemical studies on the articular cartilage after experimental discectomy of the temporomandibular joint in rabbit", *J Oral Rehabil*, 21, 299-310.

Mizutani Y., Hirai K., Toda N., 1995, "Fine localization of low and high calcium depended ATPase activities in the rat sciatic nerve", *Brain Research*, 693, 95-100.

Μιχαήλ Σ., 1975, «Συγκριτική Ανατομική των Κατοικίδιων Θηλαστικών», Πανεπιστημιακές Εκδόσεις, Θεσσαλονίκη, 247-312, 502-7.

Μιχαλοδημητράκης Ε., 1997, «Ιατροδικαστική Διερεύνηση του Θανάτου», Ιατρικές Εκδόσεις, Π.Χ. Πασχαλίδης, Αθήνα, 14-27, 41-43, 87-117.

Mottonen M., Nuttila M., 1977, «Postmortem Injury Caused by Domestic Animals», *Forensic Medicine*, W. B. Saunders Co. Philadelphia, 2:1096-1098.

Neilson J. C., Eckstein R. A., Hart B. L., 1997, «Effects of Castration on Problem Behaviors in Male Dogs with Reference to Age and Duration of Behavior.» *JAVMA*, 211, 2:180-82.

Oehmichen M., Lagodka T., Croprling A., 1997, "RNA and DNA synthesis of epidermal basal cells after wounding. Comparison of vital and postmortem investigations", *Exp Toxicol Pathol*, 49, 233-37.

Ohshima T., Sato Y., 1998, "Time-dependent expression of interleukin-10 (IL-10) mRNA during the early phase of skin wound healing as a possible indicator of wound vitality", *Int J Legal Med*, 111, 251-55.

Ohshima T., 2000, "Forensic wound examination", *Foren Scie Int*, 113, 153-64.

Patel F., 1994, «Artifact in Forensic Medicine. Postmortem Rodent

Activity», *J. Foren. Sci.*, 39:257-60.

Patronek G. J., Glickman L. T., Beck A. M., 1996, «Risk Factors for Relinquishment of Dogs to an Animal Shelter», *JAVMA*, 209 ,3:572-81.

Perper A.J., Wecht C., 1980, "Microscopic diagnosis in forensic pathology", Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, USA, 3-34.

Piattelli A., Piattelli M., Scarano A., 1997, "Simultaneous demonstration of alkaline and acid phosphatase activity in bone, at bone-implant interfaces", *Biomaterials*, 18, 545-59.

Podberscek A.L, Serpell J.A., 1997, «Environmental Influences on the Expression of Aggressive Behavior in English Cocker Spaniels», *Appl. Animal Behav. Sci.*,215-27.

Polson C. J., 1973, «The essentials of Forensic Medicine», 3rd Ed., Pergaman Press, 110-117.

Polson C. J., Gee D.J,1984, «The essentials of Forensic Medicine», Pergamon Press, Oxford, 97-101.

Press C. M., Dannevig B. H., Landsverk T., 1994, "Immune and enzyme histochemical phenotypes of lymphoid and nonlymphoid cells within the spleen and head kidney of Atlantic salmon", *Fish and Shellfish Immunology*, 79-93.

Presutti R. J., 2001, «Prevention and Treatment of Dog Bites», *American Family Physician*, 63, 8:1567-72.

Prosperi E., Raap A.K., 1982, "Histochemical model studies of enzymes activity after thermal damage", *Histochemistry*, 75, 387-97.

Pugnetti G., 1990, " Dogs ", Macdonald & Co. Publishers, London, 71-79 & 95-98.

Raekallio, J., 1963, "Histochemical distinction between antemortem and postmortem skin wounds ", *J of Forensic Sci*, 9,107-117.

Raekallio, J., 1970, "Enzymes histochemically demonstrable in the earliest phase of wound healing", *Nature* 118(15), 234-5.

Raekallio J., 1972, «Determination of the Age of Wounds by Histochemical and Biochemical methods», *Forensic Sci.*, 1:3-16.

