

UNIVERSITY OF CRETE
FACULTY OF HYGIENE
SCHOOL OF MEDICINE

LYMPHATICS OF THE HUMAN PERIOSTEUM
Histochemical Study regarding their Existence

DIMITRIOS H. VITTAS, M.D.
Orthopedic Surgeon

Thesis

HERAKLION

1990

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΛΕΜΦΑΓΓΕΙΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΠΕΡΙΟΣΤΕΟΥ
Ιστοχημική μελέτη για την απόδειξη η μη
της Υπάρξεώς τους.

ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ Χ. ΒΗΤΤΑ
Ιατρού Χειρουργού Ορθοπεδικού

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ

1990

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στην Κοπεγχάγη, για να υποβληθεί στο Πανεπιστήμιο Κρήτης, όπου παρουσιάστηκε και έγινε αποδεκτή στις 8 Νοεμβρίου 1990.

Όλα τα έξοδα έγιναν από τον συγγραφέα, που δεν έλαβε οικονομική βοήθεια από οποιονδήποτε άλλον.

This dissertation has been elaborated in Copenhagen, in order to be submitted to the University of Crete, where it was accepted as a thesis on November 8 1990.

The author has financed the whole project himself, without any economical aid from anyone.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η ερευνητική μου δραστηριότητα για τη μελέτη των λεμφαγγείων αρχίζει απο τα φοιτητικά μου χρόνια, οταν, σαν άμισθος βοηθός στο ανατομείο του Πανεπιστημίου Αθηνών, εφαρμόζω την μέθοδο του τότε καθηγητή Μ. Παπαμιλιτιάδη για την ιστολογική έρευνα των τριχοειδών λεμφαγγείων. Η μέθοδος αυτή, συνιστάμενη σε υποορογονόνιο ένεση χρωστικής ουσίας, πολλά πρόσφερε στην ιστολογική απεικόνιση λεμφαγγείων ενδοκοιλιακών και ενδοθωρακικών οργάνων.

Η μακροχρόνια ενασχόλησή μου με την ορθοπεδική δεν μείωσε το ενδιαφερον μου για το ρόλο του λεμφικού συστήματος στη φυσιολογία και παθολογία του ερειστικού συστήματος. Η σημασία της λέμφου για την καλή ή κακή έκβαση μιάς πάθησης των οστών δεν έχει, μέχρι σήμερα διερευνηθή. Η μελέτη της λεπτής υφής των οστών, ακόμα και με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, δεν απέδειξε την ύπαρξη λεμφαγγείων στα οστά. Μόνο έμμεσο συμπέρασμα ύπαρξης ενδοστικών λεμφαγγείων και διακίνησης λέμφου διατυπώθηκε μετά απο ενδοεπιφυσιακή ένεση λιπιοδόλης και κατοπινή ακτινολογική απεικόνιση τοπικών λεμφαδένων (1).

Στην έρευνα για την ανεύρεση η μη λεμφαγγείων στο ανθρώπινο περίοστεο η μέθοδος Παπαμιλιτιάδη δεν ηταν δυνατό να εφαρμοστή, λόγω της υφής του περιοστίου που στερείται ορογόνου και συνίσταται κυρίως απο συμπαγή συνδετικό ιστό. Γι'αυτό τό λόγο χρησιμοποίησα για τή μελέτη των τριχοειδών λεμφαγγείων, μέθοδο ανοσοιστοχημική (immunohistochemical).

Για την ανεκτίμητη βοήθεια με τη χρώση των παρασκευασμάτων

ευχαριστώ τον διευθυντή του Ινστιτούτου Παθολογικής Ανατομικής του νοσοκομείου Herlev κ. Bo Hainau και τον τεχνίτη ηλεκτρονικού μικροσκοπίου κ. Kjeld Kjeldsen. Τον Δρα. R. Albrechtsen ευχαριστώ για την ευγενική του δωρεάν παραχώρηση αντισώματος λαμινίνης.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ινώδης μεμβράνη που περιβάλλει όλα τα οστά - το **περιόστεο** - αποτελείται από ινώδη συνδετικό ιστό, που με τα κύτταρά του, τα νεύρα του και τα αγγεία του παίζει σπουδαίο ρόλο στην υγιεινή η νοσηρή κατάσταση του οστού.

Μακροσκοπικά το περιόστεο έχει πάχος 1 - 3 χ.μ. και επενδύει όλο, σχεδόν, το οστόν, εκτός από τα τμήματά του που καλύπτονται από χόνδρο.

Όσον αφορά στη λεπτή κατασκευή (υφή) του περιοστέου δεν υπάρχουν ουσιαστικές διαφορές στις περιγραφές ανατόμων (2,3,50) και παθολογοανατόμων (4)Ε μικροσκοπικά διακρίνονται δύο στιβάδες: η **εξωτερική** που συνίσταται από συνδετικές ίνες (κολλαγόνου) που πορεύονται προς όλες τις κατευθύνσεις, αραιό δίκτυο ελαστικών ινών, αρκετά αιμαγγεία, συνδετικά κύτταρα και ελάχιστα λιπώδη κύτταρα και η **εσωτερική** που αποτελείται από πυκνότερες συνδετικές ίνες (ινώδεις δεσμίδες κολλαγόνου), άφθονες ελαστικές ίνες, αραιότερα και λεπτότερα αγγεία και οστεοβλάστες. Σε πολλά σημεία οι ίνες του περιοστέου συνυφαίνονται με τις ίνες συνδέσμων και τενόντων. Προεξοχές του περιοστέου εισέρχονται μαζί με τα αγγεία στην συμπαγή ουσία των οστών, επενδύοντας τους σωλήνες του Volkmann.

Όλοι οι ερευνητές που ασχολούνται με τα αγγεία του περιοστέου αναφέρουν ότι τα λεμφαγγεία ακολουθούν τα αιμαγγεία (2,3,4,14). Απόδειξη για τον ισχυρισμό αυτό δεν βρήκα σε καμία επιστημονική εργασία από όσες αναζήτησα στην διεθνή βιβλιογραφία. Μόνο έμμεσα συμπεράσματα διακινήσεως λεμφικού υγρού αναφέρονται μετά από ενδομυελική έγχυση ουσιών που κατόπιν παρατηρούνται σε γειτονικά

αλλά εξωοστικά λεμφαγγεία και λεμφογάγγλια (1,14,16). Οι Olszewski και Sawicki απέδειξαν την ύπαρξη λεμφικής αποχετεύσεως από τον μυελό των επιμήκων οστών (μηριαίου και κνήμης) σε σκύλους, όπου, μετά ένεση Λιπιοδόλης UF κάτω από το περίοστεο και μέσα στον μυελό, η επακόλουθη λεμφαγγειογραφία έδειξε αγγεία – προφανώς λεμφαγγεία – να ξεκινούν από τον μυελό της επιφύσεως και να βγαίνουν έξω από το οστόν καταλήγοντας στα ιγνυακά λεμφαγγεία και λεμφογάγγλια. Δεν αναφέρεται όμως αν τα αγγεία αυτά απλώς διαπερνούν το περίοστεο η βγαίνουν έξω από το οστόν, μπαίνοντας μέσα στον αρθρικό θύλακο στο σημείο της πρόσφυσής του στο οστόν.

Οι αναφερόμενες επιστημονικές εργασίες περιέχουν φωτογραφίες ιστολογικών παρασκευασμάτων περιοστίου όπου τα αιμοφόρα αγγεία διακρίνονται πολύ καλά. Σε καμία όμως φωτογραφία παρασκευάσματος δεν παρατηρούνται λεμφαγγεία.

Το γεγονός αυτό μόνο κατά τρεις εκδοχές μπορεί να ερμηνευτεί:

1. Υπάρχουν λεμφαγγεία στο περίοστεο, αλλά δεν ήταν δυνατό να εμφανιστούν στα παρασκευάσματα.
2. Υπάρχουν λεμφαγγεία στα παρασκευάσματα, αλλ' αυτά δεν φωτογραφήθηκαν. (μόνο τμήμα της τομής φωτογραφίζεται).
3. Δεν υπάρχουν λεμφαγγεία στο περίοστεο.

ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΑΙ ΥΛΙΚΟ

A) ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ ΒΑΣΗ

Τα μεγάλα λεμφαγγεία δεν διαθέτουν διαφοροποιητικά μορφολογικά χαρακτηριστικά που να τα ξεχωρίζουν από τα αντίστοιχα αιμαγγεία. Αυτά τα λεμφαγγεία μπορούν, με κάποια βεβαιότητα, να αναγνωριστούν με μεθόδους ενέσεως χρωστικών ουσιών που δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ζωντανούς ανθρώπους (35, 54).

Τα τριχοειδή λεμφαγγεία όμως δεν έχουν βασικό υμένα και κατ' αυτό τον τρόπο διαφέρουν από τα τριχοειδή αιμαγγεία.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η ανακάλυψη μικρών τριχοειδών αγγειακών χώρων, επενδυμένων μόνον από ενδοθήλιο, χωρίς βασικό υμένα, θα αποδείκνυε την ύπαρξη λεμφαγγείων στο ανθρώπινο περιόστεο.

Για την μελέτη των τριχοειδών λεμφαγγείων εφάρμοσα δυο μεθόδους:

1. ΑΠΛΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ:

Ανοσοιστοχημικές τεχνικές.

Με τη χρήση ανοσοιστοχημικών τεχνικών είμαστε σε θέση να αποδείξουμε τόσο την ύπαρξη όσο και την εντόπιση ενός ιστικού αντιγόνου με το να επώασουμε την τομή του ιστού με ένα ειδικό αντίσωμα κατευθυνόμενο προς αυτό το καθορισμένο αντιγόνο (36,38). Το αντίσωμα αντιδρά με το αντιγόνο και ο τύπος της αντιδράσεως που είναι ο ίδιος με τον τύπο που βρίσκεται το αντίσωμα μπορεί να γίνει ορατός με το να μαρκάρουμε το αντίσωμα με μιά ουσία μαρκαρίσματος (marker).

Η ανοσοιστοχημική μέθοδος χρώσεως περιγράφηκε αρχικά από τον

Coons και τους συνεργάτες του (1941, 1942) (40,41) που χρησιμοποίησαν αντισώματα συζευγμένα με φλουορεσκεΐνη (fluoresceine). Το 1966 οι Ram και συνεργάτες (42) περιέγραψαν τη χρησιμοποίηση αντισωμάτων συζευγμένων με ένζυμα και τον ίδιο χρόνο οι Αβραμέας και Uriel αφ'ενός (43) και Nakane και Pierce αφ' ετέρου (44), ανεξάρτητα οι μεν από τους δε, παρασκεύασαν αντισώματα συζευγμένα με υπεροξειδάση. Το χαμηλό κόστος της και το γεγονός ότι μόνο μικρές ποσότητες ενζύμων με τις ίδιες επιδράσεις, σαν της υπεροξειδάσης, στις ουσίες μαρκαρίσματος (markers) υπάρχουν σαν ενδογενή συστατικά στους διαφόρους ιστούς, έκαμε την υπεροξειδάση μία από τις ποιά διαδεδομένες ουσίες μαρκαρίσματος.

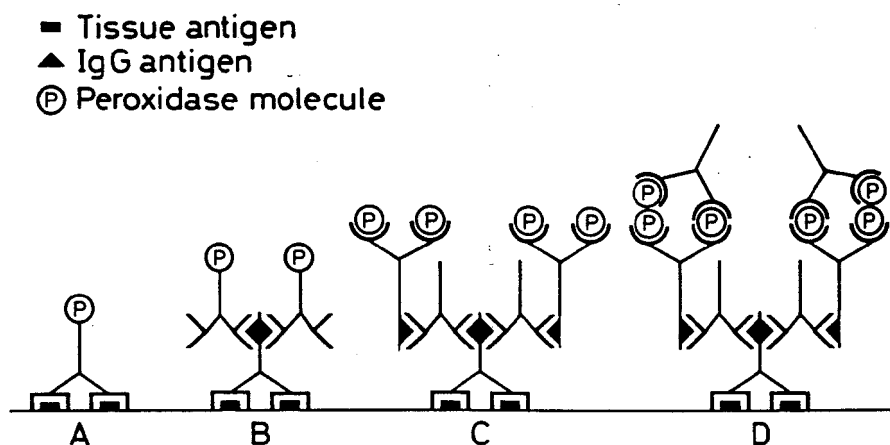
Στην αρχή οι ανοσοιστοχημικές μέθοδοι θεωρήθηκαν ακατάλληλες για χρώση ιστολογικού υλικού μονιμοποιημένου με φορμαλδεύδη και εγκλεισμένου σε παραφίνη. Μετά όμως από βελτίωση της ευαισθησίας της μεθόδου κυρίως από τους Αβραμέα και Ternynck (45) μπόρεσαν οι Taylor και Burns το 1974 να ανακοινώσουν την επιτυχή χρησιμοποίησή της σε ιστούς μονιμοποιημένους με φορμαλδεύδη και εγκλεισμένους σε παραφίνη (46).

