

Univerza v Ljubljani
Veterinarska fakulteta



Marko Cvetko

**DOLOČANJE POSMRTNEGA INTERVALA Z
UGOTAVLJANJEM VIABILNOSTI HONDROCITOV V
KOLENSKEM SKLEPU PRAŠIČEV**

Doktorska disertacija

Ljubljana, 2024

Univerza v Ljubljani
Veterinarska fakulteta



Interdisciplinarni študijski program Biomedicina
Veterinarska medicina

UDK 534.321.2:604.7:616-036.88:616.71-018.3:616.728.3(043.3)

Marko Cvetko, dr. vet. med.

**DOLOČANJE POSMRTNEGA INTERVALA Z
UGOTAVLJANJEM VIABILNOSTI HONDROCITOV V
KOLENSKEM SKLEPU PRAŠIČEV**

Doktorska disertacija

**DETERMINATION OF THE POST-MORTEM INTERVAL BY
ASSESSING THE VIABILITY OF CHONDROCYTES IN THE
KNEE JOINT OF PIGS**

Doctoral dissertation

Ljubljana, 2024

Marko Cvetko

Določanje posmrtnega intervala z ugotavljanjem viabilnosti hondrocitov v kolenskem sklepu prašičev

Delo je bilo opravljeno na/v:

- Inštitutu za patologijo, divjad, ribe in čebele Veterinarske fakultete UL
- Zoo Ljubljana
- Inštitutu Jožef Stefan

Javni zagovor je bil opravljen: v Ljubljani, dne

Mentor:izr. prof. dr. Mitja Gombač, dr. vet. med.

Somentor: doc. dr. Armin Alibegović, dr. med.

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Milka Vrecl Fazarinc, dr. vet. med.

Članica:izr. prof. dr. Tanja Švara, dr. vet. med.

Član: prof. dr. sc. Krešimir Severin, dr. vet. med.

Izjava o delu:

Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so rezultati korektno navedeni in da nisem kršil avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu.

IZVLEČEK

Ključne besede: posmrtni interval – PMI; sklepni hrustanec; prašiči; letni čas; konfokalni laserski skenirni mikroskop – CLSM; tripansko modrilo – TM; viabilnost; žuželke

Namen raziskave je določanje posmrtnega intervala (PMI) z ugotavljanjem viabilnosti hondrocitov v kolenskem sklepu prašičev z metodo s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom (CLSM) in z metodo s tripanskim modrilom (TM) v različnih letnih časih. Zadnje okončine prašičev smo zakopali v 50 cm globok grob ali pustili na površini. Iz kolenskih sklepov okončin smo odvzeli vzorce hrustanca na dan evtanazije in nato v enodnevnih intervalih naslednje 4 dni ter 8. in 10. dan po evtanaziji. Naredili smo rezine hrustanca, ki smo jih obarvali z barvili kalcein-AM (Ca-AM) in ethidijev homodimer-1 (EthD-1), preostanek hrustanca pa raztopili, izolirali hondrocite in jih obarvali s TM. Postopek smo ponovili v vseh letnih časih. Viabilnost hondrocitov je v vseh letnih časih padala v odvisnosti od časa po evtanaziji in temperature okolice. Padec viabilnosti je bil na začetku majhen in je ustrezal obdobju platoja (obdobje majhnega, statistično neznačilnega padca viabilnosti), sledil je velik in statistično značilen padec, ki je bil največji in je nastopil najhitreje poleti, nekoliko kasneje jeseni in pozimi, najkasneje pa spomladi. Ugotovili smo, da je bil delež viabilnih hondrocitov v vseh obdobjih, z izjemo jesenskega, statistično značilno višji v hrustancih kolenskih sklepov zakopanih okončin. Menimo, da je to posledica izolacijske sposobnosti prsti, ki je v grobovih vzdrževala stabilnejšo, poleti nižjo, v ostalih letnih časih pa višjo temperaturo kot na površju. Tudi med letnimi časi smo ugotovili razliko v deležu viabilnih hondrocitov, ki je najverjetneje posledica spreminjajočih se dejavnikov okolja, predvsem nihajočih temperatur in vpliva žuželk, ki so poleti obzrle mehka tkiva okončin v enem tednu. Ugotovili smo, da je metoda s CLSM zanesljiva metoda za določanje PMI na podlagi viabilnosti hondrocitov v kolenskem sklepu prašičev. V vseh letnih časih, razen poleti, je bila variabilnost deležev viabilnih hondrocitov na posamezen dan višja pri metodi s TM kot pri metodi s CLSM, zato menimo, da je metoda s CLSM natančnejša metoda za ugotavljanje PMI na podlagi deleža viabilnih hondrocitov.

ABSTRACT

Keywords: postmortem interval - PMI; articular cartilage; pigs; season; confocal laser scanning microscope – CLSM; trypan blue – TM; viability; insects

The aim of this study was to determine the PMI by assessing the viability of chondrocytes in the knee joints of pigs via the CLSM method and the TM method in different seasons. The hind legs of the pigs were buried in a 50 cm deep grave or left on the surface. Cartilage samples were collected on the day of euthanasia (Day 1), then daily for 4 days and on the 8th and 10th days. The cartilage sections were stained with Ca-AM and EthD-1, the remaining cartilage was dissolved, and the chondrocytes were isolated and stained with TM. The study was repeated in all four seasons.

We found a time- and temperature-dependent decrease in chondrocyte viability in all four seasons. Initially, this decrease was small and corresponded to the plateau phase (a period with a small, statistically insignificant decrease in viability). However, a larger and statistically significant decline was subsequently observed, which was the largest and occurred most rapidly in summer, somewhat later in fall and winter, and latest in spring. We found that the proportion of viable chondrocytes in the articular cartilage of the knee was significantly greater in the buried limbs than in the control limbs during all periods except the fall. We hypothesise that this is due to the insulating capacity of the soil, which maintains a more stable temperature in the graves, which is lower in summer and higher in the other seasons than the on surface. We detected a difference in the proportion of viable chondrocytes between seasons, most likely due to changing environmental factors, especially fluctuating temperatures and the influence of insects that consumed the soft tissues of the limbs within a week in summer. We found that the CLSM method is a reliable method for determining the PMI on the basis of the viability of chondrocytes in the knee joints of pigs. In all seasons except summer, the variability of the proportion of viable chondrocytes on a single day was greater with the TM method than with the CLSM method, so we believe that the CLSM method is a more accurate method for determining the PMI on the basis of proportion of viable chondrocytes.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	23
1.1	NAMEN	24
1.2	HIPOTEZE	24
2	PREGLED LITERATURE	25
2.1	POSMRTNI INTERVAL (PMI)	25
2.2	RAZKROJ TRUPLA.....	28
2.3	VPLIV OKOLJA NA RAZKROJ	30
2.3.1	Temperatura.....	30
2.3.2	Vlaga	31
2.3.3	pH	32
2.3.4	Kisik.....	32
2.3.5	Mikrobiota	32
2.3.6	Žuželke.....	33
2.3.7	Mrhovinarji	34
2.4	VPLIV ZAKOPA NA RAZKROJ TRUPLA.....	35
2.5	ZGRADBA HRUSTANCA	36
2.5.1	Zgradba sklepnega hrustanca.....	38
2.6	HRUSTANEC KOT PREDELEK	38
2.7	METODE DOLOČANJA VIABILNOSTI HONDROCITOV	39
2.7.1	Ca-AM in EthD-1	39
2.7.2	Tripansko modriilo (TM).....	40
2.8	VIABILNOST HONDROCITOV	40
2.9	TAFONOMSKE RAZISKAVE	42
3	MATERIAL IN METODE	43
3.1	PILOTSKA RAZISKAVA.....	43
3.2	VZORCI	45
3.3	METODA S KONFOKALNO MIKROSKOPIJO	48
3.4	OBDELAVA SLIK	49
3.5	METODA S TRIPANSKIM MODRILOM	50
3.6	ENTOMOLOGIJA	51
3.7	STATISTIČNA ANALIZA.....	51
4	REZULTATI.....	53

4.1	REZULTATI RAZTELESBE	53
4.2	REZULTATI METODE S CLSM	53
4.2.1	Jesen	55
4.2.2	Zima	57
4.2.3	Pomlad.....	60
4.2.4	Poletje.....	63
4.3	REZULTATI METODE S TRIPANSKIM MODRILOM.....	66
4.3.1	Jesen	67
4.3.2	Zima	69
4.3.3	Pomlad.....	72
4.3.4	Poletje.....	75
4.4	PRIMERJAVA REZULTATOV METODE S CLSM IN S TM	78
4.4.1	Jesen	78
4.4.2	Zima	80
4.4.3	Pomlad.....	82
4.4.4	Poletje.....	84
4.5	REGRESIJSKI MODEL	86
4.6	REZULTATI ENTOMOLOŠKE PREISKAVE	88
4.6.1	Pomlad.....	88
4.6.2	Poletje.....	88
5	RAZPRAVA	93
6	ZAKLJUČKI.....	105
7	POVZETEK	106
8	SUMMARY	109
9	ZAHVALA.....	112
10	LITERATURA.....	113
11	PRILOGE.....	129
11.1	PRILOGA 1	129
11.2	PRILOGA 2	133
11.3	PRILOGA 3	137

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz agrekana.....	37
Figure 1: Schematic representation of an aggregan	37
Slika 2: Prikaz groba.	46
Figure 2: Example of a grave.....	46
Slika 3: Način rezanja vzorcev hrustanca pri metodi s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom.....	48
Figure 3: Sample cutting for the confocal laser scanning microscope method.....	48
Slika 4: Slike s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom.....	49
Figure 4: Confocal laser scanning microscope images	49
Slika 5: Hondrociti, obarvani s tripanskim modrilom.	50
Figure 5: Trypan blue-stained chondrocytes.....	50
Slika 6: Delci celične membrane.	53
Figure 6: Cell membrane particles.....	53
Slika 7: Primerjava deležev viabilnih hondrocitov med sklepnimi hrustanci kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih zadnjih okončin jeseni na dan vzorčenja pri metodi s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom.....	56
Figure 7: Comparison of the proportion of viable chondrocytes between the articular cartilages of the knee joints of buried and unburied hind legs in the fall on the day of sampling via the confocal laser scanning microscope method.....	56
Slika 8: Primerjava deležev viabilnih hondrocitov med sklepnimi hrustanci kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih zadnjih okončin pozimi na dan vzorčenja pri metodi s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom.....	59

Figure 8: Comparison of the proportion of viable chondrocytes between the articular cartilages of the knee joints of buried and unburied hind legs in winter on the day of sampling via the confocal laser scanning microscope method.....59

Slika 9: Primerjava deležev viabilnih hondrocitov med sklepnimi hrustanci kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih zadnjih okončin spomladi na dan vzorčenja pri metodi s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom.....62

Figure 9: Comparison of the proportion of viable chondrocytes between the articular cartilages of the knee joints of buried and unburied hind legs in spring on the day of sampling via the confocal laser scanning microscope method.....62

Slika 10: Primerjava deležev viabilnih hondrocitov med sklepnimi hrustanci kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih zadnjih okončin poleti na dan vzorčenja pri metodi s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom.....65

Figure 10: Comparison of the proportion of viable chondrocytes between the articular cartilages of the knee joints of buried and unburied hind legs in summer on the day of sampling via the confocal laser scanning microscope method.....65

Slika 11: Primerjava deležev viabilnih hondrocitov med sklepnimi hrustanci kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih zadnjih okončin jeseni na dan vzorčenja pri metodi s tripanskim modrilom68

Figure 11: Comparison of the proportion of viable chondrocytes between the articular cartilages of the knee joints of buried and unburied hind legs in the fall on the day of sampling via the trypan blue method68

Slika 12: Primerjava deležev viabilnih hondrocitov med sklepnimi hrustanci kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih zadnjih okončin pozimi na dan vzorčenja pri metodi s tripanskim modrilom71

Figure 12: Comparison of the proportion of viable chondrocytes between the articular cartilages of the knee joints of buried and unburied hind legs in winter on the day of sampling via the trypan blue method71

Slika 13: Primerjava deležev viabilnih hondrocitov med sklepnimi hrustanci kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih zadnjih okončin spomladi na dan vzorčenja pri metodi s tripanskim modrilom74

Figure 13: Comparison of the proportion of viable chondrocytes between the articular cartilages of the knee joints of buried and unburied hind legs in spring on the day of sampling via the trypan blue method74

Slika 14: Primerjava deležev viabilnih hondrocitov med sklepnimi hrustanci kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih zadnjih okončin poleti na dan vzorčenja pri metodi s tripanskim modrilom77

Figure 14: Comparison of the proportion of viable chondrocytes between the articular cartilages of the knee joints of buried and unburied hind legs in summer on the day of sampling via the trypan blue method77

Slika 15: Primerjava deleža viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov nezakopanih (A) in zakopanih (B) zadnjih okončin med metodo s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom in metodo s tripanskim modrilom jeseni na dan vzorčenja79

Figure 15: Comparison of the proportions of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of unburied (A) and buried (B) hind legs between the confocal scanning microscopy method and the trypan blue method in the fall on the day of sampling79

Slika 16: Primerjava deleža viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov nezakopanih (A) in zakopanih (B) zadnjih okončin med metodo s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom in metodo s tripanskim modrilom pozimi na dan vzorčenja81

Figure 16: Comparison of the proportions of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of unburied (A) and buried (B) hind legs between the confocal scanning microscopy method and the trypan blue method in winter on the day of sampling81

Slika 17: Primerjava deleža viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov nezakopanih (A) in zakopanih (B) zadnjih okončin med metodo s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom in metodo s tripanskim modrilom spomladi na dan vzorčenja83

Figure 17: Comparison of the proportions of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of unburied (A) and buried (B) hind legs between the confocal scanning microscopy method and the trypan blue method in spring on the day of sampling83

Slika 18: Primerjava deleža viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov nezakopanih (A) in zakopanih (B) zadnjih okončin med metodo s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom in metodo s tripanskim modrilom poleti na dan vzorčenja85

Figure 18: Comparison of the proportions of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of unburied (A) and buried (B) hind legs between the confocal scanning microscopy method and the trypan blue method in summer on the day of sampling.....85

Slika 19: Prikaz povprečnega deleža viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih zadnjih okončin (točka) in standardne napake (ročaja) na dan vzorčenj glede na zakop okončin..... 87

Figure 19: Representation of the average percentage of viable chondrocytes in the buried and unburied articular cartilages (dot) and the standard error (bar) per sampling day depending on the burial of the sample.....87

Slika 20: Prikaz povprečnega deleža viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih zadnjih okončin (točka) in standardne napake (ročaja) na dan vzorčenj glede na letni čas 87