Raekallio J., Nieminen L., 1979, "On the enzymatic response to injury and its mediators", *Med Biol*, 57, 211-19.

Raekallio J., 1980, «Estimation of time in Forensic Biology and Pathology», *Am. J. of For. Med. and Pathol.*, 1(3):213-8.

Raekallio, J., 1984, "Timing of wounds", *Ann Acad Med Singapore* 13(1), 77-84.

Reick D., 1997, «Dog Bite Prevention from Animal Control's Perspective.», *JAVMA*, 210,8:1145-6.

Reisner I.L, 1997, «Assessment, Management and Prognosis of Canine Dominance-Related Aggression», *Vet. Clin. N. Amer.*, 27(3):479-95.

Reisner I.L, Houpt K.A., 1994, «Risk Factors for Behavior-Related Euthanasia among Dominant- Aggressive Dogs», *JAVMA*, 205(6), 855-63.

Robinson W.A., 1992, «Human Bites of the Hand», *Plast. Reconstr. Surg.*, 90, 2:336-7.

Rossi M.L., Shahrom A. V., Chapman R. C., 1994, «Postmortem Injuries by Indoor Pets», *The Am. J. of For. Med. and Pathol.*, 15,2:105-9.

Rothschild M. A., Schneider V., 1997, «On the Temporal Onset of Postmortem Animal Scavenging. "Motivation of the Animal», *Foren. Sci. Int.*, 89:57-64.

Rubin A., Waxman S., 1979, "The Leukemia Cell", CRC press, Florida, USA, 9-23.

Sacks J.J.,(a), 1996, «Fatal Dog Attacks», *Pediatrics*, 97:891-5.

Sacks J.J., (b), 1996, «Dog Bites. How Big a Problem», *Inj. Prev.*, 2:52-4.

Sato Y., Ohshima T., 2000, "The expression of mRNA by proinflammatory cytokines during skin wound healing : a preliminary study for forensic wound age estimation", *Int J Legal Med*, 113, 140-45.

Saito T., Ide C., 1980, " Adenosine triphosphatase activity of cutaneous nerve fibers", *Histochemistry*, 65, 83-92.

Scott A., Harrison M., Glick P., 1985, "Comparison of fetal, newborn, and adult wound healing by histological and enzyme histochemical determinations", *J Pediatric Surg*, 20, 315-19.

Shuman L. H., Hirsh H. L., 2000, «Animal Bites», *Trauma*, 41, 5:65-90.

Σπαής Α., 1975, «Γενική και Προπαιδευτική Παθολογία των Ζώων», Πανεπιστημιακές Εκδόσεις, Θεσσαλονίκη.]

Spitz W., Fisher R., 1980, « Medicolegal Investigation of Death», 2nd Ed., Charles C. Thomas, Springfield, U.S.A., 157-8, 250-2.

Song J.Y, Tingchelaar W., Schellens J., 1996, " Ultrastructural localization of activity of phosphatase by low temperature incubation of unfixed cryostat sections", *Histochem Cell Biol*, 106, 351-55.

Soni N. K., Patel M.R., 1981, "Alkaline phosphatase, total protein and hexosamine change in serum and wound fluids", *Acta Vet Hungar*, 26, 263-70.

Sony J.Y., Tigchelaar W., 1996, "Ultrastructure localization of activity of phosphatase by low temperature incubation of unfixed cryostat section", *Histochem Cell Biol* 106, 351-5.

Stal P., Erickson P.O., Thornell L.E., 1995, "Musclespecific enzyme activity patterns of the capillary bed of human oro-facial, masticatory and limb muscles", *Histochem Cell Biol* 104, 47-54.

Stevens A., Lowe J., 1993, " Histology", Mosby, 5-7, 348-63.

Straton E.C., 1992, «Dangerous Dogs», *Vet. Rec*, 130, 10:212-3.

Stryer L., 1994, «Βιοχημεία», Παν/κες Εκδόσεις Κρήτης, 1, 183-97.