Ανοσοιστοχημική χρώση με υπεροξειδάση μπορεί να γίνει σαν άμεση η σαν έμμεση τεχνική:

Στην **άμεση** τεχνική (one layer) το με ένζυμο συζευγμένο ειδικό αντίσωμα αντιδρά απ' ευθείας με το ανάλογο αντιγόνο τού ιστού.

Στην **έμμεση** τεχνική (two layer) ο ιστός επώάζεται με το ειδικό αντίσωμα (π.χ. immunogloboulin κουνελιού) σαν το πρώτο στρώμα και κατόπιν με ένζυμο συζευγμένο αντίσωμα που κατευθύνεται προς το πρώτο αντίσωμα (π.χ. χοιρινή immunogloboulin αντι-κουνελιού) σαν το δεύτερο στρώμα (38).

Γιά ακόμη μεγαλύτερη ευαισθητοποίηση της έμμεσης τεχνικής επινοήθηκε τεχνική τριών στρωμάτων (three layer) από τους Sterberger και Cuculis (1969) και από τον Mason και συνεργάτες (1969). Σημαντική απλοποίηση του όλου συστήματος αποτέλεσε η χρησιμοποίηση του συμπλέγματος υπεροξειδάση/ αντιυπεροξειδάση σαν τρίτο στρώμα, όπου οι δύο αλληλοδιαδεχόμενες φάσεις της αρχικής τεχνικής συγχωνεύτηκαν σε μία (Sternberg και συνεργ. 1970) (47,48,49,).



The immunoperoxidase techniques

- A: Direct technique
 B: Indirect technique
 C: Unlabelled antibody bridge technique
 D: Peroxidase/antiperoxidase technique

Με την ανοσοϊστοχημική μέθοδο της υπεροξειδάσης αναγνωρίζεται:

α) Το **ενδοθήλιο**, μετά απο χρώση για τον παράγοντα VIII (Factor VIII), που περιέχεται στα κύτταρα (11,37,39).

β) Η **βασική μεμβράνη**, μετά απο χρώση για τη Λαμινίνη (Laminin), που είναι το κύριο συστατικό της μεμβράνης αυτής (12,20,21,24,25).

Πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι περιλαμβάνει σχετικά μεγάλο τμήμα του παρασκευάσματος κατά οπτικό πεδίο και κατ' αυτόν τον τρόπο επιτρέπει τη μελέτη πολλών - σχετικά - αγγείων.

Μειονέκτημά της είναι ότι οι δύο χρωστικές μέθοδοι δεν είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν στο ίδιο ιστολογικό παρασκεύασμα και γι' αυτό αντικρυστά εφαιπόμενες τομές (mirror sections) πρέπει να μελετούνται ανά δύο (μία σε κάθε μικροσκόπιο). Τούτο όμως απαιτεί περισσότερο χρόνο.

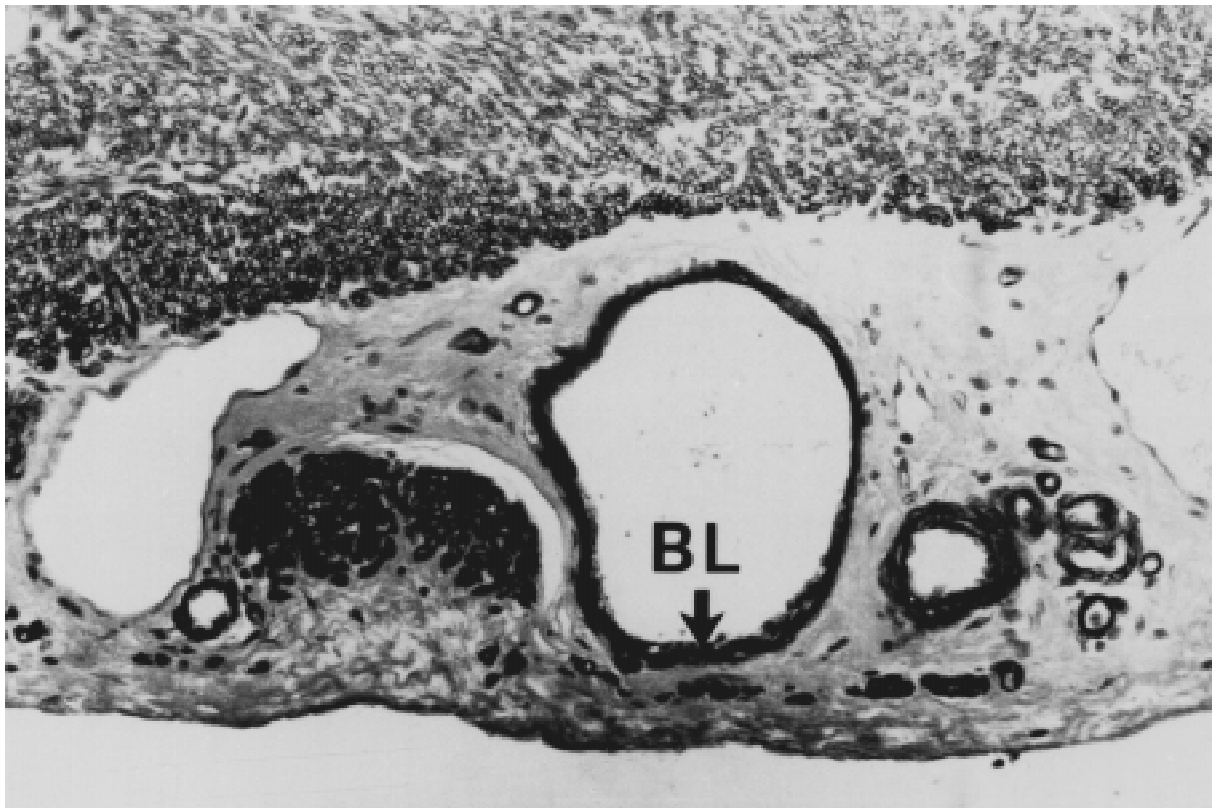
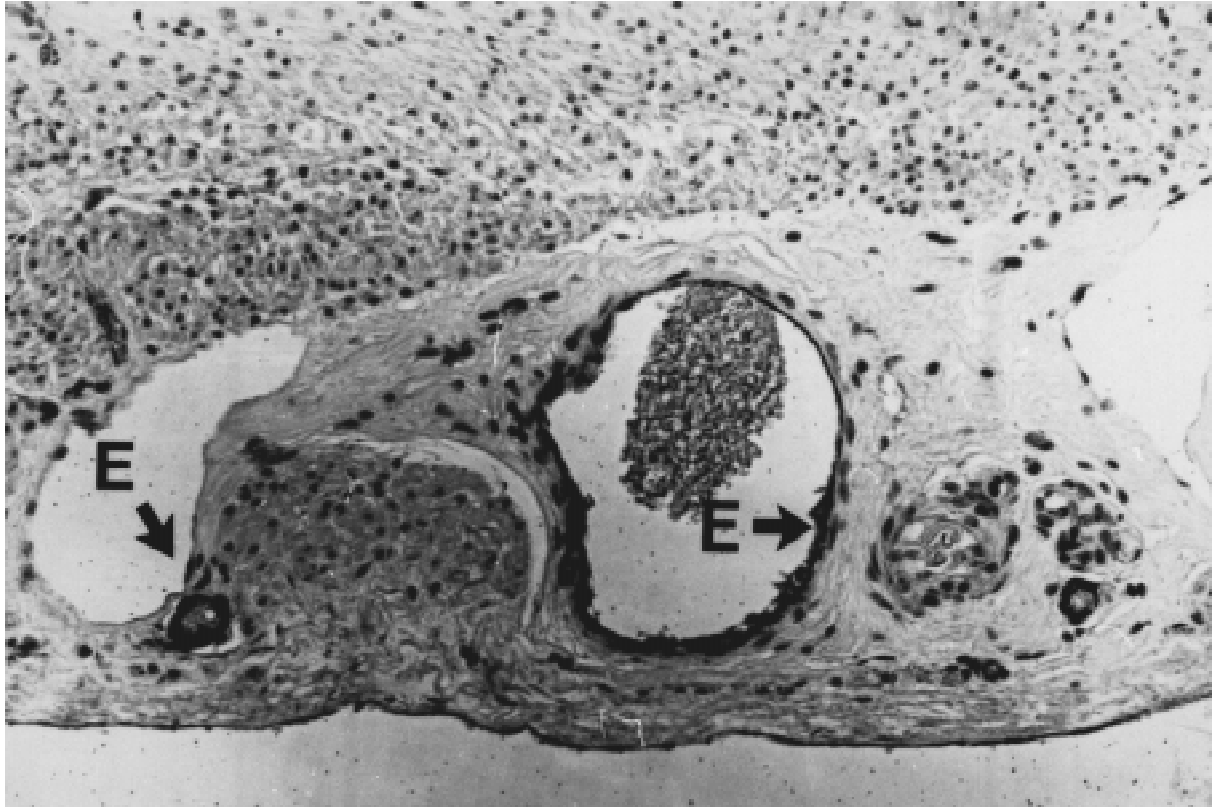
Η μέθοδος της υπεροξειδάσης χρησιμοποιείται σήμερα με μεγάλη επιτυχία για τον διάχωρισμό μεταξύ αιμαγγείων και λεμφαγγείων σε πολλούς ιστούς και είναι τόσο ευαίσθητη, ώστε οι παθολογοανατόμοι να την εφαρμόζουν για την διάκριση της ιστολογικής προελεύσεως διαφόρων αγγειακών όγκων (11,12,20,21). Παρ' όλα αυτά, για να ελέγξω την ικανότητα της μεθόδου στην προκειμένη έρευνα, να ανιχνεύη λεμφαγγεία, την χρησιμοποίησα πρώτα σε φυσιολογικές σκωληκωειδείς αποφύσεις, που είναι γνωστό ότι περιέχουν άφθονα λεμφαγγεία. Σε όλα τα παρασκευάσματα σκωληκωιδών, η μέθοδος κατέδειξε λεμφαγγεία. (Πίνακας 1, Εικ. 1 και 2).

Εικ. 1:

A. Ιστολογικό παρασκεύασμα **σκωληκοειδούς αποφύσεως** χρωματισμένο για τον παράγοντα **VIII**, με την ιστοχημική μέθοδο της υπεροξειδάσης. Οπου υπάρχει ενδοθήλιο (**E**) η χρώση είναι θετική. Μεγέθυνση 260x.

B. Αντικρυστά εφαπτόμενη τομή από το ίδιο παρασκεύασμα χρωματισμένο για **λαμινίνη** με την ίδια μέθοδο. Το αγγείο αριστερά είναι αρνητικό για την λαμινίνη και επομένως δεν έχει βασική μεμβράνη, άρα πρόκειται για λεμφαγγείο.