Figure 20: Representation of the average percentage of viable chondrocytes in the buried and unburied articular cartilages (dot) and the standard error (bar) per sampling day depending per season87

Slika 21: Nezakopane zadnje okončine poleti – 2. dan vzorčenja..... 90

Figure 21: Unburied hind legs in summer – 2nd day of sampling.....90

Slika 22: Nezakopane zadnje okončine poleti – 3. dan vzorčenja..... 90

Figure 22: Unburied hind legs in summer – 3rd day of sampling90

Slika 23: Nezakopane zadnje okončine poleti – 4. dan vzorčenja..... 91

Figure 23: Unburied hind legs in summer – 4th day of sampling91

Slika 24: Nezakopane zadnje okončine poleti – 5. dan vzorčenja..... 91

Figure 24: Unburied hind legs in summer – 5th day of sampling91

Slika 25: Nezakopane zadnje okončine poleti – 8. dan vzorčenja..... 92

Figure 25: Unburied hind legs in summer – 8th day of sampling92

Slika 26: Prikaz padca deleža viabilnih hondrocitov jeseni z uporabo metode s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom..... 129

Figure 26: An example of the decrease in the proportion of viable chondrocytes in the fall observed via confocal laser scanning microscopy method129

Slika 27: Prikaz padca deleža viabilnih hondrocitov pozimi z uporabo metode s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom..... 130

Figure 27: An example of the decrease in the proportion of viable chondrocytes in winter observed via confocal laser scanning microscopy method130

Slika 28: Prikaz padca deleža viabilnih hondrocitov pomladi z uporabo metode s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom..... 131

Figure 28: An example of the decrease in the proportion of viable chondrocytes in spring observed via confocal laser scanning microscopy method131

Slika 29: Prikaz padca deleža viabilnih hondrocitov poleti z uporabo metode s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom..... 132

Figure 29: An example of the decrease in the proportion of viable chondrocytes in summer observed via confocal laser scanning microscopy method.....132

Slika 30: Krivulje prikazujejo povprečje in standardno napako v deležu viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih zadnjih okončin jeseni z uporabo metode s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom..... 133

Figure 30: The curves show the mean value and standard error of the proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of buried and unburied hind legs in the fall via confocal laser scanning microscopy method.....133

Slika 31: Krivulje prikazujejo povprečje in standardno napako v deležu viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih zadnjih okončin pozimi z uporabo metode s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom..... 134

Figure 31: The curves show the mean value and standard error of the proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of buried and unburied hind legs in winter via confocal laser scanning microscopy method.....134

Slika 32: Krivulje prikazujejo povprečje in standardno napako v deležu viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih zadnjih okončin spomladi z uporabo metode s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom..... 135

Figure 32: The curves show the mean value and standard error of the proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of the knee joints of buried and unburied hind legs in spring via confocal laser scanning microscopy method.....135

Slika 33: Krivulje prikazujejo povprečje in standardno napako v deležu viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih zadnjih okončin poleti z uporabo metode s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom..... 136

Figure 33: The curves show the mean value and standard error of the proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of the knee joints of buried and unburied hind legs in summer via confocal laser scanning microscopy method.....136

Slika 34: Krivulje prikazujejo povprečje in standardno napako v deležu viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih zadnjih okončin jeseni z uporabo metode s tripanskim modrilom..... 137

Figure 34: The curves show the mean value and standard error of the proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of the knee joints of buried and unburied hind legs in fall via trypan blue dye method.....137

Slika 35: Krivulje prikazujejo povprečje in standardno napako v deležu viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih zadnjih okončin pozimi z uporabo metode s tripanskim modrilom..... 138

Figure 35: The curves show the mean value and standard error of the proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of buried and unburied hind legs in winter via trypan blue dye method.....138

Slika 36: Krivulje prikazujejo povprečje in standardno napako v deležu viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih okončin spomladi z uporabo metode s tripanskim modrilom..... 139

Figure 36: The curves show the mean value and standard error of the proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of buried and unburied hind legs in spring via trypan blue dye method.....139

Slika 37: Krivulje prikazujejo povprečje in standardno napako v deležu viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih okončin poleti z uporabo metode s tripanskim modrilom..... 140

Figure 37: The curves show the mean value and standard error of the proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of buried and unburied hind legs in summer via trypan blue dye method.....140

KAZALO TABEL

Tabela 1: Temperature na področju zakopa in podatki o relativni vlagi, padavinah, povprečni, najvišji in najnižji temperaturi z glavne meteorološke postaje.	47
Table 1: Burial area temperatures and data on relative humidity, precipitation, and average, maximum and minimum temperatures from the main meteorological station.....	47
Tabela 2: Delež viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov nezakopanih zadnjih okončin (%) na dan vzorčenja jeseni in rezultati Kruskal–Wallisovega testa v primerjavi s prvim dnem z uporabo metode s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom.....	55
Table 2: Proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of unburied hind legs (%) by day of sampling in the fall and Kruskal–Wallis test results compared to the first day via the confocal laser scanning microscope method.....	55
Tabela 3: Delež viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov zakopanih zadnjih okončin (%) na dan vzorčenja jeseni in rezultati Kruskal–Wallisovega testa v primerjavi s prvim dnem z uporabo metode s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom.....	55
Table 3: Proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of buried hind legs (%) by day of sampling in the fall and Kruskal–Wallis test results compared to the first day via the confocal laser scanning microscope method.....	55
Tabela 4: Delež viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov nezakopanih zadnjih okončin (%) na dan vzorčenja pozimi in rezultati Kruskal–Wallisovega testa v primerjavi s prvim dnem z uporabo metode s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom	58
Table 4: Proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of unburied hind legs (%) by day of sampling in winter and Kruskal–Wallis test results compared to the first day via the confocal laser scanning microscope method.....	58
Tabela 5 : Delež viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov zakopanih zadnjih okončin (%) na dan vzorčenja pozimi in rezultati Kruskal–Wallisovega testa v primerjavi s prvim dnem z uporabo metode s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom.	58

Table 5: Proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of buried hind legs (%) by day of sampling in winter and Kruskal–Wallis test results compared to the first day via the confocal laser scanning microscope method.....58

Tabela 6 : Delež viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov nezakopanih zadnjih okončin (%) na dan vzorčenja spomladi in rezultati Kruskal–Wallisovega testa v primerjavi s prvim dnem z uporabo metode s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom. 61

Table 6: Proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of unburied hind legs (%) by day of sampling in spring and Kruskal–Wallis test results compared to the first day via the confocal laser scanning microscope method.....61

Tabela 7: Delež viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov zakopanih zadnjih okončin (%) na dan vzorčenja spomladi in rezultati Kruskal–Wallisovega testa v primerjavi s prvim dnem z uporabo metode s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom.61

Table 7: Proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of buried hind legs (%) by day of sampling in spring and Kruskal–Wallis test results compared to the first day via the confocal laser scanning microscope method.....61

Tabela 8: Delež viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov nezakopanih zadnjih okončin (%) na dan vzorčenja poleti in rezultati Kruskal–Wallisovega testa v primerjavi s prvim dnem z uporabo metode s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom. 64

Table 8: Proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of unburied hind legs (%) by day of sampling in summer and Kruskal–Wallis test results compared to the first day via the confocal laser scanning microscope method.....64

Tabela 9 : Delež viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov zakopanih zadnjih okončin (%) na dan vzorčenja poleti in rezultati Kruskal–Wallisovega testa v primerjavi s prvim dnem z uporabo metode s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom..... 64

Table 9: Proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of buried hind legs (%) by day of sampling in summer and Kruskal–Wallis test results compared to the first day via the confocal laser scanning microscope method.....64

Tabela 10: Delež viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov nezakopanih zadnjih okončin (%) na dan vzorčenja jeseni in rezultati Kruskal–Wallisovega testa v primerjavi s prvim dnevom z uporabo metode s tripanskim modrilom.67

Table 10: Proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of unburied hind legs (%) by day of sampling in the fall and Kruskal–Wallis test results compared to the first day via the trypan blue method.....67

Tabela 11: Delež viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov zakopanih zadnjih okončin (%) na dan vzorčenja jeseni in rezultati Kruskal–Wallisovega testa v primerjavi s prvim dnevom z uporabo metode s tripanskim modrilom.67

Table 11: Proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of buried hind legs (%) by day of sampling in the fall and Kruskal–Wallis test results compared to the first day via the trypan blue method.....67

Tabela 12: Delež viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov nezakopanih zadnjih okončin (%) na dan vzorčenja pozimi in rezultati Kruskal–Wallisovega testa v primerjavi s prvim dnevom z uporabo metode s tripanskim modrilom.70

Table 12: Proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of unburied hind legs (%) by day of sampling in winter and Kruskal–Wallis test results compared to the first day via the trypan blue method.....70

Tabela 13: Delež viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov zakopanih zadnjih okončin (%) na dan vzorčenja pozimi in rezultati Kruskal–Wallisovega testa v primerjavi s prvim dnevom z uporabo metode s tripanskim modrilom.70

Table 13: Proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of buried hind legs (%) by day of sampling in winter and Kruskal–Wallis test results compared to the first day via the trypan blue method.....70

Tabela 14: Delež viabilnih hondrocitov v sklepni hrustanici kolenskega sklepa nezakopanih zadnjih okončin (%) na dan vzorčenja spomladi in rezultati Kruskal–Wallisovega testa v primerjavi s prvim dnevom z uporabo metode s tripanskim modrilom.73

Table 14: Proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of unburied hind legs (%) by day of sampling in spring and Kruskal–Wallis test results compared to the first day via the trypan blue method.....73

Tabela 15: Delež viabilnih hondrocitov v sklepni hrustanici kolenskega sklepa zakopanih zadnjih okončin (%) na dan vzorčenja spomladi in rezultati Kruskal–Wallisovega testa v primerjavi s prvim dnevom z uporabo metode s tripanskim modrilom.73

Table 15: Proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of buried hind legs (%) by day of sampling in spring and Kruskal–Wallis test results compared to the first day via the trypan blue method.....73

Tabela 16: Delež viabilnih hondrocitov v sklepni hrustanici kolenskega sklepa nezakopanih zadnjih okončin (%) na dan vzorčenja poleti in rezultati Kruskal–Wallisovega testa v primerjavi s prvim dnevom z uporabo metode s tripanskim modrilom.76

Table 16: Proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of unburied hind legs (%) by day of sampling in the fall and Kruskal–Wallis test results compared to the first day via the trypan blue method.....76

Tabela 17: Delež viabilnih hondrocitov v sklepni hrustanici kolenskega sklepa zakopanih zadnjih okončin (%) na dan vzorčenja poleti in rezultati Kruskal–Wallisovega testa v primerjavi s prvim dnevom z uporabo metode s tripanskim modrilom.76

Table 17: Proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of buried hind legs (%) by day of sampling in the fall and Kruskal–Wallis test results compared to the first day via the trypan blue method.....76

Tabela 18: Semikvantitativna ocena števila žuželk temperatura izmerjena tik ob nezakopanih zadnjih okončinah, temperatura na površini, povprečna dnevna temperatura in padavine poleti in spomladi.89

Table 18: Semiquantitative assessment of the number of arthropods, the temperature measured directly by the hind legs, the surface temperature and the average daily temperature and precipitation in the summer and spring months.....89

SEZNAM OKRAJŠAV

ADD	skupek dnevnih stopinj; angl. <i>accumulated degree days</i>
ATP	adenozin trifosfat; angl. <i>adenosine triphosphate</i>
Ca-AM	kalcein-AM; angl. <i>calcein-AM</i>
CLSM	konfokalni laserski skenirni mikroskop; angl. <i>confocal laser scanning microscope</i>
CVA	analizator celične viabilnosti; angl. <i>cell viability analyzer</i>
DMEM/F12	Dulbecco modificiran Eaglov medij F12; angl. <i>Dulbecco's modified eagle medium nutrient mix F12</i>
EthD-1	etidijev homodimer-1; angl. <i>ethidium homodimer-1</i>
GAG	glikozaminoglikan; angl. <i>glycosaminoglycan</i>
IQR	interkvartilni razmik; angl. <i>interquartile range</i>
KWT	Kruskal-Wallisov test vsote rangov; angl. <i>Kruskal-Wallis test</i>
OAST	sistema prenosa osteohondralnega samopresadka; angl. <i>osteochondral autograft transfer system</i>
PBS	fosfatni pufer s soljo; angl. <i>phosphate-buffered saline</i>
PMI	posmrtni interval; angl. <i>postmortem interval</i>
RPM	obrati na minuto; angl. <i>revolutions per minute</i>
SD	standardni odklon; angl. <i>standard deviation</i>
TBS	skupni telesni seštevek; angl. <i>total body score</i>
Thd	temperaturni prag; angl. <i>temperature threshold</i>
TM	tripansko modrilo; angl. <i>trypan blue</i>
T. min.	najnižja dnevna temperatura
T. max.	najvišja dnevna temperatura

T. povp.	povprečna dnevna temperatura
TUNEL	metoda detekcije fragmentirane DNAs pomočjo terminalne deoksinukleotidil transferaze; angl. <i>t</i> erminal <i>d</i> eoxy <i>n</i> ucleotidyl transferase <i>d</i> UTP <i>n</i> ick <i>e</i> nd <i>l</i> abeling
ZCM	<u>z</u> unaj <u>c</u> elični <u>m</u> atriks; angl. <i>extracellular matrix</i>

1 UVOD

Takoj po poginu nastajajo v truplu neizogibne, napredujoče fizikalne in kemične spremembe, ki se pojavijo v določenem zaporedju in sčasoma povzročijo popoln razpad trupla. Temeljito poznavanje časa njihovega nastanka in konca ter dejavnikov okolja in trupla, ki vplivajo na spremembe, je ključnega pomena pri ugotavljanju časa pogina živali oz. določanju časa od pogina do najdbe trupla, t. i. PMI, ki je pomemben segment forenzičnih preiskav v veterini in humani medicini. Kljub desetletjem raziskav se natančnost ugotavljanja PMI ni bistveno izboljšala, napaka ob določanju PMI tako ostaja velika (1).

Madea (2005) in Henssge in Madea (2007) menita, da ima večina novih metod določanja PMI zgolj raziskovalno vrednost, ne pa tudi praktične. Dejavnike, ki vplivajo na oceno PMI (npr. temperatura, vlaga, prisotnost žuželk itd.), bi po njunem mnenju morali kvantitativno ovrednotiti, zanesljivost in natančnost dobljenih rezultatov pa preveriti na drugih kadavrih oz. vzorcih, ki so enakovredni preiskovanim. Predlagata uporabo in razvoj metod, katerih rezultate je možno kvantitativno ovrednotiti in omogočajo oblikovanje matematičnega modela za določanje PMI (2, 3).