Sudarshan M.K., 1995, «An Epidemiological Study of Rabies in Bangalore City», J. of the Indian Med. Assoc., 93:14-6.

Sugimura K., Mizutani A., 1980, “ Histochemical studies of alkaline phosphatase activity in the synapses of rat brain”, Histochemistry, 61, 123-29.

Sundquist K.T, Marks S.C., 1999, “Carbonic anhydrase II and H- ATPase in osteoclasts of four osteoporotic mutations in the rat”, Histochem Cell Biol, 111, 55-60.

Talan D.A., et al, 1999, «Bacteriologic Analysis of Infected Dog and Cat Bites», The New England J. of Med., 340:2:85-92.

Tedeschi C.G., Eckert W.B., 1977, “Forensic Medicine – Mechanical Trauma”, W B Saunders, London, 259-61.

Thomas H.F.,Voss S., 1991, «A survey of dog bites in Salisbury», Journal society Health, 111:224-5.

Τσαβαρής Ν. , 1977, “Ιστοενζυμολογική μελέτη του καρκινώματος του μαστού”, 13-21, 30-47,52-53, Παν/κες εκδόσεις , Αθήνα.

Τσαγκάρης Θ., 1997, «Εγχειρίδιο Νεκροψιών και Νεκροτομών στα Θηλαστικά Ζώα και στα Πτηνά», Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη, 11-14, 59-63, 71-74.

Tsokos M., Koops E., Puschel K., 2000, «Postmortem Dog Bites. Differential Diagnostic Aspects», Archiv fur Kriminologie, 206, 30-7.

Tsokos M., Schulz F., 1999, «Indoor Postmortem Animal Interference by Carnivores and Rodents», Int. J. Legal Med., 112:115-19.

Tribulova N., Ravingerova T., Volkonova K., 1996, “Histochemical and ultrastructural study in resistance of diabetic rat hearts to Ca overload-related injury” , Diabetic Reas. And Clin. Prac., 113-22.

Τσιρογιάννης Ε., Τσαγκάρης Θ., 1982, “Γενική Παθολογική Ανατομική”, Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη, 404-16.

Tuggle D.W., Taylor D. V., Stevens R.J., 1993, «Dog Bites in Children.», J. Pediatr. Surg., 28:912.

Vacca L., 1985, “ Laboratory Manual of Histochemistry”, Raven Press, New York, 62-64, 90-108, 482-534.

Wakili N., Gusek G. C., 2001, «Eyelid and Facial Injuries Due to Dog Bites», Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde, 218:229-31.

Wass A. R., Goodacre S., 1996, «Dog Bites Causing Upper-limb Fractures in Children.» Injury, 27, 6:433-35.

Weiss H.B., 1998, «Incidence of Dog Bite Injuries. Treated in Emergency Departments», JAMA, 279:1:51-3.

Whittaker D K , 1989, «Forensic Dentistry», Wolfe Medical Publication, 108-19.

Wright J.C., 1985, «Severe Attacks by Dogs: Characteristics of the Dogs, the Victims, and Attack Settings», Public Health Reports, 100,1:55-61.

Χατζημηνάογλου Ι., 1999, «Οι Ελληνικές Φυλές των Προβάτων», Γεωργία και Κτηνοτροφία, 10: 21-35.

Yoshiaki I., Izumi T., Nakatani Y., 1997, “ Alkaline phosphatase reactivity in rabbit airway epithelium: a potentially useful marker for airway basal cells”, Histochem Cell Biol, 104,191-98.

Zabel L. T., Schaller H. E., 2000, «Porphyromonas cangingivalis. The Typical Anaerobe of Dog Bite Wound Infection.», ACTRA, 30, 2:69-71.