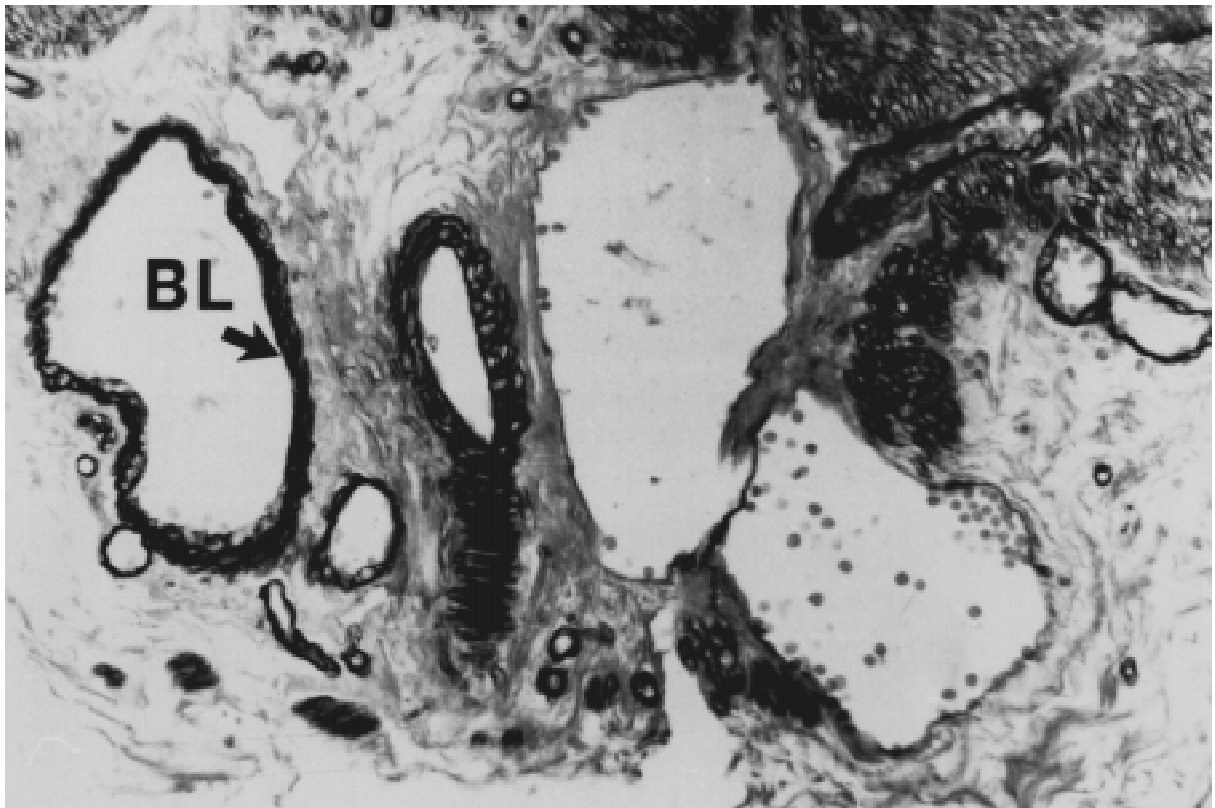
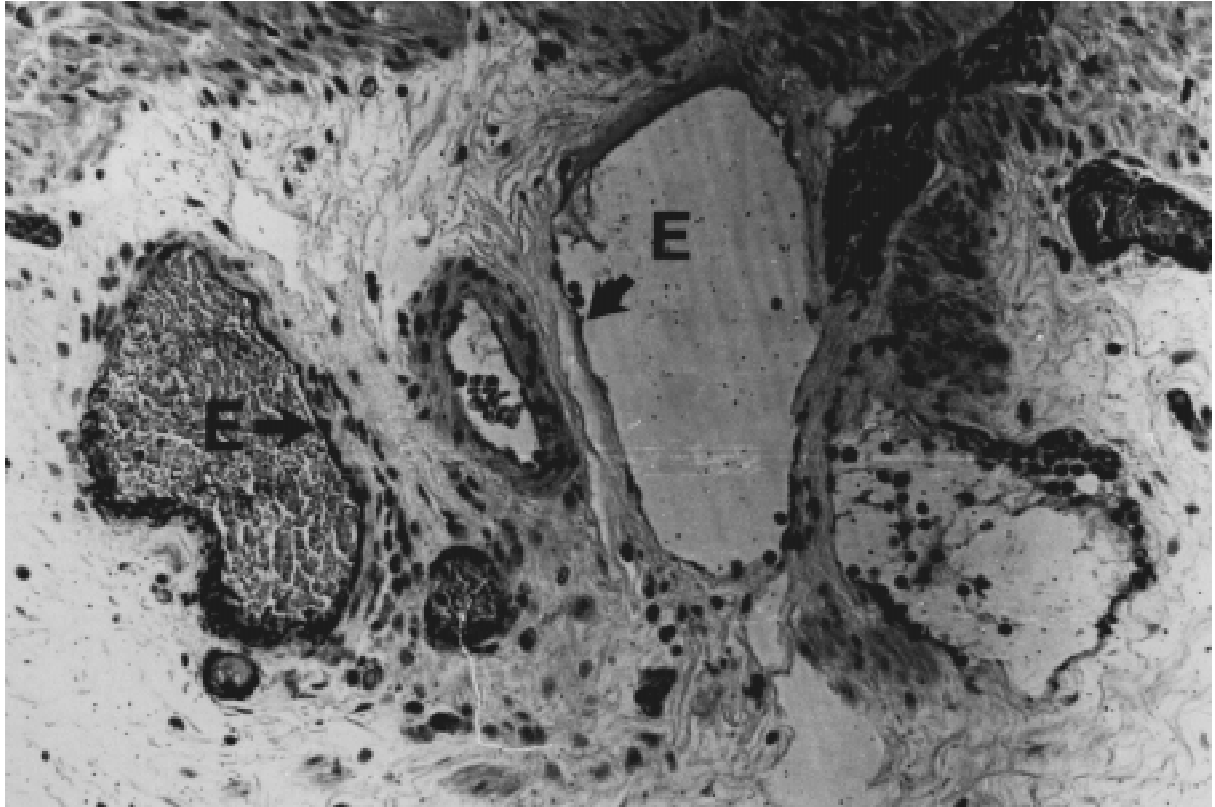
Μεγέθυνση 260x.



Εικ. 2:

A. Ιστολογικό παρασκεύασμα **σκωληκοειδούς αποφύσεως** χρωματισμένο με τη μέθοδο της υπεροξειδάσης για τον παράγοντα **VIII**. Το ενδοθήλιο σ' όλα τα αγγεία είναι θετικό.

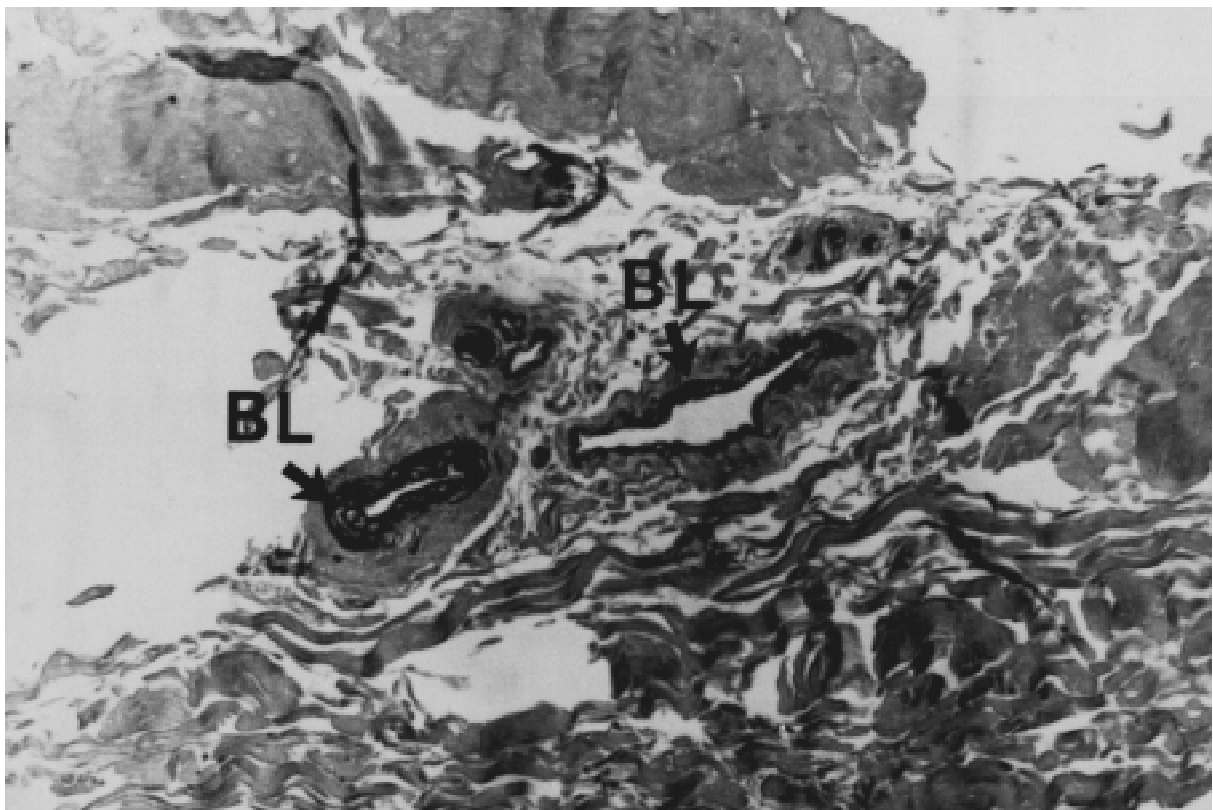
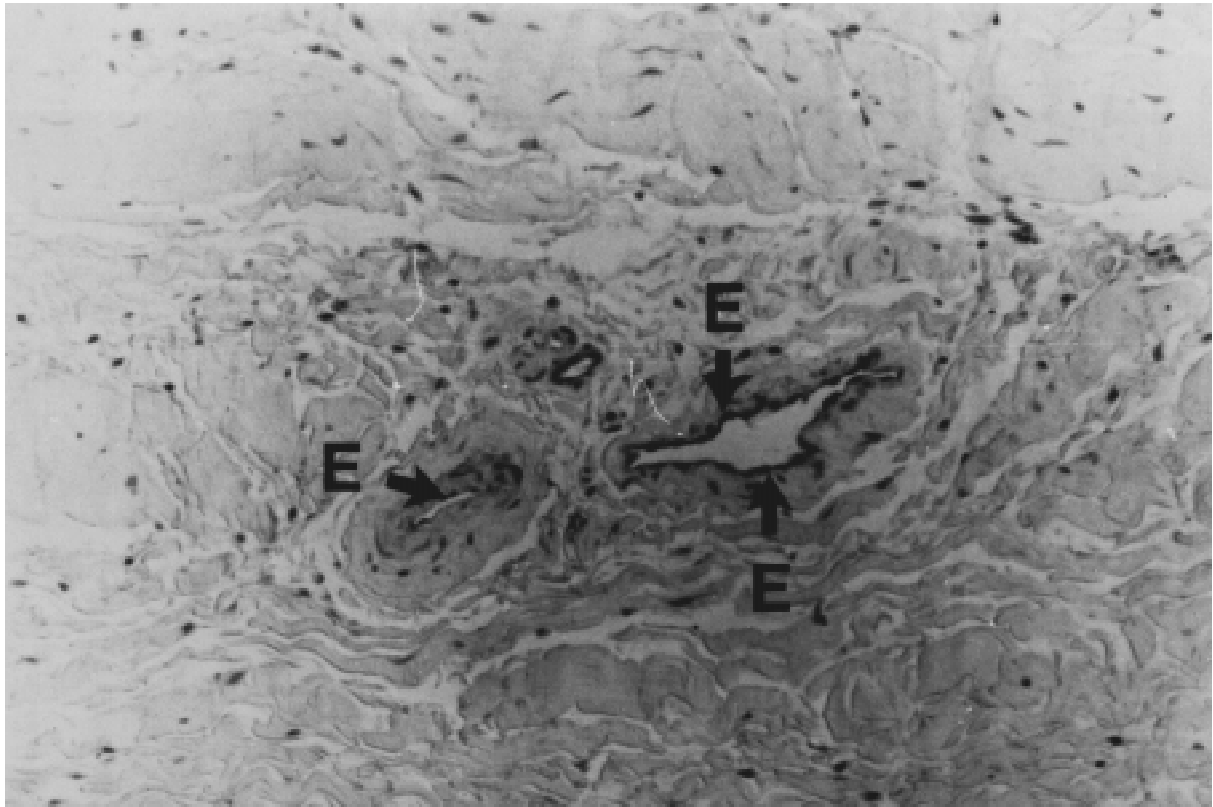
B. Αντικρυστά εφαπτόμενη τομή από το ίδιο παρασκεύασμα, χρωματισμένο με την ίδια μέθοδο αλλά για **λαμινίνη**. Το μεγάλο αγγείο στη μέση είναι αρνητικό και επομένως είναι λεμφαγγείο. Όλα τα άλλα αγγεία είναι θετικά (αιμαγγεία).