Na natančnost določanja PMI v veliki meri vplivajo dejavniki okolja in vzrok pogina, česar številne *in vitro* raziskave in nekatere novejšie metode določanja PMI ne upoštevajo, obenem pa natančnost rutinskih metod z daljšanjem PMI pada, zato je uporabna vrednost teh metod vprašljiva. Nenatančnost rutinskih metod določanja PMI je posledica pomanjkanja podatkov iz raziskav v naravnem okolju, standardizacij metod oz. postopkov in smernic ter pomanjkanja medsebojne primerjave metod (1, 2, 4, 5).

1.1 NAMEN

Namen doktorske naloge je določanje PMI z ugotavljanjem viabilnosti hondrocitov v kolenskem sklepu prašičev z metodo s CLSM in z metodo s TM v različnih letnih časih.

1.2 HIPOTEZE

1. Različne okoljske razmere vplivajo na viabilnost hondrocitov.
2. Konfokalna mikroskopija je primerna metoda za ugotavljanje viabilnosti prašičjih hondrocitov pri določanju PMI.
3. Na podlagi viabilnosti hondrocitov lahko natančno določimo PMI v naravnem okolju.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 POSMRTNI INTERVAL (PMI)

Posmrtni interval je čas, ki je minil od smrti organizma in določa starost trupla. Določanje časa od pogina do najdbe trupla oz. ugotavljanje starosti trupla spada med največje izzive sodne veterine in medicine. V zadnjih desetletjih so bile na področju določanja PMI narejene številne raziskave, opravljene predvsem z namenom izboljšanja natančnosti njegovega določanja. Kljub temu se natančnost metod ni bistveno izboljšala, zato ostaja napaka ob določanju PMI velika tako v naravnem okolju kot tudi v nadzorovanih laboratorijskih razmerah (6–8). Določitev PMI predstavlja enega ključnih segmentov vsake forenzične preiskave, saj s poginom živali povezuje potencialne storilce in dogodke, ki so vplivali na pogin živali (mučenje krivolov, transport živali ipd.), ter priče teh dogodkov (9, 10).

Posmrtni interval se deli na takojšnje obdobje, zgodnje obdobje, ki traja do 72 ur po smrti, in pozno obdobje, ki traja od 72 ure po smrti do popolnega razkroja trupla (11).

V takojšnjem obdobju prenehajo delovati možgani, pljuča in srce, živali prenehajo dihati, izgubijo sposobnost hotnega gibanja, preneha jim delovati živčni sistem in ustavi se krvožilni sistem, zaradi česar se pojavijo biokemične in fiziološke spremembe, kot so npr. padec očesnega tlaka (12), motnost roženice (13, 14) in izguba elastičnosti kože (15), vendar še ne nastajajo mikroskopsko zaznavne spremembe. Pri določanju PMI v takojšnjem obdobju si v forenzični medicini pomagamo tudi z ugotavljanjem stopnje prebavljenosti želodčne vsebine. V zgodnjem posmrtnem obdobju se pojavijo mikroskopske in makroskopske spremembe trupla, s katerimi določamo PMI. Med te spremembe spadajo mrtvaška otrplost, ohlajanje trupla, hipostaza, posmrtno strjevanje krvi, krvna imbibicija, psevdomelanoza, avtoliza in gnitje (16). Redkeje uporabljene in manj raziskane metode za določanje zgodnjega posmrtnega obdobja so še spremembe v številu in morfologiji krvnih celic ter številu celic v cerebrospinalni tekočini (17, 18), merjenje električne prevodnosti in vzdražljivosti mišic (19), določanje sprememb v kemični sestavi steklovine, krvi, urina, perikardialne in cerebrospinalne tekočine itd. (20, 21). Med naštetimi metodami določanja zgodnjega obdobja je najbolj uveljavljena in raziskana metoda merjenja padca telesne temperature. To je zapleten postopek, ki za ustrezno interpretacijo vsakega primera zahteva široko strokovno znanje (22). Praviloma se trupla ljudi prvih 12 ur po smrti vsako uro ohladijo za 0,83 do 1,11 °C, po 12 urah pa za 0,55 °C na uro,

dokler se temperatura trupla ne izenači s temperaturo okolice (23, 24). Znanstveniki so ugotovili, da se na podoben način ohlajajo tudi trupla psov, čeprav je ohlajanje slednjih zelo odvisno tudi od velikosti živali in odlakanosti (9, 25). Metoda je manj zanesljiva, če truplo po smrti premaknemo na mesto z drugačno temperaturo ali če okoliška temperatura izrazito niha in kadar je telesna temperatura pred smrtjo višja od normalne. Določanje PMI oteži tudi toplota, ki nastane ob metabolizmu mikrobiote v truplu in žuželk, saj ta upočasni padec temperature trupla ali jo celo dvigne. Na ohlajanje trupel, zlasti človeških, pomembno vplivajo tudi oblačila in drugi materiali, ki truplo pokrivajo ali v katere je truplo zavito (vreče, polivinil, odeje ipd.) (22). Raziskovalci so ustvarili številne grafe, formule in algoritme za določanje PMI na podlagi padca telesne temperature, od katerih je najpogosteje uporabljen nomogram, ki ga je ustvaril Claus Henssge leta 1988 (26). Henssgejev nomogram na podlagi izmerjene rektalne temperature, temperature možganov ali jeter ter povprečne temperature okolice trupla določa čas smrti ljudi, obenem pa uporablja korekcijske faktorje, ki upoštevajo težo trupla in oblačila ali druge materiale, v katere so trupla zavita (27, 28).

V poznem obdobju opazimo mumifikacijo, maceracijo, tvorbo mrliškega voska in skeletizacijo, obdobje pa se zaključijo s popolnim razpadom trupla. Zaradi razkroja in dolgotrajne izpostavljenosti trupla spreminjajočim se okoljskim dejavnikom je določanje PMI v tem obdobju največji izziv (29, 30). Za določanje PMI v začetnem in srednjem delu poznega obdobja, ki se konča s popolnim razpadom, najpogosteje uporabljamo forenzično entomologijo, metodo, ki se osredotoča na vrsto, razvojne stopnje in količino žuželk na truplu in v njegovi neposredni okolici (31). Na določanje PMI s forenzično entomologijo vplivajo habitat žuželk, plini, ki nastanejo med razkrojem trupla, in lokalna mikroklima. Pred uporabo metode je ključno dobro poznavanje lokalne populacije žuželk (31, 32). Dež, močan veter, neugodne temperature in zakop ovirajo dostop odraslim žuželkam do trupla in s tem odlaganje jajčec, kar otežuje natančno določitev trenutka, ko so žuželke naselile truplo. S to metodo je zato mogoče določiti le najkrajši možen čas smrti oz. čas naselitve žuželk, ta pa se lahko od dejanskega časa smrti bistveno razlikuje v primerih, ko je bil žuželkam preprečen dostop do trupla, tudi ko je bilo truplo najprej v zaprtem prostoru in šele nato odvrženo v naravo, zažgano, zavito v plastiko, postavljeno v hladen prostor ipd. (22, 33, 34).

Na natančnost metod za določanje PMI, ki se trenutno uporabljajo v praksi, vplivajo notranji dejavniki, kot so velikost, starost in odlakanost živali, predhodna bolezenska stanja ipd., in

zunANJI dejavniki, kamor spadajo lokalna favna in flora, temperaturna nihanja, padavine ipd. Natančnost njihovega določanja pada linearno s časom (35).

Da bi bila napaka ocenjenega PMI čim manjša, moramo uporabiti več različnih metod za določanje PMI in pri tem upoštevati njihove pomanjkljivosti. Ocena PMI bo natančnejša pri svežih truplih, saj stopnja razkroja izrazito vpliva na natančnost ocene. Ne glede na napisano pa lahko starost trupla vedno določimo zgolj okvirno, nekoliko natančnejšo oceno lahko dobimo z video dokazi in izpovedjo kredibilnih prič (7, 36, 37).

Zaradi vrstno specifičnih značilnosti in razlik znotraj iste vrste, vrednosti za določanje PMI, ki so nastale na podlagi rezultatov raziskav na eni živalski vrsti, ni priporočljivo uporabiti pri drugih vrstah, ne da bi jih prej ustrezno validirali. Zaradi enakega razloga je sporna tudi uporaba vrednosti za določanje PMI, pridobljenih z raziskavami na človeških truplih (1). Večina uveljavljenih metod za določanje PMI temelji na stopnji razkroja in na morfoloških spremembah, ki ob tem nastanejo, posamezne pa so osredotočene na kemične spremembe v truplu in njegovi neposredni okolici ter spremembe v količini in sestavi notranje in zunanje mikrobiote (11, 35).

2.2 RAZKROJ TRUPLA

Po prenehanju delovanja življenjsko pomembnih funkcij se v organih pojavita ishemija in posledično hipoksija, ki preusmeri aerobni metabolizem celic v anaerobnega. Dolgotrajna hipoksija izzove kemično neravnovesje in napake v metabolizmu celice, zato te preidejo čez t. i. "točko brez povratka" in povzročijo nastanek nepopravljivih poškodb in celično smrt. Pri tem nastanejo nepopravljive poškodbe celične membrane in stene celičnih organelov, iztekati začeta citoplazma s citosolnimi proteolitičnimi encimi in vsebina celičnih organelov s proteolitičnimi encimi, ti pa poškodujejo membrane sosednjih celic. Razkroj trupla z encimi, ki se sprostijo ob celičnem razpadu, imenujemo avtoliza. Poškodovane celice predstavljajo hranilne snovi za bakterije, zato se kmalu po začetku avtolize začne proces gnitja oz. razkroja trupla z encimi baterij, ki so v truplu in/ali v njegovi okolici (29, 38).

Gnitje in avtoliza povzročata makroskopske spremembe trupla, na podlagi katerih so Megyesi in sod. (2005) v humani forenzični medicini oblikovali lestvico, ki temelji na štirih stopnjah razkroja:

1. svež razkroj: ni spremembe barve kože in ni žuželk,
2. zgodnji razkroj: siva do zelena obarvanost kože, napihovanje, kadavrska deskvamacija, izpadanje las in dlake,
3. napredovan razkroj: vlažen razkroj tkiv, sesedanje trebuha, obsežna aktivnost žuželk, skeletizirana je manj kot polovica trupla, mumifikacija,
4. skeletizacija: tkivo pokriva manj kot polovico skeleta, izsuševanje kosti.

Pri vsaki stopnji je za vsakega od treh anatomskih področij zasnovan točkovnik, ki na podlagi morfoloških sprememb vsakemu področju dodeli oceno: glava z vratom (od 1 do 13), trup (od 1 do 12) in okončine (od 1 do 10). S končnim seštevkom ocen vseh treh področij dobimo skupen telesni seštevke (angl. total body score (TBS)), ki ima minimalno vrednost 3 (sveže truplo brez spremembe barve) ter maksimalno vrednost 35 (popolna skeletizacija) (39). Za vsak TBS je določen skupek dnevnih stopinj (angl. accumulated degree days (ADD)), ki je povezava med temperaturo in časom ter predstavlja toplotno energijo, ki je potrebna, da nek biološki proces poteče. Na podlagi ADD se nato določi PMI (40, 41). Čeprav so metodo uporabili v številnih raziskavah, je njena splošna uporaba še vedno kontroverzna, saj so različni raziskovalci dobili različne rezultate v podobnih pogojih (20, 35, 39–41). Ugotovili so, da so

meje med stopnjami razkroja, ki so jih določili Megyesi in sod. (2005), nejasne, hitrost razkroja trupla pa je podvržena dejavnikom, ki jih lahko razdelimo na notranje in zunanje. Med notranje dejavnike štejemo mikrobiom trupla, zdravstveno stanje živali oz. človeka, uporabo zdravil ali drugih substanc pred smrtjo, morebitne poškodbe, ožganine, razkosanje itd. (35, 45, 46). Po mnenju raziskovalcev so ti dejavniki razlog za razlike v natančnosti ocene PMI, določenega z uporabo TBS (7).

Zunanje dejavnike okolja, ki vplivajo na razkroj trupla, delimo na biološke in nebiološke.

2.3 VPLIV OKOLJA NA RAZKROJ

Med zunanje nebiološke dejavnike spadajo vrsta zemlje, oblačila, izpostavljenost soncu, zakop itd. Ti dejavniki vplivajo neposredno na temperaturo, pH okolice, vlago in količino kisika, s tem vplivajo na hitrost kemičnih reakcij v truplu in razvoj mikrobiote ter žuželk, s čimer posredno vplivajo na hitrost razkroja. K zunanjim biološkim dejavnikom prištevamo okoliško mikrobioto, žuželke in mrhovinarje. Vsi zunanji dejavniki so tesno povezani, delujejo sinergistično ali antagonistično in različno vplivajo drug na drugega, zato težko določimo vpliv zgolj posameznega dejavnika na hitrost razkroja trupla. Na razkroj trupla najbolj vplivajo okoliška temperatura in žuželke, predvsem njihova številčnost (47, 48).

2.3.1 Temperatura

Temperatura je eden najpomembnejših zunanjih dejavnikov, ki vplivajo na hitrost razkroja trupla, saj vpliva na hitrost kemičnih reakcij, predvsem delovanje encimov in s tem na metabolizem celic tudi po smrti (35). Temperatura prav tako vpliva na razvojni krog, razmnoževanje in metabolizem mikrobiote in žuželk. Ti procesi potekajo najhitreje v optimalnih temperaturnih območjih, ki so specifična za vsako vrsto. Že najmanjša odstopanja od optimalne temperature lahko vplivajo na kemične reakcije mikrobiote in žuželk in s tem na njihovo aktivnost (49, 50). Van't Hoffov zakon oz. Q_{10} koeficient določa, da se lahko hitrost kemijskih reakcij ob dvigu temperature za 10 °C podvoji ali celo potroji (47, 48, 51). Na temperaturo pomembno vplivajo lokacija trupla (senčna ali sončna lega, nadmorska višina, zračni tok, globina zakopa, itd.), letni čas, telesna temperatura pred smrtjo, material, v katerega je truplo zavito, poraščenost trupla itd. ter dejavnost mikrobiote in žuželk, ki dvignejo temperaturo trupla in njegove neposredne okolice (49, 50, 52, 53).