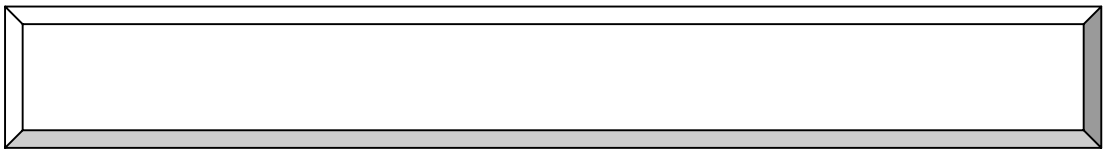
Zinchuk V. S., Okada T., Kobayashi T., 1999, “ATPase activity in the rat cardiac muscle: histochemical localization and biochemical characteristics”, Cell Tissue Res., 298, 499-509.

Zugibe F.T., 1970, “ Diagnostic Histochemistry”, Mosby, 12-36,93-168.

Ζυγογιάννης Δ., Κατσαούνης Ν., 1994, «Αιγοτροφία», Σύγχρονη Παιδεία, Β, 32-41.

Ζωιόπουλος Π. , Παπαθεοδώρου Α., 2000, «Βιολογική Κτηνοτροφία», Αγρότυπος, Αθήνα, 63-75.

Ψαρουδάκης Κ., Μιχαλοδημητράκης Ε., 1999, «Εισαγωγή στην Κτηνιατροδικαστική», Εκδόσεις ΕΛΓΑ, Αθήνα, 7-10, 27-29.



ΕΙΚ.1: Προβατοειδή (αρνιά) νεκρά από δήξεις σκύλων. Πτώματα πριν την νεκροτομή. Διακρίνονται ελάχιστα ίχνη των δηκτικών κακώσεων.

ΕΙΚ. 2: Τα προβατοειδή της ΕΙΚ.1 μετά από εκδορά μεγάλου τμήματος της δεξιάς πλευράς του σώματος. Διακρίνονται δηκτικές κακώσεις στις περιοχές του θώρακα και της κοιλίας.

ΕΙΚ.3: Προβατοειδή (αρνιά) νεκρά από δήξεις σκύλων. Πτώματα πριν την νεκροτομή. Διακρίνονται ελάχιστα ίχνη των δηκτικών κακώσεων.

ΕΙΚ. 4: Τα προβατοειδή της ΕΙΚ.3 μετά από εκδορά της αριστερής πλευράς του σώματος. Διακρίνονται δηκτικές κακώσεις στον τράχηλο (στο πάνω ζώο) και στις περιοχές του τραχήλου, του θώρακα, της κοιλίας και των γλουτών (στο κάτω ζώο).

ΕΙΚ.5: Δηκτικές κακώσεις στην περιοχή του θώρακα προβατοειδούς (αρνιού). Διακρίνεται και η διάτρηση του τοιχώματος της θωρακικής και κοιλιακής κοιλότητας.

ΕΙΚ.6: Νεκροτομή του προβατοειδούς της ΕΙΚ.5. Διακρίνεται μεγάλη αιμορραγική συλλογή (πήγματα αίματος) στην κοιλιακή και θωρακική κοιλότητα.

ΕΙΚ.7: Δηκτικές κακώσεις στην περιοχή των γλουτών, των μηρών, της κοιλίας και του πρόσθιου άκρου, προβατοειδούς.

ΕΙΚ.8: Δηκτικές κακώσεις στην περιοχή του τραχήλου προβατοειδούς.

ΕΙΚ.9: Δηκτικές κακώσεις στην περιοχή του τραχήλου και του προσώπου προβατοειδούς.

ΕΙΚ.10: Δηκτικές κακώσεις στην περιοχή του τραχήλου, της ωμοπλάτης και του πρόσθιου άκρου, προβατοειδούς.

ΕΙΚ.11: Δηκτικές κακώσεις στην περιοχή των γλουτών και των μηρών, προβατοειδούς.

ΕΙΚ.12: Προβατοειδή (αρνιά) ζωντανά που έχουν υποστεί δηκτικές κακώσεις από σκύλους.

ΕΙΚ.13: Δηκτικές κακώσεις στο πρόσωπο (περιοχή μασητήρων), ζωντανού προβατοειδούς (αρνιού).