Εικ. 3:

A. Ιστολογικό παρασκεύασμα **περιστέου** χρωματισμένο για τον παράγοντα **VIII**, με την ιστοχημική μέθοδο της υπεροξειδάσης. Οπου υπάρχει ενδοθήλιο (**E**) η χρώση είναι θετική.

B. Αντικρυστά εφαπτόμενη τομή από το ίδιο παρασκεύασμα χρωματισμένο για **λαμινίνη**, με την ίδια μέθοδο. Όλα τα αγγεία είναι θετικά για τη λαμινίνη και επομένως έχουν βασική μεμβράνη (**BL**), άρα είναι όλα αιμαγγεία.



Εικ. 4:

Τμήμα του ίδιου παρασκευάσματος με την εικόνα 3, σε μεγαλύτερη μεγένθυση.

A. Όλα τα αγγεία της εικόνας είναι εμφανώς θετικά για τον παράγοντα **VIII** (ενδοθήλιο).

B. Τα ίδια αγγεία είναι θετικά και για τη **λαμινίνη** (βασική μεμβράνη).



2. ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ:

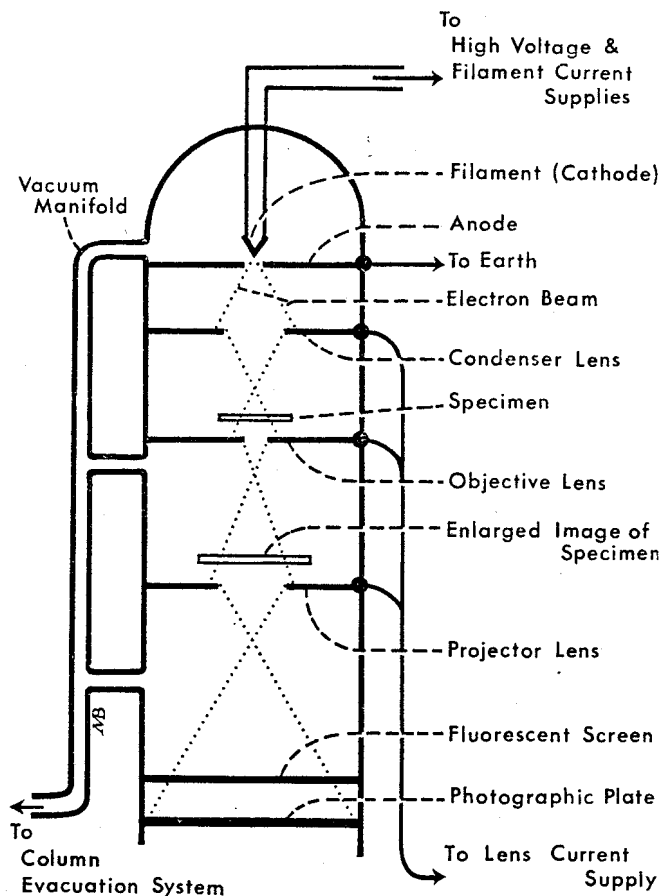
Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αποτελείται - σε γενικές γραμμές - από ένα μεταλλικό σωλήνα κενού μέσα στον οποίο είναι συνδεδεμένα, το ένα κάτω από το άλλο, ένα πολύ λεπτό μεταλλικό νήμα (η κάθοδος), μία μεταλλική πλάκα μ'ένα κεντρικό άνοιγμα (την άνοδο), ένας αριθμός μαγνητικών φακών, μία φωσφορίζουσα οθόνη παρατηρήσεως και μία φωτογραφική πλάκα. Με τη διοχέτευση ηλεκτρικού ρεύματος, θερμαίνεται η άνοδος και εκπέμπει ηλεκτρόνια. Η διοχέτευση ρεύματος υψηλής αρνητικής τάσης στο νήμα της καθόδου δημιουργεί μεγάλη διαφορά δυναμικού μεταξύ του νήματος και της ανοδικής πλάκας, που έχει δυναμικό γείωσης. Αυτή η διαφορά επιταχύνει τα ηλεκτρόνια προς την άνοδο. Μερικά απ' αυτά περνάνε μέσα από το κεντρικό άνοιγμα της ανόδου και κατευθύνονται προς το κάτω μέρος του σωλήνα σαν μία δέσμη ηλεκτρονίων (*electron beam*). Η δέσμη των ηλεκτρονίων εστιάζεται από τον πρώτο μαγνητικό φακό (τον φακό συμπύκνωσης) κατά τέτοιο τρόπο ώστε να φωτίζει το παρασκεύασμα. Τα περισσότερα ηλεκτρόνια διαπερνούν το παρασκεύασμα χωρίς απόκλιση. Μερικά όμως συγκρούονται με βαριά μέταλλα που περιέχονται στο παρασκεύασμα και διασκορπίζονται, ξεφεύγοντας έτσι από τη δέσμη. Η δέσμη που προκύπτει κατ' αυτόν τον τρόπο παίρνει ένα σχήμα που μετατρέπεται σε εικόνα όταν η δέσμη ξαναεστιασθή. Τα ηλεκτρόνια που περνάνε μέσα από το παρασκεύασμα εστιάζονται από ένα δεύτερο μαγνητικό φακό (τον αντικειμενικό φακό) που μεγεθύνει την εικόνα του παρασκευάσματος. Αυτή η εικόνα μεγεθύνεται ακόμη περισσότερο από ένα τρίτο μαγνητικό φακό (τον φακό προβολής) και μπορεί να παρατηρηθή στη φωσφορίζουσα οθόνη. Η εικόνα μπορεί τώρα να φωτογραφηθή με το σήκωμα της οθόνης κατά τέτοιο τρόπο, ώστε η δέσμη να πέσει επάνω στη φωτογραφική πλάκα. Οι περισσότερες φωτογραφίες με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο παίρνονται

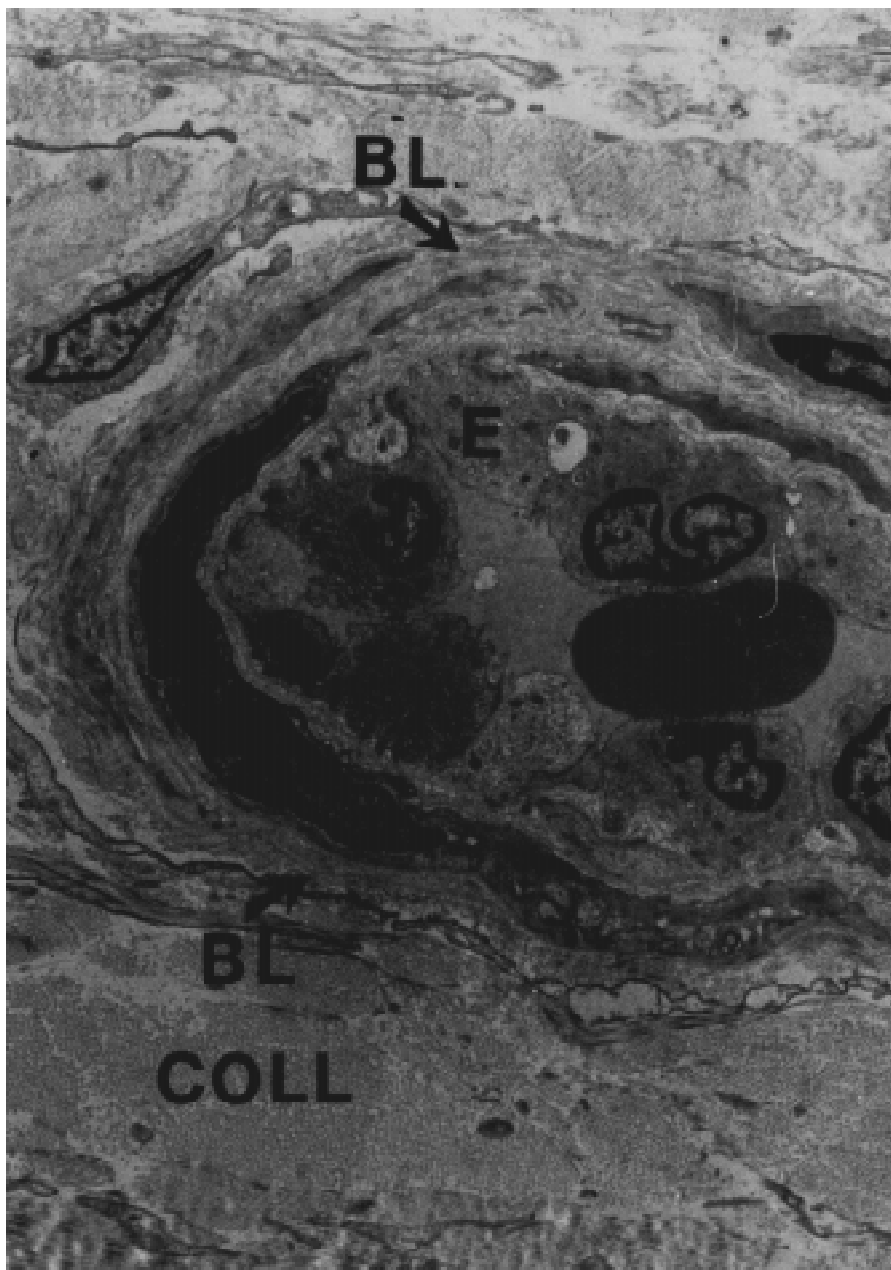
με μεγένθυση περίπου 100.000 φορές, αλλά μπορούν φωτογραφικά να μεγεθυνθούν ακόμη περισσότερο με ένα παράγοντα περίπου $\times 10$.

Γιά περισσότερες λεπτομέρειες για την κατασκευή και λειτουργία του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, παραπέμπεται ο ενδιαφερόμενος στη σχετική βιβλιογραφία στο τέλος της διατριβής (51,52,53).

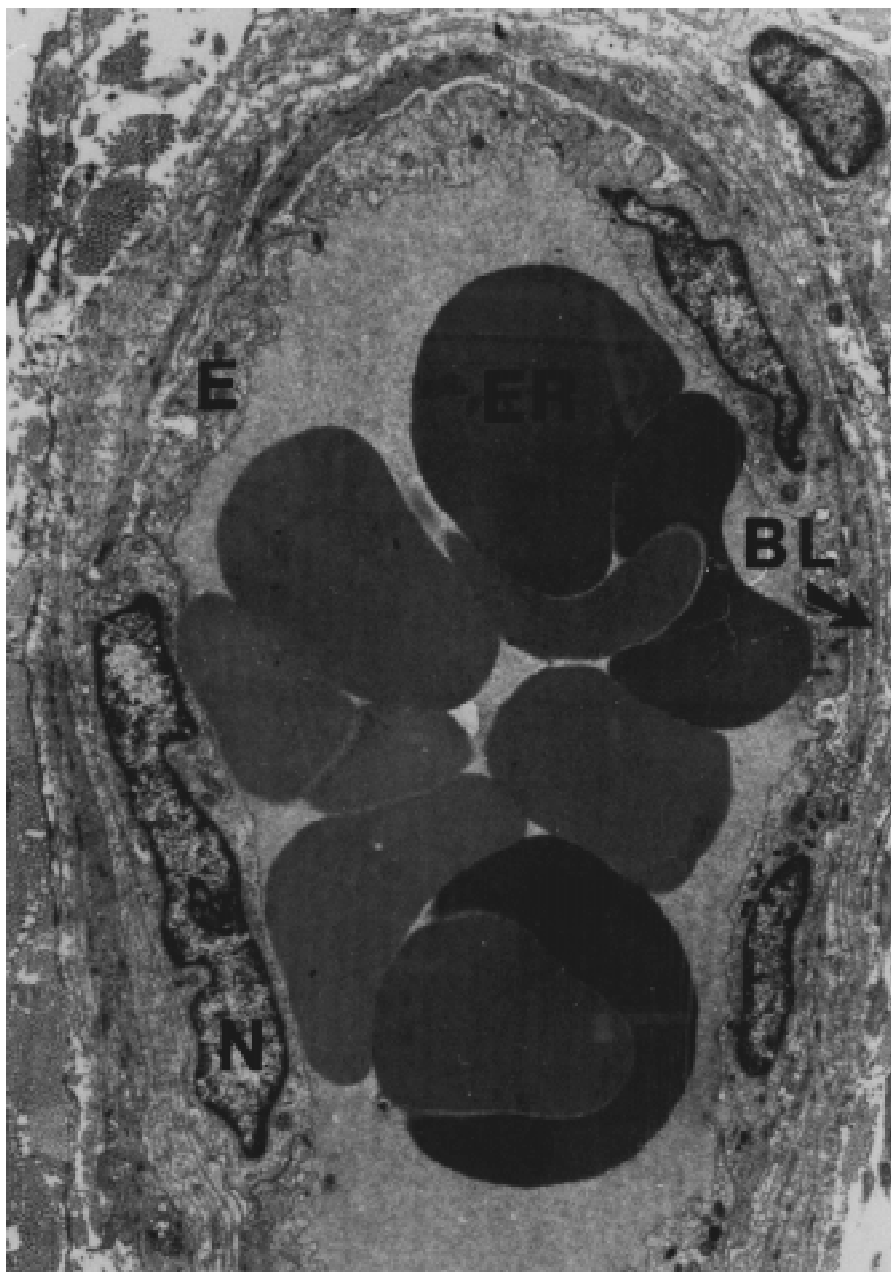
Με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο είναι δυνατή η αναγνώριση τόσο του ενδοθηλίου όσο και της βασικής μεμβράνης στο ίδιο ιστολογικό παρασκευάσμα, λόγω της χαρακτηριστικής λεπτής κατασκευής τους (27,30,32,33,34,).