2.3.2 Vlaga

Vlaga neposredno ali posredno vpliva na razkroj trupla, saj pospešuje ali zavira razvoj ter aktivnost mikrobiote in žuželk, kar je odvisno predvsem od njene količine, pH in temperature (54, 55). Voda deluje kot topilo za molekule plinov, ki v obliki hlapov privabljajo mrhovinarje in žuželke (47), obenem pa lajša raztapljanje mineralov kosti in izmenjavo ionov med truplom in prstjo (56).

Ugotovili so, da razkroj nezakopanih trupel poteka hitreje pri relativni vlažnosti višji od 85 % (48). Podobno je tudi pri zakopanih truplih, kjer zaradi manjšega števila mikrobiote in upočasnenih encimskih reakcij ta razpadejo počasneje, še posebej, če so zakopana v suhi prsti (57–59). Počasnejši razkroj so ugotovili tudi pri truplih, zakopanih v prsti z visokim deležem vlage, npr. v ilovici, saj ta otežuje izmenjavo plinov in spodbuja razmnoževanje anaerobne mikrobiote, hkrati pa vzdržuje konstantno in pogosto nižjo temperaturo (60). Vlaga ima pomembno vlogo tudi pri nastanku nekaterih drugih posmrtnih sprememb, predvsem mumifikacije, maceracije in saponifikacije. Trupla se izsušijo oz. mumificirajo v vročem ali mrzlem ter suhem okolju z relativno vlažnostjo do 16,5 %. Nizka vlažnost zavre ali popolnoma ustavi avtolizo in aktivnost mikroorganizmov ter žuželk, s tem pa upočasnjuje razkroj trupla (61–63). Maceracija ali zmeščanje tkiva nastane v zelo vlažnem in sterilnem okolju. Najpogosteje jo opazimo na koži trupel in pri odmrlih plodovih v maternici, kadar ne pride do resorpcije plodnih vod (64). Pri saponifikaciji nastaja mrliški vosek ali *adipocere*, ki je trda, vosku podobna snov, ki nastane v hladnih, anaerobnih pogojih z visoko relativno vlažnostjo med razkrojem trigliceridov na maščobne kisline, ki jih anaerobne bakterije (najpogosteje *Clostridium perfringens*) hidrolizirajo. Adipocere upočasnjuje razkroj trupla, v določenih primerih lahko truplo tudi delno ohrani (61, 65, 66).

Razkroj trupel v vodi poteka zaradi odsotnosti žuželk, nizkih temperatur in anaerobnih pogojev znatno počasneje kot razkroj nezakopanih trupel na kopnem (65). Na hitrost razkroja utopljenecv poleg globine vode pomembno vpliva tudi hitrost pretoka. Ugotovili so, da trupla v vodotokih s hitrim pretokom vode razpadajo hitreje kot trupla v vodotokih s počasnim pretokom ali stoječih vodah. Raziskovalci menijo, da je to posledica vpliva deroče vode, ki trupla mehanično poškoduje (47, 67).

2.3.3 pH

Med procesom razkroja trupel se iz trupla sproščajo s hranili bogate tekočine, ki vplivajo na mikrookolje in kemično sestavo prsti, zlasti na njen pH. Zaradi sproščanja amonijaka se pH prsti v okolici nezakopanih trupel v aerobnih pogojih do sredine razkroja počasi dviga in prst postane alkalna, na koncu razkroja in v anaerobnih pogojih pa zaradi bakterijske fermentacije in sproščanja organskih kislin začne pH padati in okolje se zakisa (68–72). Spremembe pH med razkrojem izrazito vplivajo na potek kemičnih reakcij, katalitično aktivnost encimov in znotrajcelične reakcije kot tudi na sestavo mikrobiote v truplu in okolici (47, 48). Ugotovili so, da kislo okolje spodbuja razvoj gliv in rastlin, nevtralnno do blago alkalno okolje pa spodbuja razmnoževanje bakterij (72).

2.3.4 Kisik

Zaradi pomanjkanja kisika in zaviranja oksidativnih procesov se zakopana in potopljena trupla ter trupla na visokih nadmorskih višinah razkrajajo počasneje. Voda in mokra prst imata pogosto malo kisika, kar zmanjšuje njun redoks potencial in spodbuja anaerobni razkroj trupel, posledično se upočasni hitrost razkroja. Suha in zračna prst ima višji redoks potencial, ki spodbuja aerobni razkroj in povzroči hitrejši razkroj trupel (47, 48). Količina kisika pada z globino zakopa ali potopitve trupla, zato se globlje zakopana ali potopljena trupla razkrajajo počasneje (73, 74).

2.3.5 Mikrobiota

Po smrti se začne mikrobiota v truplu in v njegovi neposredni okolici hitro razmnoževati in truplo tudi razkrajati. Razkroj trupla začnejo bakterije, ki so bile v živali že takrat, ko je bila ta še živa. Te bakterije najprej prehajajo v okoliško tkivo prebavil in dihal, nato se po krvnem in limfnem sistemu širijo tudi v oddaljena tkiva. Med razkrojem se njihova sestava, funkcija in metabolizem spreminjajo v predvidljivem zaporedju, pri čemer v zgodnjih fazah razkroja prevladuje aerobna mikrobiota, vendar se njena aktivnost po porabi kisika in padcu redoks potenciala zmanjša in omogoči razmnoževanje anaerobne mikrobiote (47, 75). V kasnejših fazah razkroja se truplo izsuši, količina mikrobiote se močno zmanjša, zato upade tudi njihova aktivnost. Aktivnost ohranijo bakterije iz okoliške prsti, ki izločajo encima kolagenazo in keratinazo, zato se razkroj trupla nadaljuje (75). V truplu bakterije razkrajajo ogljikove hidrate,

beljakovine in maščobe v pline (ogljikov dioksid, putrescin, kadaverin, vodikov sulfid, amonijak), kisline, alkohole (etanol, butinol), acetone in druge stranske produkte. Plini – vodikov sulfid, ogljikov dioksid, metan, amonijak, žveplov dioksid in vodik – vplivajo na pH tkiv, povzročijo napihovanje trupla in nastanek kadavrskega meteorizma in emfizema ter privabljajo mrhovinarje in žuželke, ki pospešijo razmnoževanje mikrobiote (76). Organske kisline, mlečna, očetna, aceto-očetna in propionska kislina, ki jih bakterije proizvedejo med razkrojem, vplivajo na pH trupla in njegove neposredne okolice (47). Mikrobiota med svojim metabolizmom proizvaja tudi toploto, ki lahko upočasni ohlajanje trupla ali celo dvigne njegovo temperaturo (77).

2.3.6 Žuželke

Truplo je vir hranil za številne žuželke, ki truplo naselijo v različnem času po smrti, posamezne pa že med agonijo živali (78). Število in vrsta žuželk sta primarno odvisna od lokalnega rastlinja in letnega časa (79, 80), na njihovo število in aktivnost najbolj vplivajo okoljski pogoji, kot so temperatura, količina padavin, vlažnost in vetrovnost ter mikrobiota trupla, ki žuželke privablja s stranskimi produkti metabolizma (plini, alkoholi ipd.), nastalimi med razkrojem trupla. Sestava teh produktov se med razkrojem spreminja, kar vpliva tudi na populacijo žuželk (54, 55). Ugotovili so, da mumificirana trupla ne ustvarjajo ustreznih pogojev za razvoj ličink, saj te potrebujejo vlažno in zračno okolje (81).

Med vrste, ki najpogosteje sodelujejo pri razkroju trupla, v forenzični entomologiji prištevajo muhe iz družine brenčočk (red *Diptera*, družina *Calliphoridae*), mesarske muhe (red *Diptera*, družina *Sarcophagidae*) in prave muhe (red *Diptera*, družina *Muscidae*) ter hrošče mrharje (red *Coleoptera*, družina *Silphidae*) in slaninarje (red *Coleoptera*, družina *Dermestidae*) (42, 73, 78). Na truplo prve prispejo samice brenčočk in pravih muh, nato še samice mesarskih muh, ki takoj začnejo z odlaganjem jajčec. Najraje jih odlagajo okoli oči, nosnic, ust, uhljev in kasneje tudi genitalij (83). Hrošči se na truplu pojavijo v kasnejših fazah razkroja trupla, običajno takrat, ko truplo začne napihovati. Iz jajčec brenčočk se v 6 do 40 urah izležejo ličinke, razvoj teh je povsem odvisen od temperature in vlage okolice in lahko traja od 3 do 10 dni (82). Aktivnost samic brenčočk zavirajo pomanjkanje svetlobe, dež in najbolj nizke temperature (pod 12 °C) ali visoke temperature (nad 30 °C) (84). Razvoj ličink se pri nizki relativni vlažnosti in nizkih temperaturah znatno upočasni, pri temperaturah, nižjih od 4 °C, pa popolnoma ustavi (85). Razvijajoče se ličinke se prehranjujejo z mehкими tkivi trupla in ob tem uničujejo kožo in

sluznice in s tem omogočijo lažji dostop številnim drugim vrstam žuželk ter mikrobioti, ki razkroj trupla pospešijo. Med razvojem izločajo hlapne organske spojine, ki privabljajo druge vrste žuželk, predvsem mravlje, ose in različne vrste hroščev (47). Ličinke se večkrat levijo in se na koncu preobrazbe zabubijo. Stadij bube traja 6 do 18 dni (82). Iz bube se izleže odrasla muha, ki se lahko takoj pari in zalega jajčeca, pogosto pa truplo zapusti (54).

Žuželke, zlasti njihove ličinke, s toploto, sproščeno zaradi njihovega metabolizma, vplivajo tudi na temperaturo trupla in temperaturo njegove neposredne okolice, ki lahko narasteta tudi za več stopinj. V raziskavah so v neposredni okolici ličink zabeležili temperaturo višjo tudi do 7 °C (86, 87) ter do 21 °C višjo temperaturo v truplu v primerjavi s temperaturo okolice (88, 89). Izmerjena temperatura okolja se zato pogosto ne ujema s temperaturo, ki ji je truplo izpostavljeno. Te razlike v temperaturi lahko vodijo do napak pri določanju PMI z metodo merjenja temperature trupla. Ugotovili so, da posamezne ličinke in ličinke v začetnih fazah razvoja nimajo izrazitega vpliva na temperaturo trupla in njegove neposredne okolice (77, 79, 90). Payne in sod. (1965) so v svoji raziskavi ugotovili, da so trupla, do katerih žuželke niso dostopale, mumificirala in ostala nespremenjena več mesecev, trupla z visoko aktivnostjo žuželk pa so že v šestih dneh izgubila tudi do 90 % telesne mase (76).

2.3.7 Mrhovinarji

Številni vretenčarji, predvsem psi, kojoti, lisice, jastrebi, rakuni, skunki in vrane, vplivajo na razkroj trupla s prehranjevanjem z mehкими tkivi, z ločevanjem kosti od telesa in odnašanjem delov trupla (91, 92). Aktivnost mrhovinarjev se razlikuje glede na lokacijo, podnebje in letni čas, velikost trupla in njihove prehranjevalne navade (93). Raziskave so pokazale, da veliki mrhovinarji obgrizejo predvsem osrednji del trupla, še posebej notranje organe, medtem ko distalne dele in okončine obgrizejo nekoliko manj (94), manjši mrhovinarji, predvsem glodalci, kot so gerbili, miši, veverice in podgane, pa glodajo mehka tkiva in kosti predvsem na distalnih delih trupla in s tem pomembno pripomorejo k njegovemu razkroju (95). Mrhovinarji s trganjem in raznašanjem tkiv povečajo površino trupla, omogočijo lažji dostop žuželkam in mikrobioti ter otežijo najdbo trupla in določitev PMI (91, 92).

2.4 VPLIV ZAKOPA NA RAZKROJ TRUPLA

Čeprav poteka razkroj zakopanih in nezakopanih trupel na enak način, je hitrost razkroja bistveno drugačna. Ključno vlogo v hitrosti razkroja imata globina zakopa in vrsta prsti (61, 77, 81).

Prst, ki obdaja zakopana trupla, ustvarja izolacijski sloj, ki jih ščiti pred vremenskimi pojavi, kot so dež, sneg in neposredna sončna svetloba, in pred žuželkami ter mrhovinarji. Obenem preprečuje večja temperaturna nihanja in s tem vzdržuje dokaj stabilno temperaturo, ki je pozimi v primerjavi s temperaturo površja višja in poleti nižja (96, 97).

Kisik in hranila v prsti ter pH, vlaga in temperatura prsti posredno vplivajo tudi na sestavo in količino mikrobiote in rast rastlin (29). Med razkrojem truplo z lastno mikrobioto, izločeno tekočino in plini pomembno vpliva na sestavo prsti, s tem pa na sam razkroj. Z izločanjem amonijaka se postopoma dviga pH okoliške prsti, kar spodbuja razmnoževanje bakterij (68, 98), ki s toploto nastalo med njihovim metabolizmom, vplivajo na hitrost ohlajanja trupla in na temperaturo okolice (58, 77, 97).

Na hitrost razkroja pomembno vpliva tudi vlažnost prsti, njena količina je tesno povezana z vrsto prsti. Ugotovili so, da prst z visoko vsebnostjo peska vlago odvajajo, prst z visoko vsebnostjo gline pa vlago zadržuje. Prst z visoko vsebnostjo gline je tudi revna s kisikom, kar spodbuja razmnoževanje anaerobne mikrobiote, ki je v primerjavi z aerobno manj učinkovita pri razkrajanju trupla (57–59).

Raziskave so pokazale, da se zakopana trupla razkrajajo tudi do osemkrat počasneje kot nezakopana (61, 77, 81). Z globino zakopa so neposredno povezani nebiološki dejavniki, kot so temperatura, količina kisika in vlage, posredno pa tudi biološki dejavniki, kot sta količina in sestava mikrobiote in žuželk (58, 99). Rodriguez in Bass (1985) sta ugotovila, da so trupla, ki so bila zakopana na globini 30,48 cm, razpadala hitreje kot trupla, zakopana na globini 60,96 ali 121,92 cm (58). Ugotovljeno je bilo tudi, da ni znatnih razlik v hitrosti razkroja med nezakopanimi trupli in zakopanimi na globini, manjši od 20 cm (100). Do podobnih ugotovitev so prišli tudi drugi raziskovalci, zato velja pravilo, da se hitrost razkroja z globino upočasnjuje (57, 59, 97, 99, 101). Wilson in sod. (2007) so ugotovili, da v truplih, zakopanih na globini 30 cm, prevladuje aerobna mikrobiota iz prebavil, na globini 60 cm pa aerobno nadomesti manjšestvilna anaerobna mikrobiota (97). Schultz (2007) pa je ugotovil, da zakop trupel na

globini 50 cm prepreči dostop večini žuželk. Na tej globini ni opazil ličink ali odraslih muh in hroščev, so pa opazili maloštevilne mravlje. Na globini 1 m pa žuželk niso opazili (59).