ΕΙΚ.14: Δηκτικές κακώσεις στην περιοχή του προσώπου (μασητήρες) και του λαιμού ζωντανού προβατοειδούς (αρνιού).

ΕΙΚ.15: Δηκτικές κακώσεις στην περιοχή του λαιμού και του οπίσθιου άκρου ζωντανού προβατοειδούς (αρνιού).

ΕΙΚ.16: Δηκτικές κακώσεις στην περιοχή του λαιμού ζωντανού προβατοειδούς. Συνοδεύεται από εμφανές οίδημα των υποδόριων ιστών της περιοχής.

EIK.17: Σχηματική παράσταση του οδοντικού τύπου του σκύλου.

EIK.18: Σχηματική παράσταση του δερματικού τραύματος.

EPIDERMIS = Επιδερμίδα, CHORIO = Χόριο, HYPODERMIS =Υποδόριος ιστός,
P.Z. = Περιφερική ζώνη του τραύματος, C.Z. = Κεντρική ζώνη του τραύματος.

EIK.19: Μη ειδικές εστεράσες. Χρονικό διάστημα από τον τραυματισμό 1\2 ώρες. Ενζυμική δραστηριότητα 0 . (Nachles & Seligman), (Μεγέθ. Χ4).

EIK.20: Μη ειδικές εστεράσες. Χρονικό διάστημα από τον τραυματισμό 1 ώρα. Ενζυμική δραστηριότητα 1+ . (Nachles & Seligman), (Μεγέθ. Χ4).

EIK.21: Μη ειδικές εστεράσες. Χρονικό διάστημα από τον τραυματισμό 1 ώρα. Ενζυμική δραστηριότητα 1+.(Nachles & Seligman), (Μεγέθ. Χ 10), (ίδια με EIK.20).

EIK.22: Μη ειδικές εστεράσες. Χρονικό διάστημα από τον τραυματισμό 3 ώρες. Ενζυμική δραστηριότητα 2+ . (Nachles & Seligman), (Μεγέθ. Χ4).

EIK.23: Μη ειδικές εστεράσες. Χρονικό διάστημα από τον τραυματισμό 6 ώρες. Ενζυμική δραστηριότητα 3+ . (Nachles & Seligman), (Μεγέθ. Χ4).

EIK.24: Μη ειδικές εστεράσες. Χρονικό διάστημα από τον τραυματισμό 6 ώρες. Ενζυμική δραστηριότητα 3+ . (Nachles & Seligman), (Μεγέθ. Χ10) (ίδια με EIK.23).

EIK.25: Μη ειδικές εστεράσες. Χρονικό διάστημα από τον τραυματισμό 12 ώρες. Ενζυμική δραστηριότητα 4+ . (Nachles & Seligman), (Μεγέθ. Χ4).

EIK.26: Μη ειδικές εστεράσες. Χρονικό διάστημα από τον τραυματισμό 12 ώρες. Ενζυμική δραστηριότητα 4+ . (Nachles & Seligman), (Μεγέθ. Χ10) (ίδια με EIK.25).

EIK.27: Μη ειδικές εστεράσες. Χρονικό διάστημα από τον τραυματισμό 24 ώρες. Ενζυμική δραστηριότητα 5+ . (Nachles & Seligman), (Μεγέθ. Χ4).

EIK.28: Μη ειδικές εστεράσες. Χρονικό διάστημα από τον τραυματισμό 24 ώρες. Ενζυμική δραστηριότητα 5+ . (Nachles & Seligman), (Μεγέθ. Χ20) (ίδια με EIK.27).

EIK.29: Μη ειδικές εστεράσες. Χρονικό διάστημα από τον τραυματισμό 24 ώρες. Ενζυμική δραστηριότητα 5+ . (Nachles & Seligman), (Μεγέθ. Χ4).

EIK.30: Μη ειδικές εστεράσες. Μεταθανάτιο τραύμα. Ενζυμική δραστηριότητα 0 . (Nachles & Seligman), (Μεγέθ. Χ4).