Αυτό είναι το **πλεονέκτημα** αυτής της μεθόδου. Το **μειονέκτημά** της είναι ότι μόνο μικρό τμήμα του παρασκευάσματος μπορεί να σπουδάζεται στο κάθε οπτικό πεδίο, λόγω της μεγάλης μεγέθυνσης.

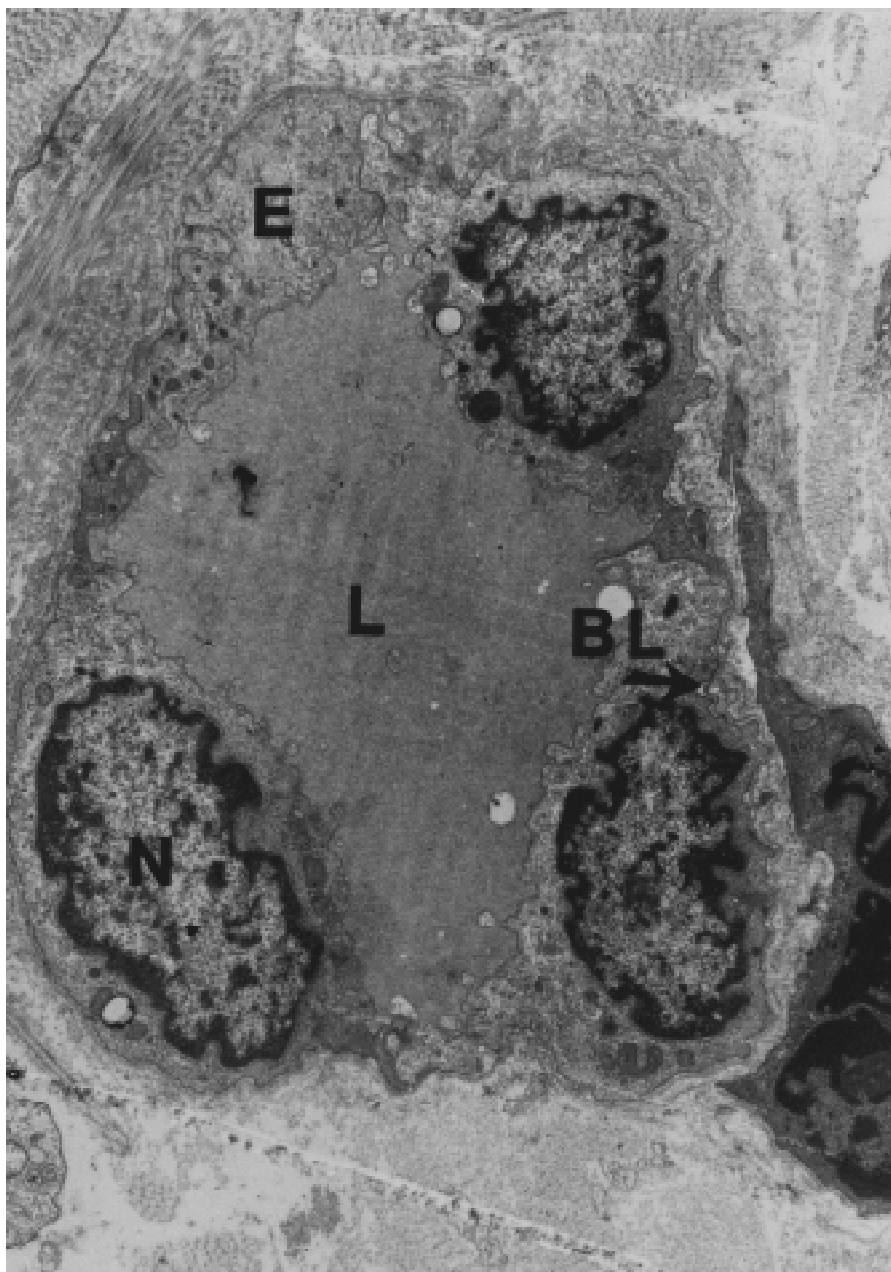




Εικ. 5. Περίοστεο έξω κονδύλου κνήμης γυναίκας 27 ετών. Φωτογραφία με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Λεπτή κατασκευή αιμοφόρου τριχοειδούς: Διακρίνονται το ενδοθηλιακό κύτταρο (E) με τον πυρήνα του (N), η βασική μεμβράνη (BL) και ίνες κολλαγόνου (COLL). Μέσα στον αυλό ένα ερυθρό αιμοσφαίριο (ER). Μεγέθυνση 6200x.



Εικ. 6. Περίοστεο έξω μηριαίου κονδύλου ασθενούς με εκφυλιστική αρθροπάθεια του γόνατος. Γυναίκα 71 ετών. Φωτογραφία με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο: Πυρήνας (N) ενδοθηλιακού κυττάρου (E) Βασική μεμβράνη (BL) Ερυθρά αιμοσφαίρια (ER) Ινες κολλαγόνου (Coll). Μεγέθυνση 6200x.

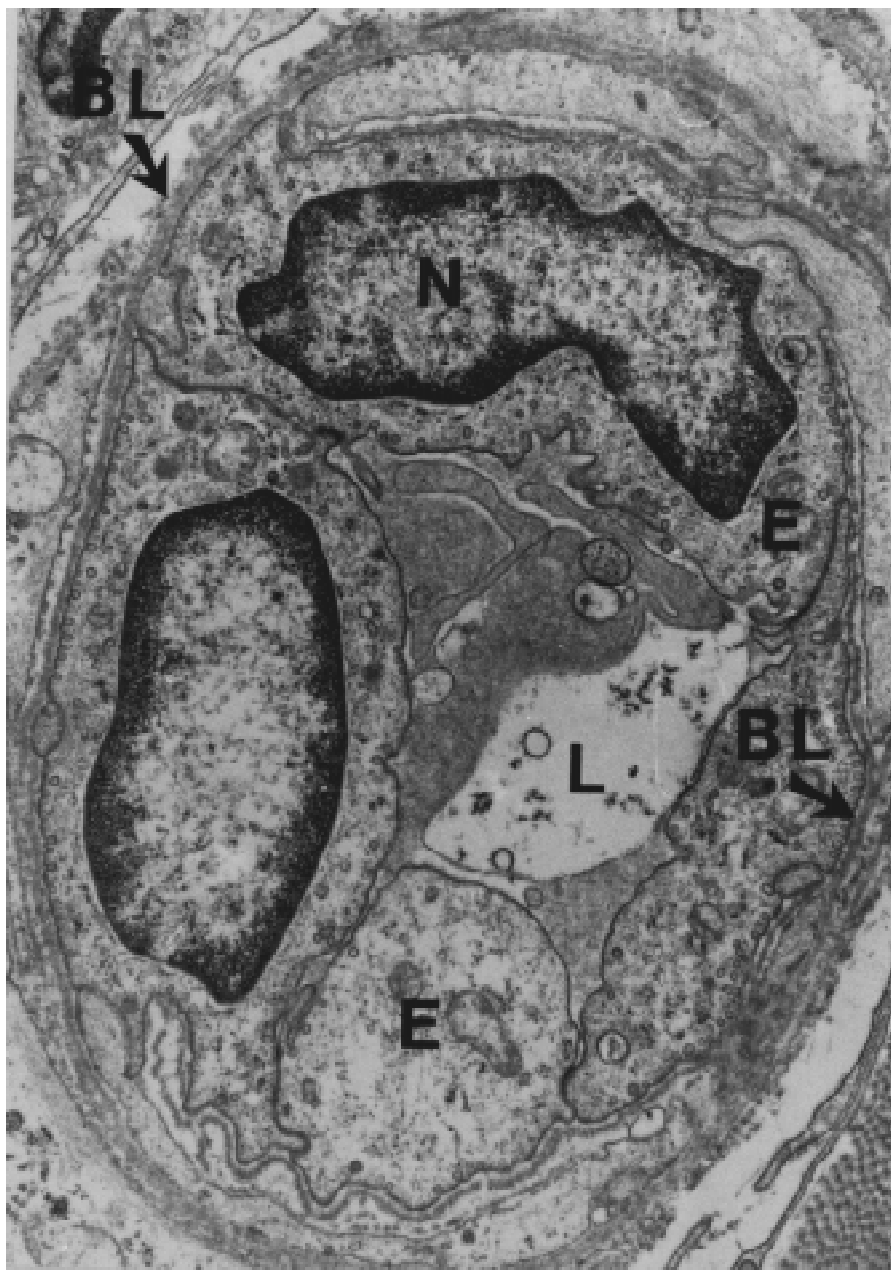


Εικ. 7. Φωτογραφία από τό ίδιο παρασκεύασμα όπως και της εικόνας 6: Τριχοειδές αιμαγγείο με περιφέρεια αποτελούμενη από ενδοθήλιο (E) και βασική μεμβράνη (BL). Ο αυλός του αγγείου (L) περιέχει υγρό χωρίς κύτταρα. Μεγέθυνση 7700x.



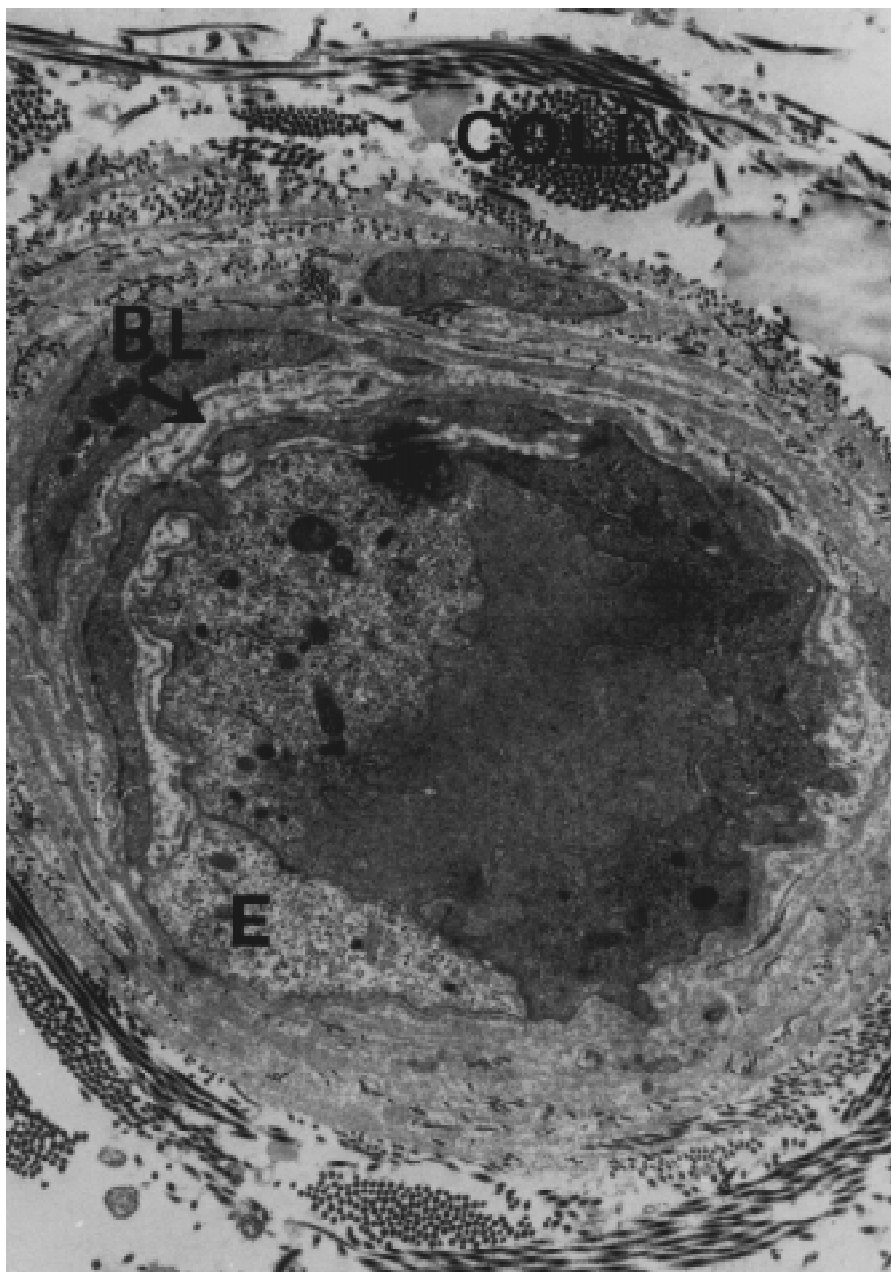
Εικ. 8. Περίοστεο αυχένα μηριαίου. Γυναίκα 63 ετών με κάταγμα αυχένος του μηριαίου. Ενδοθηλιακό κύτταρο (E) με τον πυρήνα του (N), Βασική μεμβράνη (BL), Ερυθρά αιμοσφαίρια (ER).