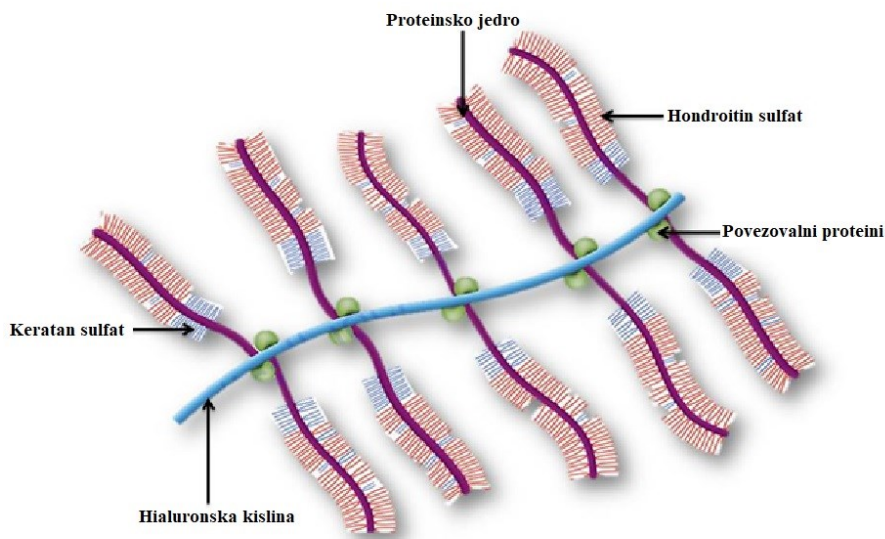
2.5 ZGRADBA HRUSTANCA

Hrustanec je tkivo, zgrajeno iz enotne populacije celic, ki jih imenujemo hondrociti, in iz zunajceličnega matriksa (ZCM), površino hrustanca pa pokriva plast perihondrija. Glede na sestavo razlikujemo hialini, elastični in vezivni hrustanec. Elastični hrustanec se nahaja v uhlju, zunanem sluhovodu in nekaterih grlnih hrustancih; njegov ZCM vsebuje elastična vlakna, ki mu dajo večjo prožnost, in kolagenska vlakna tipa II. Vezivni hrustanec je v medvretenčnih diskih, simfizah, meniskusu in na področjih priraščanja kit na kost; njegov ZCM vsebuje številne debele snope kolagenskih vlaken tipa I. Hialini hrustanec je najpogostejša oblika hrustanca. Najdemo ga na sklepnih površinah (sklepni hrustanec), v rebrnem hrustancu, hrustancu nosu, grla, sapnika in bronhov, med embrionalnim razvojem pa oblikuje hrustančno zasnovo za kosti (102, 103). Hondrociti so edine celice v hrustancu, vendar predstavljajo zgolj 5–10 % njegovega volumna (104, 105). So celice z nizko presnovno aktivnostjo in nizkimi potrebami po kisiku ter hranilih. Nahajajo se posamično ali v skupinah, imenovanih izogene skupine, v katerih so celice po delitvi. Te celice so v lakunah, iz katerih s svojimi kratkimi citoplazemskimi podaljški segajo v medcelični prostor. Posamezen hondroцит obdaja pericelularni matriks, hondrocite izogenih skupin pa teritorialni matriks, te pa med seboj ločuje interteritorialni matriks. Hondrociti proizvajajo sestavine ZCM, s proizvodnjo encimov, rastnih dejavnikov in vnetnih mediatorjev pa vzdržujejo homeostazo hrustanca (102, 104–107).

Osnovo ZCM hialinega hrustanca oblikuje gosta mreža kolagenskih vlaken (15–22 % teže hrustanca), ki so pretežno tipa II, v katero so ujete molekule proteoglikanov in vode, v kateri je raztopljena majhna količina anorganskih soli. Takšna struktura ZCM daje hrustancu njegovo obliko in natezno čvrstost (108–111).

Proteoglikani predstavljajo 4–7 % teže hrustanca in oblikujejo monomere, sestavljene iz proteinskega jedra, na katerega je kovalentno vezanih ena ali več verig glikozaminoglikanov (GAG), kot sta hondroitin sulfat in keratan sulfat. GAG so sestavljeni iz dolgih, nerazvejanih verig disaharidov z negativnim nabojem, zaradi česar privlačijo katione in se med seboj odbijajo (112–115). Količina GAG je tesno povezana s starostjo, poškodbami in z različnimi obolenji, njihova količina pa se razlikuje tudi glede na globino hrustanca (116). Proteoglikani se v ZCM

sklepnega hrustanca nahajajo prosto ali so s povezovalnimi proteini pritrjeni na GAG hialuronsko kislino in oblikujejo agregat, imenovan agrekan (slika 1), ki je z elektrostatičnimi vezmi vezan na kolagenska vlakna (102, 117, 118).



Slika 1: Shematski prikaz agrekana (119).

Figure 1: Schematic representation of an aggrecan (119).

Hidrofilna narava proteoglikanov in hialuronske kisline omogoča zadrževanje vode v hialinem hrustancu, ki lahko predstavlja tudi do 80 % teže hrustanca, v njej pa so raztopljeni plini, manjši proteini, presnovki in številni kationi. Te makromolekule imajo negativen naboj, zato privlačijo pozitivno nabite ione natrija in odbijajo negativno nabite ione klora, s čimer se poveča osmolarnost tkiva (116, 120–122). Z vezavo vode dobi hrustanec svoje mehanske lastnosti, voda pa omogoča tudi transport hranil in odpadnih produktov znotraj hrustanca (123).

Hrustanec je neoživčeno in neožiljeno tkivo, ki skozi ZCM z difuzijo izmenjuje hranila, kisik in presnovke med hondrociti in sinovijsko tekočino (124, 125). Za normalno delovanje hondrocitov je potrebno okolje z nizko vsebnostjo kisika, od 10 % do < 1 % (102, 103, 105). Zunajceličen matriks obenem ščiti hondrocite pred poškodbami, ki bi lahko nastale zaradi mehanskih obremenitev. Hranila, novo sintetizirane molekule, odpadni produkti celic in molekule, ki regulirajo funkcijo celic, se prenašajo skozi ZCM, nekatere pa se v njem tudi shranjujejo (126).

2.5.1 Zgradba sklepnega hrustanca

V sklepnem hrustancu razlikujemo 4 plasti, in sicer: površinsko ali tangencialno, srednjo, globoko ali radiarno ter kalcificirano plast, ki predstavlja prehod med hrustancem in subhondralno kostjo. Razporeditev, število in oblika hondrocitov ter sestava ZCM se z globino spreminjajo, s tem pa se spreminjajo tudi funkcija in metabolna aktivnost hondrocitov ter mehanske lastnosti ZCM (116). Število hondrocitov je v površinski plasti največje, z globino pa se postopoma zmanjšuje. Hondrociti površinske plasti imajo ovalno obliko in se razporejajo vzporedno vzdolž površine hrustanca. V tej plasti je količina vode visoka, kolagenska vlakna so tesno razporejena v vzdolžno potekajočem vzorcu ločenih črt (angl. »split-line« vzorec). V srednji plasti so hondrociti okrogle oblike in naključno razporejeni, kolagenska vlakna pa so orientirana poševno in enakomerno razporejena. Hondrociti globoke in kalcificirane plasti so okrogli in tvorijo pravokotno na kostnino potekajoče stebričke. V tej plasti je količina vode najmanjša. Kolagenska vlakna so najdebelejša in tvorijo radiarno razporejene snope, ki prehajajo v kalcificirano plast in pritrjujejo hrustanec na spodaj ležečo kostnino (127–130).

2.6 HRUSTANEC KOT PREDELEK

Da bi izboljšali natančnost določanja PMI in da bi se čim bolj izognili vplivu okoljskih dejavnikov, raziskovalci pri določanju PMI čedalje pogosteje proučujejo telesne dele, ki so bolj zavarovani pred vplivom okolja in kasneje razpadajo. Te dele imenujejo predelki (angl. compartment) in mednje spadajo steklovina, cerebros spinalna tekočina, odontoplasti in hrustanec (131–134).

Hondrociti so zaradi majhnih potreb po hranilih in kisiku ter zaradi odpornosti na hipoksijo in acidozo sposobni preživeti tudi več dni po smrti organizma (120, 126, 134, 135). K njihovem daljšem času preživetja pomembno pripomore ZCM, ki po mnenju raziskovalcev tudi po smrti organizma omogoča difuzijo hranil in kisika iz sinovijske tekočine, hkrati pa deluje kot zaloga vode in v njej raztopljenih elektrolitov (8). ZCM prav tako oblikuje porozno mrežo s premerom por približno 6 nm (136–140). Te pore omogočajo normalen prehod hranil in izmenjavo snovi med hondrociti in okolico, hkrati pa delujejo kot pregrada za mikrobioto, tudi za nanobakterije s premerom do 80 nm (141–143).

Pomembno vlogo pri daljšem času preživetja hondrocitov pa ima tudi lokacija hrustanca, zlasti njegova oddaljenost od prsne in trebušne votline, ki po smrti predstavljata pomemben vir

bakterij. Ker je hrustanec neožiljen, so hondrociti zavarovani tudi pred vdorom saprofitskih bakterij, ki se med razkrojem trupla širijo po krvožilnem sistemu (5, 144).

Zaradi opisanih lastnosti raziskovalci menijo, da lahko sklepni hrustanec, zlasti sklepov okončin, uvrstimo med predelke in je kot tak primeren za določanje PMI, zlasti več dni ali tednov po smrti organizma (8, 134, 144).

2.7 METODE DOLOČANJA VIABILNOSTI HONDROCITOV

Največ raziskav na področju viabilnosti hondrocitov, tj. njihove sposobnosti za življenje, je bilo izvedenih na področju presajanja sklepnega hrustanca in shranjevanja hondrocitov za zdravljenje osteoartritisa. V teh raziskavah so za določanje viabilnosti hondrocitov po obarvanju hrustanca ali izoliranih hondrocitov s fluorescenčnima barviloma Ca-AM in EthD-1 uporabili CLSM (145–149). V drugih raziskavah pa so za določanje viabilnosti hondrocitov uporabili tudi metodo detekcije fragmentirane DNA s pomočjo terminalne deoksinukleotidil transferaze; angl. terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL), TM, histološka in imunohistokemična barvanja ali analizator celične viabilnosti; angl. cell viability analyzer (CVA) (5, 140–143).

2.7.1 Ca-AM in EthD-1

Ca-AM je barvilo, ki pasivno prehaja skozi nepoškodovano celično membrano. Po prehodu Ca-AM v citoplazmo celice nespecifične celične esterase hidrolizirajo acetoksimetilni ester na Ca-AM. Po hidrolizi ostane v citoplazmi le kalcein, ki ni zmožen prehajati skozi nepoškodovano celično membrano. Po vzbujenju z modro svetlobo valovne dolžine pribl. 494 nm kalcein, ujet v citoplazmi celice, odda zeleno fluorescenco valovne dolžine pribl. 517 nm, zato se citoplazma viabilnih celic z nepoškodovano celično membrano in aktivno esterazo obarva zeleno. EthD-1 je sposoben prehajati zgolj skozi poškodovano celično membrano neviabilnih celic, ne pa skozi nepoškodovane membrane viabilnih celic. Po vzbujenju s svetlobo valovne dolžine pribl. 528 nm oddaja rdečo fluorescenco valovne dolžine pribl. 617 nm. Ker ima afiniteto do nukleinskih kislin, se jedra neviabilnih celic obarvajo rdeče (134, 146).

2.7.2 Tripansko modrilo (TM)

Metoda s TM se uporablja za določanje števila viabilnih celic v celični suspenziji. Temelji na predpostavki, da viabilne celice ohranjajo nepoškodovano celično membrano, ki preprečuje prehod barvil, tudi TM, ki lahko prehaja le skozi poškodovano membrano neviabilnih celic. V citoplazmi neviabilnih celic se TM veže na znotrajcelične proteine in citoplazmo obarva modro, citoplazma viabilnih celic pa ostane neobarvana. Ker TM ne more obarvati hondrocitov znotraj ZCM, moramo hrustanec pred barvanjem mehanično in encimsko obdelati ter izolirati hondrocite. Zaradi poškodb, ki nastanejo med mehanično obdelavo hrustanca in pipetiranjem, ter zaradi časa, potrebnega za encimski razkroj ZCM, lahko prihaja do padca viabilnosti hondrocitov. Pomanjkljivost metode je tudi njena subjektivnost, predvsem ko v celico vstopijo majhne količine barvila, ki šibko obarvajo citoplazmo, kar ob uporabi svetlobnega mikroskopa pogosto spregledamo. Natančnost metode lahko nekoliko izboljšamo z uporabo fluorescenčnih barvil in fluorescenčnega mikroskopa (144, 154).

2.8 VIABILNOST HONDROCITOV

V raziskavah, ki so jih opravili za potrebe presaditve hrustanca, so ugotovili, da hondrociti sklepnega hrustanca, ki so shranjeni v ustreznih pogojih, ohranijo svojo viabilnost več dni ali celo tednov po smrti darovalca. Večino teh raziskav so opravili v *in vitro* pogojih, kjer so bili vzorci hrustanca shranjeni pri optimalnih temperaturah in v stabilnih temperaturnih območjih ter v celičnih medijih, obogatenih z antibiotikom in fetalnim govejim serumom. Večina teh raziskav se je osredotočala na vpliv časa in temperature na viabilnost hondrocitov. Obdobje, v katerem so hondrociti ohranjali svojo viabilnost, in optimalna temperatura hranjenja presadkov sta se med raziskavami razlikovala (135, 146, 155, 156).

Hicks in sod. (2006) so ugotovili, da pri sobni temperaturi 23 °C 92 % hondrocitov v hrustancu človeškega nosnega pretina preživi 5 dni, 54 % do 20 dni in 16 % 1 mesec po smrti osebe. Pri temperaturi 4 °C je 95 % hondrocitov preživel do 15 dni, 70 % do enega meseca in 38 % do dveh mesecev po smrti osebe (146).

Pallante in sod. (2009) so v svoji raziskavi ugotovili, da je bilo pri 4 °C po 14 dneh viabilnih med 75 in 91 %, po 28 dneh pa med 20 in 40 % hondrocitov. Viabilnost hondrocitov, shranjenih pri 37 °C, pa je po 28 dneh bila med 65 in 80 % (155). Persall in sod. (2004) so ugotovili, da je bilo pri temperaturi 4 °C po 44 dneh viabilnih še 67 % hondrocitov (157). Williams in sod.