EIK.31: ΑΤΡαση. Χρονικό διάστημα από τον τραυματισμό 1 ώρα. Ενζυμική δραστηριότητα 0 . (Wachstein και Meisel τροποποιημένη από Pearse και Culling), (Μεγέθ. Χ4).

EIK.32: ΑΤΡαση. Χρονικό διάστημα από τον τραυματισμό 2 ώρες. Ενζυμική δραστηριότητα 1+ . (Wachstein - Meisel τροπ. από Pearse και Culling), (Μεγέθ. Χ4).

EIK.33: ΑΤΡαση. Χρονικό διάστημα από τον τραυματισμό 4 ώρες. Ενζυμική δραστηριότητα 2+ . (Wachstein - Meisel τροπ. από Pearse και Culling), (Μεγέθ. Χ4).

EIK.34: ΑΤΡαση. Χρονικό διάστημα από τον τραυματισμό 6 ώρες. Ενζυμική δραστηριότητα 3+ . (Wachstein - Meisel τροπ. από Pearse και Culling), (Μεγέθ. Χ4).

EIK.35: ΑΤΡαση. Χρονικό διάστημα από τον τραυματισμό 6 ώρες. Ενζυμική δραστηριότητα 3+ . (Wachstein - Meisel τροπ. από Pearse και Culling), (Μεγέθ. Χ20) (ίδια με EIK.34).

EIK.36: ΑΤΡαση. Χρονικό διάστημα από τον τραυματισμό 12 ώρες. Ενζυμική δραστηριότητα 4+ . (Wachstein - Meisel τροπ. από Pearse και Culling), (Μεγέθ. Χ4).

EIK.37: ΑΤΡαση. Χρονικό διάστημα από τον τραυματισμό 12 ώρες. Ενζυμική δραστηριότητα 4+ . (Wachstein - Meisel τροπ. από Pearse και Culling), (Μεγέθ. Χ20) (ίδια με EIK.36).

EIK.38: ΑΤΡαση. Χρονικό διάστημα από τον τραυματισμό 20 ώρες. Ενζυμική δραστηριότητα 5+ . (Wachstein - Meisel τροπ. από Pearse και Culling), (Μεγέθ. Χ4).

EIK.39: Αλκαλική Φωσφατάση. Χρονικό διάστημα από τον τραυματισμό 3.5 ώρες. Ενζυμική δραστηριότητα 1+ . (Azo dye coupling), (Μεγέθ. Χ4).

EIK.40: Αλκαλική Φωσφατάση. Χρονικό διάστημα από τον τραυματισμό 6 ώρες. Ενζυμική δραστηριότητα 2+ . (Azo dye coupling), (Μεγέθ. Χ4).

EIK.41: Αλκαλική Φωσφατάση. Χρονικό διάστημα από τον τραυματισμό 20 ώρες. Ενζυμική δραστηριότητα 3+ . (Azo dye coupling), (Μεγέθ. Χ4).

EIK.42: Αλκαλική Φωσφατάση. Χρονικό διάστημα από τον τραυματισμό 24 ώρες. Ενζυμική δραστηριότητα 4+ . (Azo dye coupling), (Μεγέθ. Χ4).

EIK.43: Αλκαλική Φωσφατάση. Χρονικό διάστημα από τον τραυματισμό 32 ώρες. Ενζυμική δραστηριότητα 5+ . (Azo dye coupling), (Μεγέθ. Χ4).

EIK.44: Αλκαλική Φωσφατάση. Χρονικό διάστημα από τον τραυματισμό 32 ώρες. Ενζυμική δραστηριότητα 5+ . (Azo dye coupling), (Μεγέθ. Χ10) (ίδια με EIK.43).

EIK.45: Αλκαλική Φωσφατάση. Μεταθανάτιο τραύμα. Ενζυμική δραστηριότητα 0 . (Azo dye coupling), (Μεγέθ. Χ4).