Μεγέθυνση 6200x.

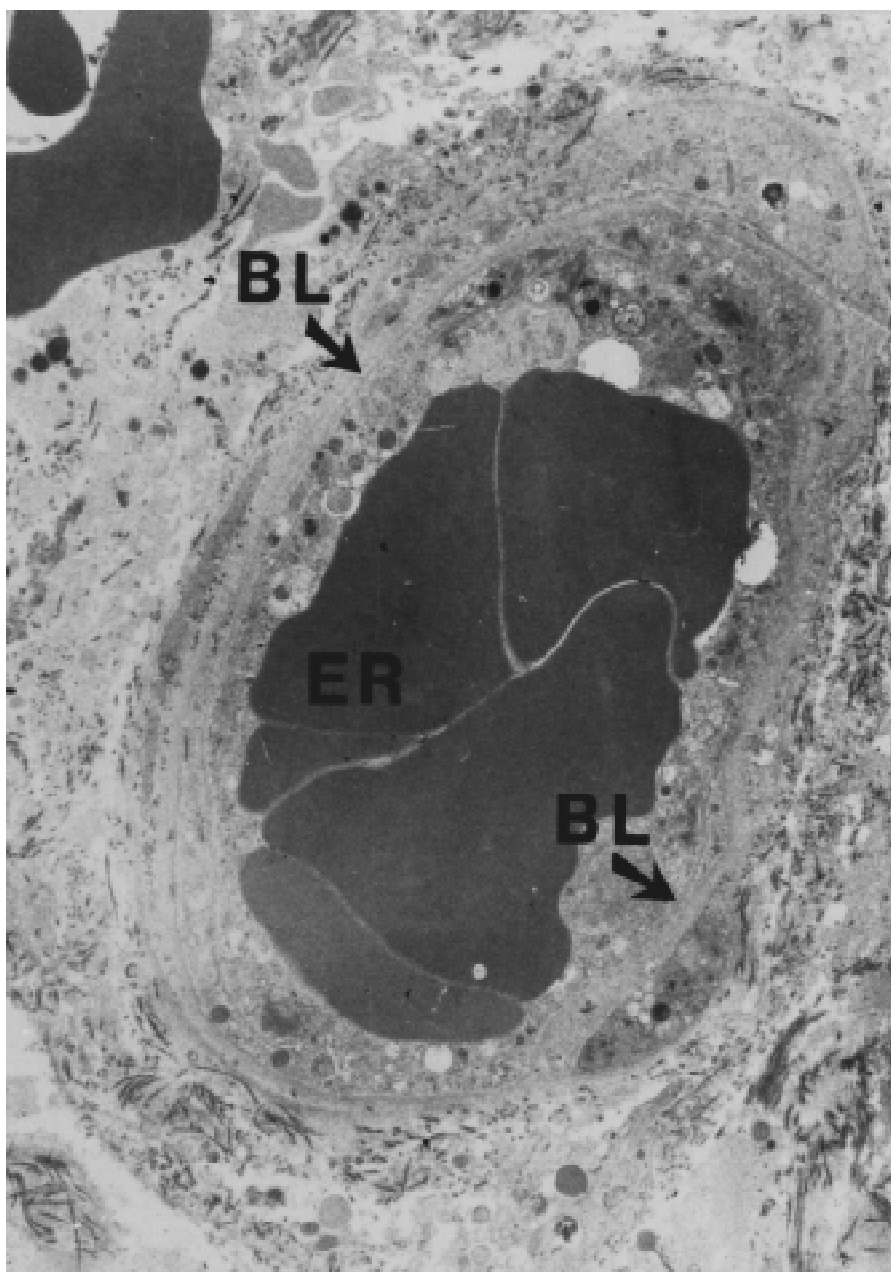


Εικ. 9. Φωτογραφία από άλλο τμήμα του ίδιου παρασκευάσματος όπως και η εικ.6. Βασική μεμβράνη (BL), Ενδοθήλιο (E), Πυρήνας ενδοθηλιακού κυττάρου (N), Αυλός τριχοειδούς (L).

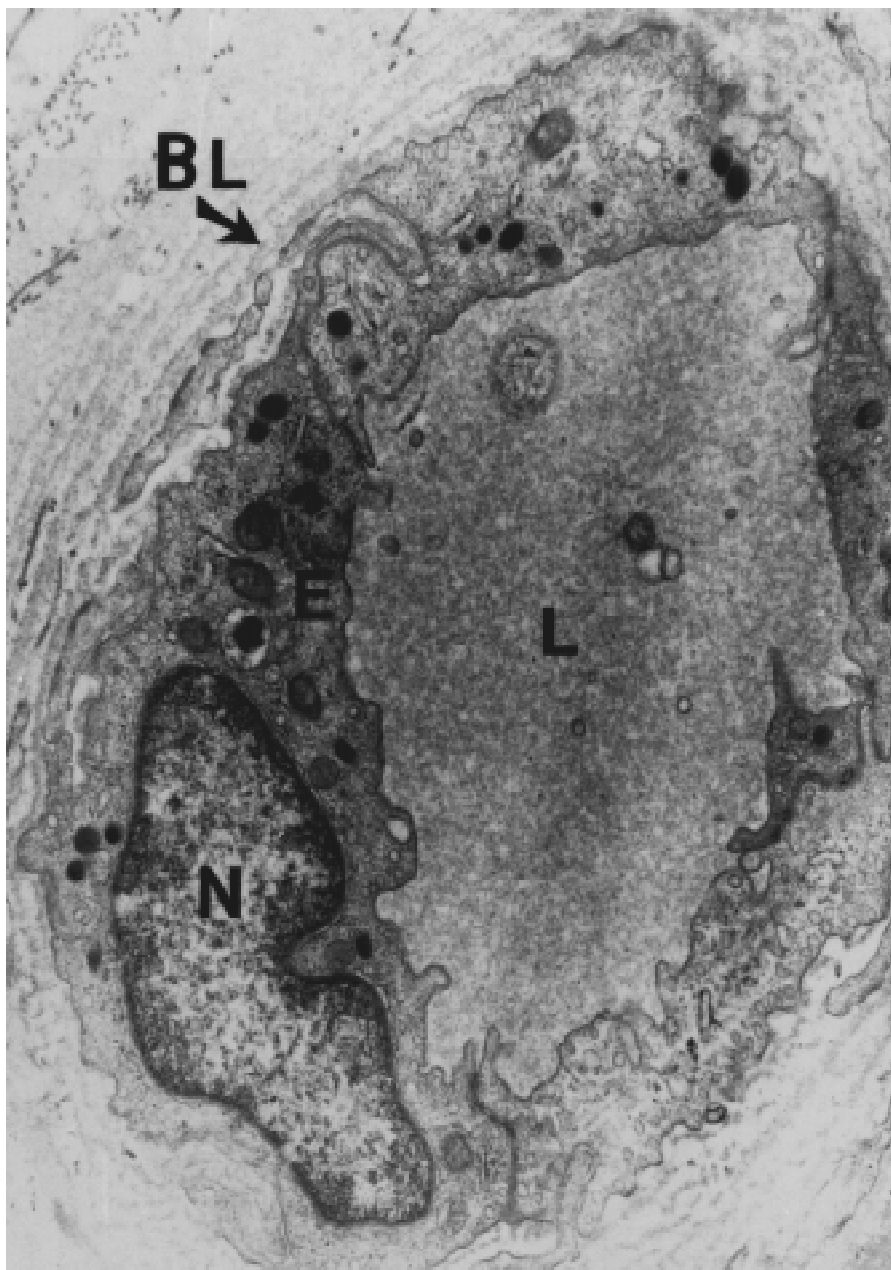
Μεγέθυνση 15500x.



Εικ. 10. Περίοστεο από το κάτω άκρο περόνης. Άνδρας 24 ετών με μετατραυματική διεύρυνση της ποδοκνημικής. Πυρήνας ενδοθηλιακού κυττάρου (N), Βασική μεμβράνη (BL), Αυλός τού αγγείου (L), Ινες κολλαγόνου (COLL). Μεγέθυνση 11600x.



Εικ. 11. Περίοστεο ωλένης γυναίκας 71 ετών με πρόσφατο κάταγμα αντιβραχίου. Βασική μεμβράνη (BL), Ερυθρά αιμοσφαίρια (ER). Μεγέθυνση 7700x.



Εικ. 12. Περίοστεο άνω άκρου κνήμης άνδρα 50 ετών. Μονοκυτταρικό τοίχωμα τριχοειδούς Ενδοθηλιακό κύτταρο (E) με τον πυρήνα του (N). Αυλός του τριχοειδούς αγγείου (L), Βασική μεμβράνη (BL). Μεγέθυνση 19500x.

Στη μελέτη αυτή χρησιμοποίησα και τις δύο μεθόδους για να μειώσω τα μειονεκτήματα της κάθε μιάς μεθόδου, αν αυτή χρησιμοποιούταν αποκλειστικά.

B) ΠΡΑΚΤΙΚΗ ΕΦΑΡΜΟΓΗ

Εικοσιτρείς βιοψίες περιostίου απο εικοσιdύο ασθενείς που χειρουργήθηκαν στην πανεπιστημιακή ορθοπεδική κλινική του νοσοκομείου Herlev της Κοπεγχάγης, Δανίας εξετάστηκαν. Λεπτομερειακά στοιχεία για το φύλο, ηλικία, σημείο βιοψίας και είδος επέμβασης περιέχονται στους πίνακες 2 και 3. Οι βιοψίες αποτελούνταν όλες από μακροσκοπικά φυσιολογικό περίosteo που αφαιρέθηκε όσο το δυνατό πιο μακρυνά από το σημείο επέμβασης, ανάλογα με το είδος της επέμβασης και το μέγεθος του χειρουργικού τραύματος.

Ολες οι βιοψίες είχαν μέγεθος τουλάχιστον 1 x 1 εκατοστόμετρο και αφαιρέθηκαν με σμίλη κατά τέτοιο τρόπο, ώστε, τόσο το περίosteo όσο και η υποκείμενη συμπαγή ουσία να αντιπροσωπεύονται. Μόνο η άκρη της βιοψίας τραυματίστηκε από τη χειρουργική λαβίδα.

Ολες οι βιοψίες μονιμοποιήθηκαν αμέσως μετά την αφαίρεση. Μετά το τέλος της μονιμοποίησης αφαιρέθηκε το περίosteo προσεκτικά με μια ξυριστική λεπίδα.