(2004) pa so ugotovili, da je bila viabilnost hondrocitov, hranjenih pri temperaturi 4 °C, po 29 dneh višja od 80 %, po 60 dneh pa 51 % (158).

V nekaterih *in vitro* raziskavah, ki so bile opravljene v forenzične namene, so vzorce hrustanca shranili v celičnih medijih, ki naj bi posnemali razmere v človeških truplih. Za določanje viabilnosti hondrocitov so uporabljali metodo s CLSM in metodo s CVA. Pri metodi s CVA so za štetje viabilnih hondrocitov po predhodnem barvanju s TM uporabili avtomatski števec celic. Ugotovili so, da se viabilnost hondrocitov pri temperaturi 4 °C v prvih desetih dneh ni bistveno spreminjala, pri 11 °C ni bilo sprememb v 15 dneh, pri 23 °C v 12,5 dneva in pri 35 °C v 7,5 dneva. To obdobja so poimenovali obdobja platoja. Viabilnost je nato začela naglo padati in je po 50 in 56 dneh pri 4 °C dosegla 5 %, pri 11 °C 30 %, pri 23 °C pa 15 %. Pri 35 °C je viabilnost dosegla 5 % že med 34 in 38 dnem po odvzemu vzorca hrustanca (5, 144, 159).

Lasczkowski in sod. (2002) so v svoji raziskavi uporabili vzorce hrustanca, pridobljene neposredno iz kolenskih sklepov trupel, ki so bila hranjena v kontroliranem okolju pri temperaturi 4 °C. Ugotovili so, da je viabilnost hondrocitov pri tej temperaturi med 29 in 107 urami po smrti znašala od 88 % do 96 %, nato pa je število po 148 urah padlo na 58 %, po 1,5 mesecu pa na 9 % (134).

Rezultati raziskav na truplih in v razmerah, podobnih tistim v truplih (5, 134, 144, 159), se razlikujejo od prej omenjenih raziskav na presadkih (135, 155–158), kjer so kot optimalno temperaturo za hranjene hrustanca navajali 4 °C. Delež viabilnih hondrocitov je bil v raziskavah, kjer je bil hrustanec hranjen v razmerah, podobnim tistim v truplih, nižji kakor v hrustancu raziskav na presadkih. Visok delež viabilnih hondrocitov v raziskavah na presadkih je po mnenju raziskovalcev najverjetneje posledica optimalnih razmer, v katerih so hranili presadke (135, 146, 155, 156). Čeprav *in vitro* raziskave na truplih in tkivih, pridobljenih iz trupel, posnemajo posamezne dejavnike, ki jim je truplo izpostavljeno v naravnem okolju, pa ne morejo upoštevati vseh dejavnikov, ki na truplo vplivajo v naravnem okolju, predvsem ne njihovega medsebojnega vpliva. Kljub temu da so proučili vpliv temperature na viabilnost hondrocitov, je bila ta med raziskavami stabilna in znotraj ozkih temperaturnih območij (134, 159). V naravnih razmerah pa temperatura neprestano niha, nekoliko stabilnejša je le pri truplih, zakopanih globlje od 30 cm (58, 97).

2.9 TAFONOMSKE RAZISKAVE

V *in vitro* pogojih ne moremo poustvariti razmer, ki jih v naravnem okolju sooblikujejo spreminjajoča se mikroklima, vpliv favne in flore, sončno sevanje idr., zato je za razvoj metod določanja PMI ključno, da hkrati z razvojem metod v *in vitro* pogojih izvajamo podobne raziskave tudi v naravnem okolju, rezultate pa med seboj primerjamo (22). V ta namen so nekatere raziskovalne ustanove ustvarile zavarovana območja, imenovana »body farms«, ki omogočajo raziskovanje načina razkroja v delno kontroliranem naravnem okolju, to so t. i. tafonomske raziskave (160–162). Številne raziskave na teh območjih so se osredotočale na določanje TBS, merjenje temperature in forenzične entomološke raziskave (22, 93, 163, 164). Po svetu trenutno deluje osem takih ustanov, ki raziskujejo procese razkroja v različnih okoljskih razmerah ter primerjajo razkroj človeških in živalskih trupel in s tem ugotavljajo vpliv okolja na PMI (165). V teh raziskavah najpogosteje uporabljajo trupla starostnikov, ki so umrli zaradi naravnih vzrokov. Takšna trupla se razlikujejo od trupel, ki jih običajno obravnavajo v forenzičnih preiskavah, saj v teh najpogosteje preiskujejo trupla ljudi srednjih let, ki so umrli zaradi nenaravnih vzrokov. Ker so trupla ljudi težko dostopna, so tovrstne raziskave običajno neponovljive in rezultati težko primerljivi. Zaradi tega se pogosto kot analog človeškim truplom uporabljajo živalska trupla in tkiva. V takšnih raziskavah najpogosteje uporabljajo prašiče, saj imajo podobne telesne mere, razmerje med deli telesa, debelino kože in črevesno mikrofloro kot ljudje (22, 40, 57, 93, 164). Ugotovili so, da je razkroj trupel prašičev s težo med 20 in 30 kg podoben razkroju človeških trupel do 5. tedna po smrti (166). V primerjavi s človeškimi trupli so trupla prašičev lahko dostopna, cenovno ugodna in prilagodljiva glede na zahtevane parametre raziskave, kot so teža, starost in spol, hkrati pa omogočajo statistično analizo in ponovljivost raziskave (44).

Edino raziskavo, ki se je osredotočila na razpad sklepnega hrustanca v naravnem okolju, so opravili Rogers in sod. (2011). V tej raziskavi so z makroskopskim in histološkim pregledom ugotavljali vpliv razkroja na sklepni hrustanec prašičjih zadnjih okončin, zakopanih do globine 20 cm. Ugotovili so, da je izraženost posmrtnih sprememb, ugotovljenih v hrustancu, povezana s časom, v času nastanka sprememb pa med zimskimi in poletnimi meseci ni bilo bistvenih razlik (približno \pm 3 dni) (167).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 PILOTSKA RAZISKAVA

V pilotski raziskavi smo uporabili zadnje okončine štirih poginulih prašičev pasme landras, težkih od 20 do 35 kg, ki smo jih označili z oznako P in zaporedno številko. Iz čvrša vsake stegenice smo s sistemom prenosa osteohondralnega samopresadka – angl. osteochondral autograft transfer system – OAST (Arthrex, Naples, Florida, ZDA) – odvzeli štiri vzorce hrustanca v obliki valja s premerom 0,6 cm in debeline 1,5 do 2 cm (osteohondralni cilinder). Tri osteohondralne clindre smo do nadaljnje obdelave hranili v 15-ml epruveti (Isolab Laborgeräte GmbH, Eschau, Nemčija) s fosfatnim pufrom s soljo – PBS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ZDA) pri sobni temperaturi 20 do 25 °C, en osteohondralni cilinder, ki je služil kot negativna kontrola, pa v 15-ml epruveti s 70-odstotnim etanolom (Kefo, Ljubljana, Slovenija). Epruvete smo označili z oznako P in zaporedno številko okončine, epruvete z negativno kontrolo pa z oznako NK in zaporedno številko okončine. Čez pol ure smo z mikrotomom z vibrirajočim rezilom Leica VT1000 S (Leica Biosystems, Wetzlar, Nemčija) iz vsakega osteohondralnega cilindra odrezali tri rezine debeline 200, 250 ali 300 µm. Rezine hrustanca smo inkubirali 45 minut pri sobni temperaturi v 1,5-ml Safe-Lock tubah (Eppendorf, Hamburg, Nemčija) z 1 ml PBS in vitalnima barviloma Ca-AM (1 mmol/l) in EthD-1 (2 mmol/l). Rezine osteohondralnih cilindrov z oznako P1 smo inkubirali v 4 µl Ca-AM in 2 µl EthD-1, rezine z oznako P2 v 8 µl Ca-AM in 4 µl EthD-1, rezine z oznako P3 v 12 µl Ca-AM in 8 µl EthD-1, rezine z oznako P4 pa v 20 µl Ca-AM in 12 µl EthD-1. Po inkubaciji smo rezine hrustanca prenesli na predmetna stekelca, dodali 20 µl PBS, jih pokrili s pokrovnim stekelcem in robove zapečatili z lakom za nohte. Konfokalne slike smo posneli s CLSM (LSCM 700) (Zeiss, Stuttgart, Germany) z objektivom z 20-kratno povečavo. Barvili smo vzbudili z argon kripton lasersko linijo (Leica, Wetzlar, Germany) pri valovni dolžini 488 nm in 543 nm. Slike smo zajeli sekvenčno, pri ločljivosti 512 x 512 pikslov, pri čemer smo točkovno zaslonko nastavili na eno enoto Airy. Slike za barvilo Ca-AM smo zajeli pri valovni dolžini od 493 do 550 nm, slike za barvilo EthD-1 pa pri valovni dolžini od 556 do 741 nm. Da bi se izognili morebitnim artefaktom, smo slike zajeli v srednjem delu rezine, med površinsko in srednjo plastjo hrustanca, oddaljeno vsaj 200 µm od stranskih robov. Na vidnem polju smo na globini 60 µm posneli štiri, osem, dvanajst ali štiriindvajset zaporednih slik.

Iz preostalega dela osteohondralnega cilindra smo po postopku, ki so ga predhodno opisali Alibegović in sod. (2012), izolirali hondrocite (5) tako, da smo ves ostanek hrustanca v aseptičnih pogojih narezali na delce velikosti 1 mm. Te smo nato prenesli v 15-ml epruvete z raztopino, ki je vsebovala 10 ml Dulbecco modificiranega Eaglovega medija F12 (DMEM/F12) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ZDA), 10 µg kolagenaze tipa II (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ZDA) in 200 µl antibiotične in antimikotične raztopine (Sigma-Aldrich, St. Louis, Misuri, ZDA), ki je preprečila morebitno kontaminacijo z bakterijami in glivami. Epruvete s hrustancem smo za 18 ur postavili v inkubator (Kambič d.o.o., Semič, Slovenija) na 37 °C. Med inkubacijo smo epruvete večkrat obrnili, s tem smo zagotovili enakomeren razkroj hrustanca. Po inkubaciji smo suspenzijo pretočili skozi celična sita s premerom por 40 µm (Sigma-Aldrich, St. Louis, Misuri, ZDA) v 50-mililitrske epruvete (Isolab Laborgeräte GmbH, Eschau, Nemčija). Premer por 40 µm je omogočil prehod hondrocitov, preprečil pa je prehod večjih delcev in delcev kostnine. 15-mililitrske epruvete smo dvakrat izprali z 10 ml PBS in spet precedili skozi celično sito. Aglutinacijo hondrocitov smo preprečili z dodatkom 200 µl EDTA – Versene raztopina (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ZDA). Suspenzijo smo 5 minut centrifugirali pri 580 obratih na minuto v Centric 350 centrifugi (Domel, d. o. o., Železniki, Slovenija). Nato smo odstranili supernatant, dokler ni v epruveti ostal le 1 ml suspenzije, ki smo ji po navodilih proizvajalca dodali 1 ml TM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ZDA). Po 5 minutah smo obarvan vzorec hondrocitov nanegli v Bürker-Türkovo števno komoro (Hecht Glaswarenfabrik GmbH & Co KG, Sondheim vor der Rhön, Nemčija) ter s svetlobnim mikroskopom (Motic Electric, Xiamen, Kitajska) pod 100-kratno povečavo prešteli število viabilnih in neviabilnih hondrocitov.

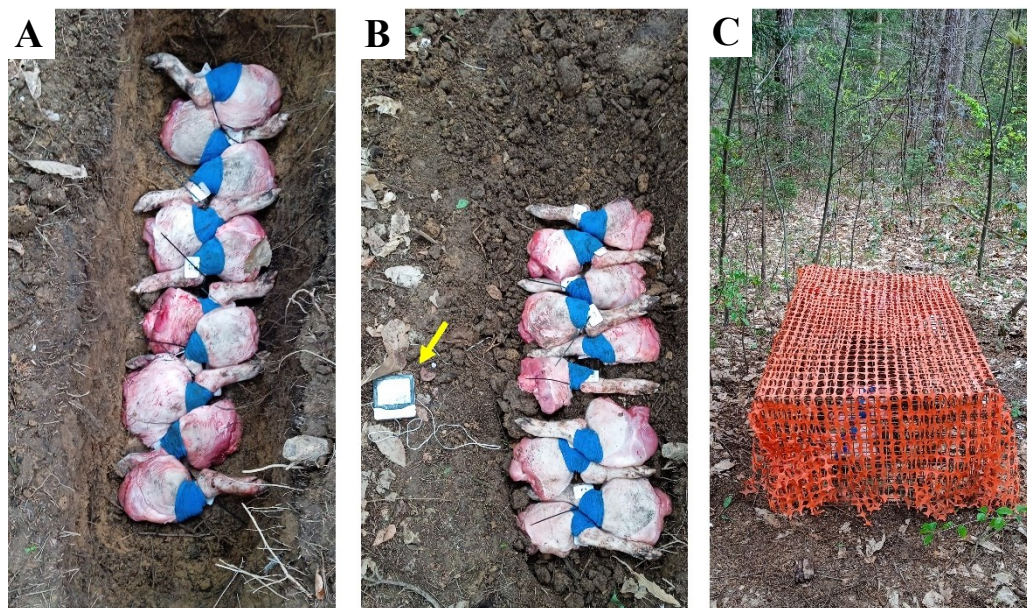
Ugotovili smo, da je najprimernejša debelina vzorca hrustanca 250 µm. Najprimernejši količini vitalnih barvil Ca-AM (1 mmol/l) in EthD-1 (2 mmol/l) za 1 ml PBS sta bili 8 µl Ca-AM in 2 µl EthD-1. Najprimernejše število zaporednih slik na globini 60 µm je bilo osem, saj je omogočilo idealno razmerje med kvaliteto in hitrostjo pregledovanja vzorca. Postopek barvanja s tripanskim modrilom je bil ustrezen.

3.2 VZORCI

Raziskavo smo izvedli v enoletnem obdobju v vsakem letnem času, in sicer jeseni od 15. do 24. 11. 2022, pozimi od 20. do 29. 1. 2023, spomladi od 17. do 26. 4. 2023 in poleti od 11. do 18. 7. 2023. Pred začetkom vsakega od štirih sklopov raziskave smo bili pozorni, da so zunanje temperature ustrezale letnemu času.

V raziskavo smo vključili 40 iz reje izločenih farmskih prašičev pasme landras s težo med 20 in 35 kg (Dovoljenje za uporabo živalskih stranskih proizvodov kategorije 2 s št. dovoljenja U34453-38/2021/5 je 21. 5. 2021 izdala Uprava Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin). Prašiči so bili izločeni zaradi neozdravljivih, kroničnih bolezni, ki so znatno vplivale na kakovost njihovega življenja, ter evtanazirani v skladu s 26. členom Zakona o zaščiti živali (168). V vsakem letnem času je bilo istočasno evtanaziranih 10 prašičev z intravenozno aplikacijo natrijevega pentobarbitala (Richter Pharma AG, Wels, Avstria) v odmerku 40 mg/kg telesne mase po predhodni globoki anesteziji s ketaminom (Vetoquinol UK Limited, Towcester, VB) v odmerku 20 mg/kg telesne mase. Trupla prašičev so bila v eni uri prepeljana v secirnico Inštituta za patologijo, divjad, ribe in čebele na Veterinarski fakulteti Univerze v Ljubljani, kjer smo pri temperaturi 20 °C opravili raztelesbo vsakega prašiča in še posebej natančno pregledali vse sklepe, da bi izključili obolenja, ki bi lahko vplivala na zdravje sklepnega hrustanca. Zadnje okončine smo označili z zaporedno številko in oznako, levo okončino smo označili s črko P (površina), desno pa s črko G (globina), in jih odstranili v kolčnem sklepu. Z vzdolžno artrotomijo (169) smo v 5 urah po evtanaziji odprli kolenske sklepe. S čvršev obeh stegenic smo z OAST odvzeli dva osteohondralna cilindra in ju do nadaljnje obdelave hranili do pol ure v PBS pri sobni temperaturi 20 do 25 °C. Po odvzemu osteohondralnih cilindrov smo sklepe spet pokrili s kožo in jih povili s Coban povojem (3M, Saint Paul, Minnesota, ZDA).

V senčnem gozdnem predelu Zoo Ljubljana smo v meljasto ilovico s pH 4,1 na globini 50 cm zakopali okončine z oznako G in sondo termometra (TFA Dostmann GmbH & Co. KG, Reicholzheim, Nemčija). Okončine z oznako P smo položili na površino nad zakopanimi okončinami. Čez grobove smo namestili kletko in jo pokrili z mrežo, ki je imela odprtine velikosti 2 x 5 cm, da bi preprečili dostop velikim mrhovinarjem (slika 2).



Slika 2: **Prikaz groba**; zadnje okončine, označene z oznako G, v grobu pred zakopom (A). Zadnje okončine, označene z oznako P, odložene na površini groba po zakopu zadnjih okončin z oznako G, (B) ter sonda termometra (puščica). Zadnje okončine, pokrite s kletko in z mrežo (C).

Figure 2: **Example of a grave**; the hind legs marked G lie in the grave before burial (A). The hind legs marked P lie on the surface of the grave after the burial of the hind legs marked G (B) and the thermometer probe (arrow). The hind legs covered with a cage and net (C).

S čvršev stegenice posamezne okončine smo med raziskavo uspeli odvzeti največ 7 osteohondralnih cilindrov ustrezne kakovosti. Osteohondralne cilindre smo odvzeli na dan evtanazije (1. dan), nato v enodnevnih intervalih naslednje 4 dni ter 8. in 10. dan po evtanaziji živali. Dneve vzorčenja smo določili na podlagi ugotovitev pilotske raziskave, v kateri smo v enodnevnih in dvodnevnih intervalih ugotavljali delež viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih zakopanih in nezakopanih okončin prašičev. Pilotsko raziskavo smo opravili poleti in spomladi na istem področju in po istem postopku kot glavno raziskavo.

Da so bili pogoji ob vzorčenju podobni, smo odvzeli osteohondralne cilindre z okončin v Zoo Ljubljana vsak dan med 5.00 in 5.30. Najprej smo odvzeli vzorec osteohondralnega cilindra iz sklepa vsake nezakopane okončine z oznako P. Po vzorčenju smo vsak sklep ponovno zaprli in povili z novim Coban povojem. Nato smo izkopali še okončine z oznako G ter postopek ponovili. Okončine z oznako G smo nato ponovno zakopali, okončine z oznako P pa položili na površino in čeznje poveznili kletko z mrežo. Pred vzorčenjem smo vsak dan zabeležili temperaturo na površini in v globini groba, ko so okončine naselile žuželke, pa smo izmerili temperaturo tudi tik ob okončinah. Podatke o dnevni temperaturi, relativni vlažnosti in količini

padavin smo pridobili z glavne meteorološke postaje, ki je oddaljena 3,4 km. Podatke o temperaturi, vlagi in padavinah smo za vsako obdobje zabeležili v tabeli 1. Podatke o temperaturi tik ob nezakopanih okončinah smo zabeležili v tabeli 18.

Tabela 1: Temperature na področju zakopa in podatki o relativni vlagi, padavinah, povprečni, najvišji in najnižji temperaturi z glavne meteorološke postaje.

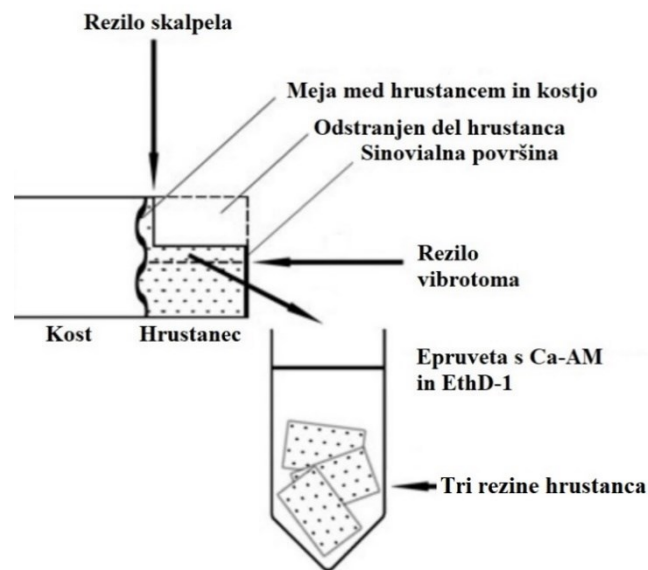
Table 1: Burial area temperatures and data on relative humidity, precipitation, and average, maximum and minimum temperatures from the main meteorological station.

Datum	Letni čas	T. glob. (°C)	T. povr. (°C)	T. povp. (°C)	T. max. (°C)	T. min. (°C)	Vlaga (%)	Padavine (mm)	Snežna odeja (mm)	Dež
15. 11. 2022	Jesen	12,5	10,2	11,3	14,1	8,9	75	2,5	0	Da
16. 11. 2022	Jesen	12,4	8,2	10	11,6	9	87	0,5	0	Da
17. 11. 2022	Jesen	12,3	8	10	11,6	8,6	84	3,3	0	Da
18. 11. 2022	Jesen	12,2	8,1	7,7	10,7	6,2	88	4,8	0	Da
19. 11. 2022	Jesen	11,7	4,5	5,2	7,9	4,4	88	9,9	0	Da
22. 11. 2022	Jesen	10,1	2,6	3,9	5	3,1	87	1,4	0	Da
24. 11. 2022	Jesen	8,2	1,8	4	7,6	2,3	88	0	0	Ne
20. 1. 2023	Zima	2,5	-4	0,1	1,7	-0,5	86	7,3	12	Ne
21. 1. 2023	Zima	3	-1,5	0,2	3,7	-5,1	76	0,3	12	Ne
22. 1. 2023	Zima	2,8	-1,1	0,6	1,8	-0,6	83	0	11	Ne
23. 1. 2023	Zima	4,1	-0,5	1,6	3,4	0,4	89	6,7	13	Da
24. 1. 2023	Zima	4,4	-0,5	2	3,5	0,9	89	17,4	10	Da
27. 1. 2023	Zima	5,2	-0,5	1,1	3,9	0,1	71	0	7	Ne
29. 1. 2023	Zima	5,3	-0,8	0,9	2,5	-0,1	77	0	6	Ne
17. 4. 2023	Pomlad	11,8	11,1	13	17,4	7,1	61	0	0	Ne
18. 4. 2023	Pomlad	9,9	6,1	12,1	16,9	7,5	71	0	0	Ne
19. 4. 2023	Pomlad	9,2	8,3	12,7	17,8	9,6	68	0	0	Ne
20. 4. 2023	Pomlad	9,3	9,3	10,1	13	9,5	74	0,3	0	Da
21. 4. 2023	Pomlad	9,3	7,3	11,3	18,4	8,1	73	0	0	Ne
24. 4. 2023	Pomlad	10,2	11,2	11,2	15,1	10,4	83	0,1	0	Da
26. 4. 2023	Pomlad	9,4	7	11,6	18,2	4,2	62	0	0	Ne
11. 7. 2023	Poletje	19,8	26,3	28,1	34	19,5	58	0	0	Ne
12. 7. 2023	Poletje	17,7	20,9	25,2	31,5	19,3	67	5	0	Da
13. 7. 2023	Poletje	17,5	17,4	18,5	26,5	17,2	84	14,6	0	Da
14. 7. 2023	Poletje	18,3	16,7	22,4	28,4	15,7	70	54,8	0	Da
15. 7. 2023	Poletje	17,9	16	25,8	32,6	16,8	62	0	0	Ne
18. 7. 2023	Poletje	19,8	20,5	23,2	31,6	19,1	69	0	0	Ne

Legenda: T. glob. – temperatura v grobovih; T. povr. – temperatura na površini grobov; T. povp. – povprečna dnevna temperatura; T. max. – najvišja dnevna temperatura; T. min. – najnižja dnevna temperatura.

3.3 METODA S KONFOKALNO MIKROSKOPIJO

Osteohondralne cilindre smo vzeli iz PBS in s pomočjo mikrotoma z vibrirajočim rezilom Leica VT1000 S odrezali tri rezine debeline 250 μm . Da bi se izognili morebitnim artefaktom, ki bi lahko nastali ob odvzemu in manipulaciji z osteohondralnimi cilindri, smo rezine hrustanca odrezali v sredini vsakega osteohondralnega cilindra vertikalno čez celotno debelino, od sinovialne površine do kostnine (slika 3).



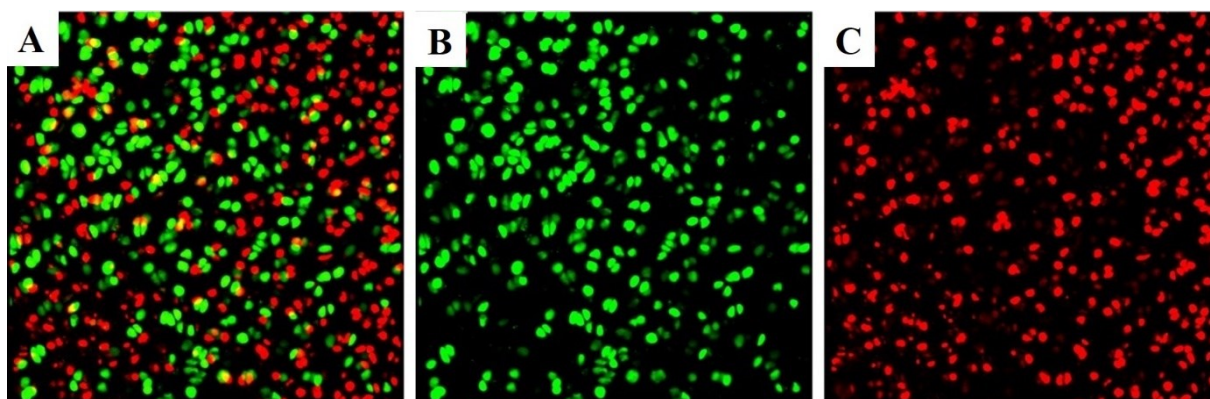
Slika 3: Način rezanja vzorcev hrustanca pri metodi s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom (5).

Figure 3: Sample cutting for the confocal laser scanning microscope method (5).

Rezine hrustanca smo inkubirali 45 minut pri sobni temperaturi v 1,5-mililitrski Safe-Lock tubi, ki je vsebovala 8 μL Ca-AM (1 mmol/L) in 2 μL EthD-1 (2 mmol/L) raztopljenih v 1 mL PBS. Po inkubaciji smo rezine hrustanca prenesli na predmetna stekelca, dodali 20 μL PBS, jih pokrili s pokrovnim stekelcem in robove pritrdili z lakom za nohte. Da bi zaščitili rezine hrustanca pred svetlobo, smo te med inkubacijo in pred pregledom z metodo CLSM hranili v temnem prostoru pri sobni temperaturi. S CLSM (LSCM 700) smo na vsakem področju na globini 60 μm posneli osem zaporednih konfokalnih slik po enakem postopku kot v pilotski raziskavi.

3.4 OBDELAVA SLIK

Osem zaporednih slik smo združili z uporabo računalniškega programa ZEN 2010 (Zeiss, Stuttgart, Germany) in s tem pridobili eno sliko viabilnih in neviabilnih hondrocitov v optičnem volumnu $0,011 \text{ mm}^3$ (velikost vidnega polja $424,27 \times 424,27 \mu\text{m}$, globina $60,1 \mu\text{m}$), v kateri sta citoplazma ali jedro glede na viabilnost hondrocitov fluorescirala intenzivno rdeče ali zeleno. Sliko smo nato z računalniškim programom ImageJ software (ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) razdelili na dve sliki: eno z viabilnimi in drugo z neviabilnimi hondrociti (slika 4). Med pregledom smo slikam spreminjali zgolj svetlost in kontrast, dokler nismo razločno videli vseh hondrocitov. Hondrocite z zeleno obarvano citoplazmo in neobarvanim jedrom smo določili za viabilne, hondrocite z rdečim jedrom ter hondrocite z zeleno citoplazmo in rdečim jedrom za neviabilne. Razmerje med številom viabilnih hondrocitov in vseh hondrocitov smo podali kot delež viabilnih hondrocitov.