Για τη μελέτη στο απλό μικροσκόπιο οι βιοψίες μονιμοποιήθηκαν για μια νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου, μέσα σε ουδέτερο ρυθμισμένο (buffered) διάλυμα φορμαλδεύδης 10%, αφυδατώθηκαν και εγκλείστηκαν σε κύβους παραφίνης. Αντικρυστά εφαιπόμενες τομές (mirror sections) χρώστηκαν με την ιστοχημική μέθοδο υπεροξειδάσης, τόσο για τον παράγοντα VIII, όσο και για την λαμινίνη. Επιπλέον τομές χρώστηκαν με αιματοξυλίνη - εωσίνη για κατατοπιστικούς λόγους.

Για τη μελέτη στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο οι βιοψίες μονομοποιήθηκαν αρχικά για δύο ώρες σε μονιμοποιητικό υγρό του Karnovsky και κατόπιν σε διάλυμα OsO_4 . Μετά τη μονιμοποίησή τους αφυδατώθηκαν και εγκλείστηκαν σε κυλίνδρους απο epoxy με τη γνωστή διαδικασία. Εξαιρετικά λεπτές τομές χρώστηκαν με uranyl acetate και κιτρικό μόλυβδο και μελετήθηκαν σε JEOL 100B ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (JEOL Inc., TOKYO).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Το πάχος του περιostίου ήταν διαφορετικό στις διάφορες βιοψίες αλλά η λεπτή κατασκευή (υφή) του ήταν παντού η ίδια: Εσωτερικά, κοντά στο οστόν, οι ίνες του κολλαγόνου ήταν πυκνές και τα αγγεία αραιά. Πιο επιφανειακά η υφή του κολλαγόνου ήταν πιο αραιά και τα αγγεία περισσότερα.

Σε κανένα παρασκεύασμα δεν παρατηρήθηκαν σημεία τραυματισμού, φλεγμονής, εκφυλίσεως ή άλλης παθολογικής διεργασίας.

Και με τις δύο μεθόδους μόνο τριχοειδή αιμαγγεία παρατηρήθηκαν. Σε κανένα παρασκεύασμα δεν ανευρέθηκαν λεμφαγγεία.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Απλή αναφορά στα λεμφαγγεία του περιostίου γίνεται σε ελάχιστες επιστημονικές εργασίες (2,3,5,13,14,21,22), αλλά απόδειξη για την ύπαρξή τους δεν έχει μέχρι σήμερα - καθόσο γνωρίζω - δημοσιευτεί στη διεθνή βιβλιογραφία.

Λεμφαγγεία στις φατνιακές αποφύσεις του οστού της άνω γνάθου, σε παιδιά ηλικίας 11 - 15 ετών, παρατηρήθηκαν στο απλό μικροσκόπιο και φωτογραφήθηκαν από τον Barker (6). Σε ανατομικές και ιστολογικές έρευνες αναφέρεται ότι "η αποχέτευση του μεσοκυτταρίου υγρού των οστών γίνεται μέσα από δαιδαλώδεις αλυσίδες διαδρομών

διαμέσου των σωλήνων του Havers στο περίοστεο, (14), η από τους ίδιους τους σωλήνες του Havers αλλά όχι μέσα από λεμφικά κανάλια που ήταν "πραγματικές ανατομικές μονάδες", (16).

Λεμφαγγειώματα και λεμφαγγειομάτωση των οστών έχουν περιγραφεί(16). Οι περισσότεροι απ'αυτούς τους όγκους, η αμαρτώματα, αναπτύσσονται από λεμφαγγεία της σπογγώδους ουσίας των οστών και όχι από το περίοστεο (18). Οι κακοήθεις όγκοι των οστών δίνουν κυρίως αιματογενείς μεταστάσεις και μόνο σποραδικά μεθίστανται στα γειτονικά λεμφογάγγλια (19). Η μετάσταση αυτή στα λεμφογάγγλια θα μπορούσε να θεωρηθεί σαν απόδειξη υπάρξεως λεμφικού αποχετευτικού συστήματος στον οστίτη ιστό. Είναι όμως τελείως απίθανο ένας κακοήθης όγκος οστού, στο στάδιο των μεταστάσεων, να περιορίζεται στην συμπαγή στοιβάδα και το περίοστεο. Σ'αυτό το στάδιο ο όγκος έχει ήδη διηθήσει γειτονικούς ιστούς που διαθέτουν λεμφαγγεία. Επομένως, ούτε η ύπαρξη καλοήθων όγκων στα οστά, που προέρχονται από λεμφαγγιακό ιστο, ούτε η μετάσταση κακοήθων όγκων των οστών στα γειτονικά λεμφογάγγλια αποτελούν απόδειξη υπάρξεως λεμφαγγείων στο περίοστεο.

Σε αντίθεση με τα μεγάλα λεμφαγγεία, που δεν διαθέτουν ιστολογικά διαφοροποιητικά στοιχεία που να τα ξεχωρίζουν από τα αντίστοιχα αιμαγγεία, τα λεμφοφόρα τριχοειδή δεν διαθέτουν βασική στοιβάδα (basal lamina) όπως τα αιμοφόρα τριχοειδή. Η βασική αυτή στοιβάδα αναγνωρίζεται με βεβαιότητα τόσο με το απλό μικροσκόπιο, μετά από χρώση με αντι-λαμινίνη (12,20,21), όσο και με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο χάρις στην χαρακτηριστική λεπτή κατασκευή (υφή) της (10).

Το ενδοθήλιο τόσο των λεμφοφόρων όσο και των αιμοφόρων τριχοειδών μπορεί να αναγνωριστή με το απλό μικροσκόπιο μετά από χρώση με

αντι-παράγοντα VIII (11) και με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο πάλι χάρις στην λεπτή κατασκευή του.

Επομένως, με το να συγκρίνη κανείς γειτονικές τομές (*mirror sections*) στο απλό μικροσκόπιο και με απλή παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μπορεί κανείς να διαχωρίση τα τριχοειδή αιμαγγεία από τα αντίστοιχα λεμφαγγεία.

Το γεγονός ότι δεν ανευρέθησαν τριχοειδή λεμφαγγεία ούτε με τη μία ούτε με την άλλη μέθοδο επιτρέπει να συμπεράνουμε ότι το ανθρώπινο περιόστεο, η δεν έχει καθόλου τριχοειδή λεμφαγγεία η, αν έχει, τότε αυτά είναι ελάχιστα και τόσο διασπαρμένα, ώστε δεν είναι δυνατό να ανεθρεθούν με μεθόδους που έχουν αποδειχθή αξιόπιστες σε άλλες έρευνες αυτού τού τύπου (10,20,21).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1

Ελεγχος Ανοσοιστοχημικής Μεθόδου για την Απλή Μικροσκοπήση.
Βιοψίες Σκωληκοειδών Αποφύσεων Χωρίς Παθολογικές Αλλοιώσεις.

Αριθ.	Φύλο	Ηλικία	Διάγνωση	Επέμβαση	Λεμφαγγεία
1.	Θυλ.	66	Ογκος Ωοθήκης	Ολική Υστερεκτομή	++
2.	Θυλ.	26	Οξεία κοιλία	Σκωληκοειδεκτομή	+++
3.	Θυλ.	41		Κύστις Bricker	+++
4.	Θυλ.	25	Ενδομητρίωση	Δεξιά Σαλπινγκεκτομή & Σκωληκοειδεκτομή	++
5.	Θυλ.	97	Κύστεις Ωοθηκών	Αφαίρεση Κύστεων & Σκωληκοειδεκτομή	+++
6.	Αρ.	46	Κύστις Μεσεντερίου	Αφαίρεση Κύστης & Σκωληκοειδεκτομή	++
7.	Θυλ.	28	Οξεία κοιλία	Σκωληκοειδεκτομή	+++
8.	Θυλ.	17	Οξεία κοιλία	Σκωληκοειδεκτομή	+++
9.	Θυλ.	48	Ινομύωμα Μήτρας	Σκωληκοειδεκτομή	+++

ΠΙΝΑΚΑΣ 1 (Συνέχεια)

Αριθ.	Φύλο	Ηλικία	Διάγνωση	Επέμβαση	Λεμφαγγεία
10.	Θυλ.	60	Ογκος Ωοθήκης	Βιοψία σιγμοειδούς Επιπλόου & Σκωλ/μή	+++

ΠΙΝΑΚΑΣ 2

Βιοψίες Περιostίου - Απλό Μικροσκόπιο Φάσεων

Αρ.	Φύλο	Ηλικ.	Τοπογρ. Βιοψίας	Επέμβαση	Απόστ.Βιοψ.-τραύμα
1.	Θυλ.	65	Ανω άκρο κνήμης	Hauser	2 εκ.
2.	Θυλ.	13	Ανω άκρο κνήμης	Αφαίρ. εξοστώ- σεως	4 εκ.
3.	Αρ.	73	Εξω κόνδυλος μη- ριαίου	Οστεοσύνθεση έξω κνημ. κονδ.	Φυσιολογικό οστούν
4.	Αρ.	73	Λαγόνιος ακρολο- φία	Οστεοσύνθεση έξω κνημ. κονδ.	Φυσιολογικό οστούν
5.	Αρ.	76	Ανω άκρο μηριαίου	Οστεοσύνθεση αυχένος μηρ.	15 εκ.
6.	Αρ.	13	Εξω κόνδυλος μη- ριαίου	Επιφυσιόδεση κάτω άκρου μηρού	5 εκ.

Οι βιοψίες αριθ. 3 και 4 είναι από τον ίδιο ασθενή.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3

Βιοψίες Περιostίου - Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Αρ.	Φύλο	Ηλικ.	Τοπογρ. Βιοψίας	Επέμβαση	Απόστ.Βιοψ.-τραύμα
1.	Θυλ.	61	Λαγόνιος ακρολοφία	Οστεοσύνθεση έξω κνημ. κονδ.	Φυσιολογικό οστούν
2.	Θυλ.	74	Αυχέννας μηριαίου	Πρόθεση Moore	3 εκ.
3.	Θυλ.	28	Εξω κόνδυλος κνήμης	Διάνοιξη συμπαγούς ουσίας	Φυσιολογικό οστούν
4.	Αρ.	23	Ανω άκρο κνήμης	Οστεοτομία	Φυσιολογικό οστούν
5.	Θυλ.	73	Πρώτη φάλαγξ μεγάλου δακτ.ποδός	Εγχείρηση Keller	1 εκ.
6.	Αρ.	84	Ανω άκρο μηριαίου	Διατροχαντήρια οστεοσύνθεση	5 εκ.
7.	Αρ.	13	Κάτω άκρο μηριαίου	Οστεοτομία	Φυσιολογικό οστούν
8.	Θυλ.	60	Εξω σφυρόν	Οστεοσύνθεση	3 εκ.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3 (Συνέχεια)

Αρ.	Φυλ.	Ηλικ.	Τοπογρ.	Βιοψίας	Επέμβαση	Απόστ.Βιοψ.-τραύμα
9.	Θυλ.	78	Αυχέννας	μηριαίου	Ολική αρθροπλαστική ισχίου	2 εκ.
10.	Θυλ.	62	Αυχέννας	μηριαίου	Ολική αρθροπλαστική ισχίου	2 εκ.
11.	Αρ.	63	Εξω κόνδυλος	κνήμης	Οστεοτομία	1 εκ.
12.	Θυλ.	71	Διάφυση	κερκίδος	Οστεοσύνθεση κατάγμ. αντιβραχίου	2 εκ.
13.	Θυλ.	71	Διάφυση	ωλένης	Οστεοσύνθεση κατάγμ. αντιβραχίου	2 εκ.
14.	Θυλ.	71	Εξω κόνδυλος	μηριαίου	Ολική αρθροπλαστική γόνατος	3 εκ.
15.	Αρ.	50	Ανω άκρο	κνήμης	Διάτρηση (fenestratio)	2 εκ.

Οι βιοψίες αριθ. 12 και 13 είναι από τον ίδιο ασθενή.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3 (Συνέχεια)

Αριθ.	Φύλο	Ηλικ.	Τοπογρ.	Βιοψίας	Επέμβαση	Απόστ.Βιοψ.-τραύμα
16.	Αρ.	56	Κνημιαίο κύρτωμα	Ολική αρθροπλαστική γόνατος		1,5εκ.
17.	Αρ.	23	Διάφυση περόνης	Πλαστική έξω σφυρού (Evans)		Φυσιολογικό οστούν

ENGLISH SUMMARY

Lymphatic drainage from bone and periosteum is still a matter of discussion. Whereas most research workers agree that compact bone does not contain lymphatic vessels (5,6,7,8,9), some maintain that "osseous lymph" drains via Lymphatics of the periosteum (6). Large lymphatics have no characteristic morfologic feature that clearly distinguishes them from blood vessels of similar size. These lymphatics, therefore, can be recognized with some degree of certainty only by injection techniques, a method not readily clinically applicable. On the other hand, lymphatic capillaries lack a basal lamina and in this respect differ from blood capillaries (10). Accordingly, using light microscopy (LM) and transmission electron microscopy (TEM), periosteum can be examined in order to detect small endothelial-lined vascular channels without basal lamina (i.e. lymphatic capillaries). LM has the advantage that relatively large areas can be examined. Its disadvantages are that endothelium and basal lamina cannot be visualised in the same section, and therefore nearby or adjacent sections (mirror sections) have to be compared. By contrast TEM allows endothelium and basal lamina, each with its characteristic ultrastructure (10), to be detected in the same section. The main disadvantage of TEM is that only comparatively small amounts of tissue can be examined at one time. Used together, however, LM and TEM should provide a reliable assesment of whether periosteum contains lymphatic capillaries or not. In the present study, 23 periosteal biopsies from 22 patients operated upon in the orthopedic department at Herlev Hospital were examined. All specimens were exised as remote from the

operated fracture or osteotomy site as technically feasible and appeared grossly as normal periosteum. Both periosteum and the underlying compact bone were represented. Each specimen was fixed promptly after removal and after completed fixation the periosteum was gently freed from the underlying bone with a sharp razor blade. 6 specimens were fixed in formalin, dehydrated and embedded in paraffin. Adjacent sections were stained by the immunoperoxi-dase method for factor VIII and for laminin and examined with light microscopy. 17 specimens were fixed in Karnowski's fixative, postfixed in OsO_4 , dehydrated and epoxy embedded. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined using a JEOL 100B electron microscope. Irrespective of the method of examination, only blood capillaries were depicted. In none of the specimens were lymphatic capillaries seen.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Olszewski, WL., Z Sawicki:** Radiological Evidence of Lymphatic Drainage of Bone Marrow Cavity in Long Bones. *Lymphology* 10 (1977), 1-4.
2. **Williams, PL & R. Warwick (Eds.):** Gray's Anatomy. Churchill Livingstone, Edinburgh London Melbourne and New York (1980), p. 259.
3. **Αποστολάκη, Γ:** Εγχειρίδιον Ανατομικής του Ανθρώπου. Τιλπέρογλου, Αθήναι (1955) Τόμος Α, σ. 47.
4. **Collins, DH:** Pathology of Bone. Butterworths, London (1966), 6-8.
5. **Cooper, RR, JW Milgram, RA Robinson:** Morphology of the Osteon. *J. Bone and Joint Surgery* 48A(1966), 1239-1271.
6. **Seliger, WG:** Tissue fluid Movement in Compact Bone. *Anatomical Records* 166(1970), 247-256.
7. **Barker, JH:** Lymphatic Vessels in Human Alveolar Bone. *Lymphology* 15(1982), 1-13.
8. **Kelly, PJ, LFA Peterson:** Lymphatics of Bone. In: Abramson, DI (Ed.): *Blood Vessels and Lymphatics*. Academic Press, New York (1962), p. 544.
9. **Hudson, G, JM Yoffey:** Ultrastructure of reticulo-

- endothelial elements in guinea-pig bone marrow. *J. Anat.* 103(1965), 515-525.
10. **Leak, LV:** Lymphatic Vessels. In: Johannessen, JV (Ed.) *Electron Microscopy in Human Medicine. Vol. 5. Cardiovascular system, Lymphoreticular and Hematopoietic System.* McGraw-Hill International Book Company, New York, (1980), pp. 164-212.
 11. **Sehested, M, K. Hou-Jensen:** Factor VIII Related antigen as an Endothelial Cell Marker in Benign and Malignant Diseases. *Virchows Arch. (Pathol Anat)* 391(1981), 217-225.
 12. **Albrechtsen, R, UM Wewer, LA Liotta:** Basement membranes in Human Cancer. In: Sommers, SS, PP Rosen, RE Fechner (Eds.): *Pathology Annual Part 2, Vol. 21* (1986), pp. 251-276.
 13. **Karnovsky, MJ:** A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27(1965) 137A.
 14. **Oshkaderov, B:** Lymphatic vessels in long bones of man and domestic animals. *Khirurgija (Moskva)* 12(1949), 49-54.

15. **Ossof, RH, DE Bytell, MH Hast, et al.:** Lymphatics of the floor of the mouth and periosteum: Anatomical studies with possible clinical correlations. *Otolaryngol Head Neck Surg* 88(1980), 652-657.
16. **Anderson, DW:** Studies of the lymphatic pathways of bone and bone marrow. *J Bone and Joint Surgery* 42A(1960), 716-717.
17. **Hafner, E, WA Fuchs, F Kuffer:** Lymphangiography in Lymphangiomatosis of Bone. *Lymphology* 5(1972), 129-131.
18. **Spjut, HJ, HD Dorfman, RE Fehner and LV Ackerman:** Tumors of Bone and Cartilage. In: *Atlas of Tumor Pathology, Second Series, Fascicle 5*. Castle House Publications, London(1979), 329-330.
19. **Makai, F, A Belan, P Malek:** Lymphatic Metastases of Bone Tumors. *Lymphology* 3(1971), 109-116.
20. **Barsky, SH, A Baker, GP Siegal, et al.:** Use of anti-basement membrane antibodies to distinguish blood vessel capillaries from lymphatic capillaries. *Am J Surg Pathol* 7(1983), 667-677.
21. **Hultberg, BM, S Daugaard, HF Johansen, et al.:** Malignant haemangiopericytomas and haemangioendotheliosarcomas: an immunohistological study. *Histopathology* 12(1988), 405-414.

22. **Deysine, M.:** Lymphatic space in cortical bone. Anatomy and physiology. Abstracts 4th Congress of International Lymphological Society, Tucson, Arizona, March 6-10,(1973), p. 32.
23. Trueta, J.: The Role of Vessels in Osteogenesis. J.Bone and Joint Surg., 45-B: 402-418, May 1963.
24. **Albrechtsen, R, UM Weber, LA Liotta:** Immunohistochemical Localization of the Basement Membrane Component Laminin in Human Cancer. Laboratory Investigation, Vol. 52, No.1,p.1A, 1985.
25. **Ekblom, P, M Miettinen, J Rapola, J-M Foidart:** Demonstration of Laminin, a Basement Membrane Glycoprotein, in Routinely Processed Formaline-Fixed Human Tissues. Histochemistry (1982) 75:301-307.
26. **Franchi, G, I Reyers-Degli Innocenti, S Garattini, O Alfieri, G Cademartiri, G Ottaviani:** Lymphatic Dissemination of Cancer Cells in Mice Transplanted Intratibially with Erlich Carcinoma. Lymphology 5 (1972) 31-36.
27. **Leak, LV, MP Jamuar:** Ultrastructure of Pulmonary Lymphatic Vessels. Am Rev Respir Dis (1983) 128:S65-S68.
28. **Feind, CR, RM Cole:** Cancer of the Floor of the Mouth and Its Lymphatic Spread. The American Journal of Surgery,

- (1968) 116:482-486.
29. **Fader, R, A Ewert, D Folse:** Thrombus Formation in Lymphatic Vessels Associated with *Brugia malayi*. *Lymphology* 17 (1984) 3-9.
 30. **Hokazono, K, M Miyoshi:** Scanning- and transmission electron microscopic study of lymphatic vessels in splenic white pulp of the macaque monkey. *Cell Tissue Res* (1984) 237:1-6.
 31. **Azzali, G, G Romita, R Gatti:** Ultrastruttura dei vasi linfatici della vescica urinaria. *Acta Bio-Medica de l'Ateneo Parmense* (1983) 54:105-115.
 32. **Paweletz, N, H-O Werling, P Aulenbacher, E Spiess:** Morfological and Behavioral Characteristics of Two Rat Tumor Cell Lines with Different Metastatic Capacities. *Scanning Electron Microscopy* (1984) II:783-792.
 33. **Evan, AP, WG Dail, D Dammrose, C Palmer:** Scanning Electron Microscopy of Cell Surfaces Following Removal of Extracellular Material. *Anat. Rec.* (1976) 185:433-446.
 34. **Pucci, AM, L Ibba, A Bastianini, C Fruschelli:** Studio Morfologico al Microscopio Elettronico a Scansione (SEM) dei Vasi Linfatici di Cavia. *Boll. Soc. It. Biol. Sper.* (1984) Vol. LX, n.9:1635-1641.
 35. **Cetta, F, G Tanzini, L Fonzi:** Vasos Comunicantes Linfaticos

en los Miembros Inferiores del Hombre. *Angiologia* (1982) Vol. XXXIV, n. 4:179-182.

36. **Taylor, CR:** Immunoperoxidase Techniques - Practical and Theoretical Aspects. *Arch Pathol Lab Med* (1978) 102:113-120.
37. **Horn, T:** Den normale og den alkoholbeskadigede humane "Blood-Hepatocyt Barriere". Thesis. FADL's Forlag. Koebenhavn, Aarhus, Odense. ISBN 87-7437-407-9.
38. **Jacobsen, M:** The Occurance and Localisation of Certain Plasma Proteins in the Developing Brain, their Possible Origin and Functional Significance - An Immunohistochemical Study. Thesis. DSR Tryk. ISBN 87-982139-1-1.
39. **Svanholm, H, K Nielsen, P Hauge:** Factor VIII-related antigen and lymphatic collecting vessels. *Virchows Arch. (Pathol. Anat.)* 404, 223-288, 1984.
40. **Coons, AH, HJ Creech, N Jones:** Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 47 (1941) 200-202.
41. **Coons, AH, HJ Creech, N Jones, E Berliner:** The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. *J. Immunol.*, 45 (1942) 159-170.
42. **Ram, JS, PK Nakane, DG Rawlinson, GB Pierce:** Enzyme-

- labelled antibodies for ultrastructural studies. Fed. Proc., 25 (1966) 732.
43. **Avrameas, S, J Uriel:** Methode de marquage d'antigenes et d'anticorps avec des enzymes et son application et immunodiffusion. C. R. Acad. Sci. Ser. D., 262 (1966) 2543-2545.
 44. **Nakane, PK, GB Pierce:** Enzyme-labelled antibodies: Preparation and application for the localisation of antigens. J. Histochem. Cytochem., 14 (1966) 929-931.
 45. **Avrameas, S, T Ternynck:** Peroxydase labelled antibody and Fab conjugates with enhanced intracellular penetration. Immunochemistry, 8 (1971) 1175-1179.
 46. **Taylor, CR, J Burns:** The demonstration of plasma cells and other immunoglobulin-containing cells in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using peroxidase-labelled antibody. J. Clin. Pathol., 27 (1974) 14-20.
 47. **Sternberger, LA, JJ Cuculis:** Method for enzymatic intensification of the immunocytochemical reaction without use of labelled antibodies. J. Histochem. Cytochem., 17 (1969) 190.
 48. **Mason, TE, RF Phifer, SS Spicer, RS Swallow, RD Dreskin:** Immunochemical technique for localisation of intracellular tissue antigen. J. Histochem. Cytochem., 17 (1969) 563-564.
 49. **Sternberg, LA, PH Hardy, JJ Cuculis, HG Meyer:** The

unlabelled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase - anti-horseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.*, 18 (1970) 315-33.

50. **Σκλαβούνου, ΓΛ:** Ανατομική του Ανθρώπου. Τόμος 1, 117-118.
51. **Weakley, BS:** A Beginner's Handbook in Biological Electron Microscopy. Churchill Livingstone. Edinburgh and London. 1972.
52. **Meek, GA:** Practical Electron Microscopy for Biologists. Wiley-Interscience, a division of John Wiley & Sons Ltd. London New York Sydney Toronto. 1970.
53. **Hayat, MA:** Principles and Techniques of Electron Microscopy: Biological Applications. Van Nostrand Reinhold Company. New York/Cincinnati/Toronto/London/Melbourne. 1970.
54. **Papamiltiades, M:** Injection of Lymphatics: with Colored Cedar Oil, with Plastic. *Stain Technology*, 241-245.