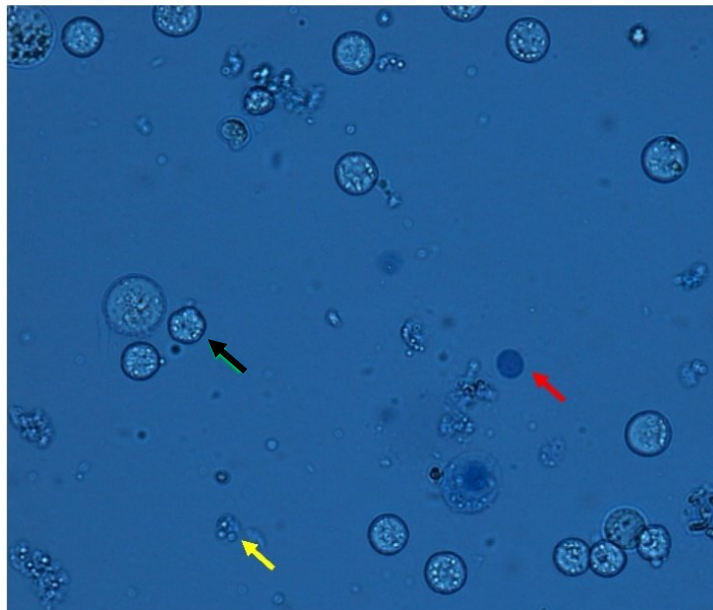


Slika 4: **Slike s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom**; združena slika viabilnih in neviabilnih hondrocitov (A), viabilni hondrociti z zeleno obarvano citoplazmo (B), neviabilni hondrociti z rdeče obarvanim jedrom (C).

Figure 4: **Confocal laser scanning microscope images**; merged image of viable and nonviable cells (A), viable chondrocytes with the cytoplasm stained green (B), nonviable chondrocytes with the nucleus stained red (C).

3.5 METODA S TRIPANSKIM MODRILOM

Iz preostalega dela osteohondralnega cilindra smo po enakem postopku kot v pilotski raziskavi, izolirali in obarvali hondrocite. Po 5 minutah smo obarvan vzorec hondrocitov nanegli v Bürker-Türkovo števno komoro ter s svetlobnim mikroskopom pod 100-kratno povečavo prešteli število viabilnih in neviabilnih hondrocitov. Štetje smo izvedli ročno in neobarvane hondrocite določili za viabilne, modro obarvane in nabrekle hondrocite brez jedra pa za neviabilne (slika 5). Razmerje med številom viabilnih hondrocitov in vseh hondrocitov smo podali kot delež viabilnih hondrocitov.



Slika 5: **Hondrociti, obarvani s tripanskim modrilom;** neobarvani viabilni hondrociti (črna puščica), modro obarvani neviabilni hondrociti (rdeča puščica) in nabrekli, neviabilni hondrociti (rumena puščica).
400 x povečava.

Figure 5: **Trypan blue-stained chondrocytes;** unstained viable chondrocytes (black arrow), nonviable stained chondrocytes (red arrow), swollen chondrocytes (yellow arrow).
400 x magnification.

3.6 ENTOMOLOGIJA

Med raziskavo smo pred vsakim vzorčenjem makroskopsko semikvantitativno ocenili število žuželk (jajčeca, ličinke in odrasle žuželke) glede na delež okončine, ki so ga te prekrivale. Kadar so žuželke prekrivale manj kot 25 % okončine, smo ocenili, da je žuželk malo (+), ko so prekrivale 25–50 % okončine, smo ocenili, da je število žuželk zmerno (++), ko pa so te prekrivale več kot 50 % okončine, smo ocenili, da je žuželk veliko (+++). Od vsake vrste smo odvzeli najmanj 5 predstavnikov in jih shranili v 90-odstotnem etanolu (Kefo, Ljubljana, Slovenija). Vrste žuželk in njihovih razvojnih stopenj smo določili z Leica M50 stereomikroskopom (Zeiss, Stuttgart, Germany) na podlagi klasifikacij po Szpilu (2009) in Byrdu (2019) (170, 171).

3.7 STATISTIČNA ANALIZA

Statistična analiza in grafi so bili izdelani z uporabo programskega jezika R za statistično računanje, različica 4.3.2 (172). Za vsak vzorec in za obe metodi ugotavljanja viabilnosti (CLSM in TM) so bili izračunani deleži viabilnih hondrocitov, ki so bili nato uporabljeni za izračun opisne statistike ter nadaljnjo analizo. Osnovne opisne statistike (minimum, kvartile – Q, interkvartilni razmik – IQR, mediano, povprečje, standardni odklon – SD in maksimum) smo podali glede na letni čas, metodo in zakop okončine. Statistične razlike v deležih viabilnih hondrocitov med dnevi vzorčenja ločeno glede na metodo ugotavljanja viabilnosti (CLSM in TM) in zakop so bile izračunane z uporabo Kruskal-Wallisovega testa vsote rangov (KWT) in post-hoc testa večkratnih primerjav. Razlike v deležu viabilnih hondrocitov med hrustancem zakopanih in nezakopanih okončin ter med metodama (CLSM in TM) na isti dan vzorčenja so bile ocenjene z Wilcoxonovim testom vsote rangov. Primerjave smo grafično prikazali z okviri z ročaji in linijskimi diagrami.

Poleg tega smo za proučitev in kvantifikacijo učinka različnih dejavnikov (neodvisnih spremenljivk) na preživetje hondrocitov razvili multipli linearni regresijski model, ki vključuje vse letne čase ter zakopane in nezakopane okončine. Odvisna spremenljivka je delež viabilnih hondrocitov, ugotovljen z metodo s CLSM, ki je bila v raziskavah, kjer so določali delež viabilnih hondrocitov, najpogosteje uporabljena (144, 146, 149, 173). Neodvisne spremenljivke pa so različne merjene temperature, vlaga, padavine in druge spremenljivke, ki so predstavljene v materialih in metodah. Model smo oblikovali na podlagi ugotovljenih statistično pomembnih

povezav in korelacij ter njegovo ustreznost preverili z uporabo diagnostičnih diagramov. Za vse statistične preizkuse se je p-vrednost, manjša od 0,05, upoštevala kot statistično značilna.

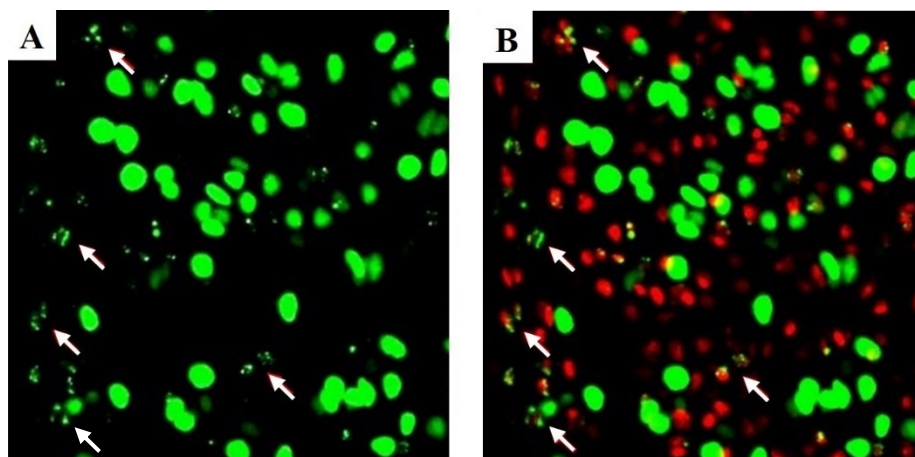
4 REZULTATI

4.1 REZULTATI RAZTELESBE

Med raztelesbo prašičev, vključenih v raziskavo, smo pri vseh prašičih ugotovili enterotiflokolitise in kaheksijo, pri 43 % prašičev pa tudi bronhopnevmonijo. Pri nobenem od prašičev nismo ugotovili patoloških sprememb sklepov.

4.2 REZULTATI METODE S CLSM

Po inkubaciji s Ca-AM in EthD-1 ter pregledu s CLSM sta citoplazma ali jedro hondrocitov fluorescirala intenzivno zeleno ali rdeče. Pozimi, spomladi in jeseni smo med 8. in 10. dnem po evtanaziji, poleti pa med 5. in 8. dnem opazili tudi skupine zeleno obarvanih delcev z rdečim jedrom, ki so bili najverjetneje delci membran propadajočih hondrocitov, zato smo jih šteli kot neviabilne (slika 6). 5. in 8. dan po evtanaziji poleti ter 10. dan v ostalih letnih časih so hondrociti manj fluorescirali kot v predhodnih dneh, pri čemer se je ZCM difuzno obarval blago zeleno, vendar pa to ni vplivalo na štetje celic. Intenzivnost zelenega obarvanja ZCM je bila sorazmerna z deležem neviabilnih hondrocitov.



Slika 6: **Delci celične membrane (bela puščica)**; viabilni hondrociti obarvani zeleno in zeleno obarvani delci celične membrane (A), združena slika viabilnih in neviabilnih hondrocitov (B).

Figure 6: **Cell membrane particles (white arrow)**; viable cells stained green and cell membrane particles stained green (A), merged image of viable and nonviable chondrocytes (B).

Analiza vzorcev hrustanca z metodo s CLSM je potrdila statistično značilno razliko v deležu viabilnih hondrocitov med dnevi. Opisna statistika deleža viabilnih hondrocitov za sklepne hrustance vseh okončin na posamezni dan in posamezni letni čas in rezultati Kruskal–Wallisovega testa v primerjavi s prvim dnevom z uporabo metode s CLSM sta prikazani v tabelah 2–9. Razlike v deležih viabilnih hondrocitov med dnevi vzorčenja pri sklepnih hrustancih vseh okončin skupaj so bile pozimi, spomladi in jeseni po 4. dnevu in poleti po 2. dnevu vzorčenja statistično značilne ($p < 0,0001$, Kruskal-Wallisov test vsote rangov). V nobenem obdobju nismo zaznali razlik med zaporednima vzorčenjema.

Slike 7–10 prikazujejo primerjavo deležev viabilnih hondrocitov med sklepnimi hrustanci kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih zadnjih v različnih dneh vzorčenja (1., 2., 3., 4., 5., 8. in 10. dan po evtanaziji) za vsak letni čas z uporabo metode s CLSM. Nad vsakim okvirom z ročaji so rezultati Wilcoxonovega testa vsote rangov.

Slike 27–30 v Prilogi 1 prikazujejo padec deleža viabilnih hondrocitov za vsak letni čas.

4.2.1 Jesen

Jeseni smo statistično značilne razlike v deležu viabilnih hondrocitov v primerjavi s 1. dnem ugotovili 8. dan vzorčenja v sklepnih hrustancih nezakopanih okončin (tabela 2) in 5. dan vzorčenja v sklepnih hrustancih zakopanih okončin (tabela 3). Delež viabilnih hondrocitov je v sklepnih hrustancih vseh okončin ne glede na to, ali so bile zakopane ali ne, začel padati že 3. dan vzorčenja (tabeli 2 in 3). V tem letnem času ni bilo statistično značilnih razlik v deležu viabilnih hondrocitov med sklepnimi hrustanci zakopanih in nezakopanih okončin (p-vrednost od 0,1200 do 0,9700) (slika 7).

Tabela 2: Delež viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov nezakopanih zadnjih okončin (%) na dan vzorčenja jeseni in rezultati Kruskal–Wallisovega testa v primerjavi s prvim dnem z uporabo metode s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom

Table 2: Proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of unburied hind legs (%) by day of sampling in the fall and Kruskal–Wallis test results compared to the first day via the confocal laser scanning microscope method

Dan	Letni čas	Minimum	1 Q	Mediana	3 Q	Maksimum	KWT
1	Jesen	62,20	68,84	76,27	87,56	90,52	/
2	Jesen	60,73	67,01	79,90	88,05	92,34	ns
3	Jesen	49,33	57,43	65,79	78,37	82,09	ns
4	Jesen	44,87	55,07	61,20	67,51	78,67	ns
5	Jesen	34,10	42,38	55,58	58,80	67,72	ns
8	Jesen	6,68	19,11	23,88	29,66	44,20	p < 0,05
10	Jesen	0,00	5,09	12,80	21,60	28,43	p < 0,05

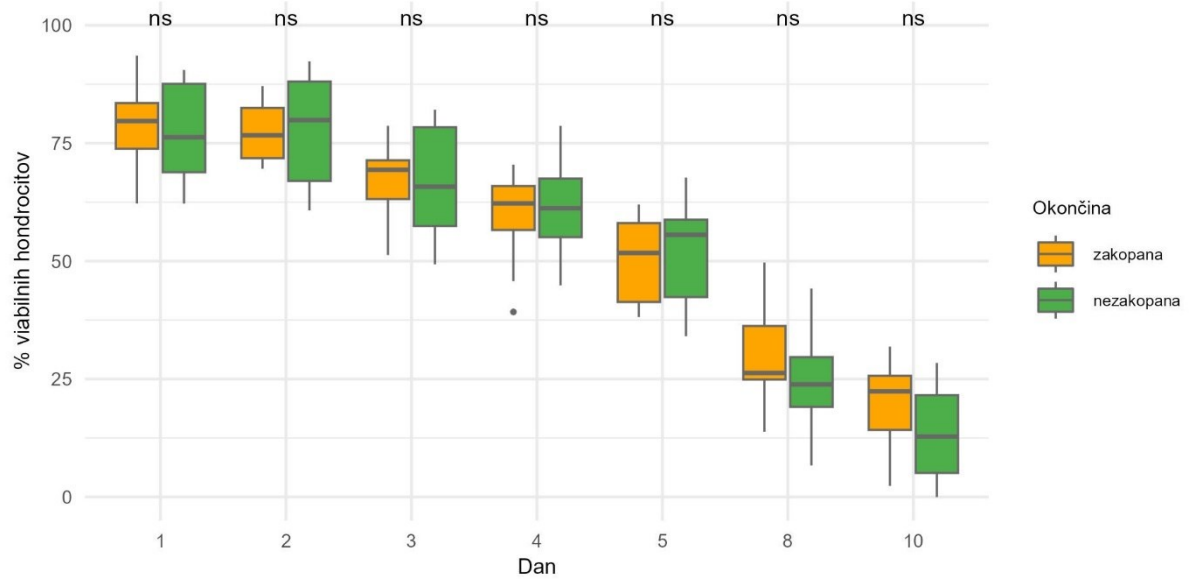
Legenda: 1 Q – prvi kvartil; 3 Q – tretji kvartil; KWT – Kruskal–Wallisov test; ns – ni statistično značilno

Tabela 3: Delež viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov zakopanih zadnjih okončin (%) na dan vzorčenja jeseni in rezultati Kruskal–Wallisovega testa v primerjavi s prvim dnem z uporabo metode s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom

Table 3: Proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of buried hind legs (%) by day of sampling in the fall and Kruskal–Wallis test results compared to the first day via the confocal laser scanning microscope method

Dan	Letni čas	Minimum	1 Q	Mediana	3 Q	Maksimum	KWT
1	Jesen	62,22	73,80	79,68	83,49	93,55	/
2	Jesen	69,58	71,80	76,66	82,46	87,11	ns
3	Jesen	51,29	63,14	69,35	71,37	78,67	ns
4	Jesen	39,23	56,59	62,23	65,93	70,43	ns
5	Jesen	38,17	41,34	51,72	58,05	62,02	p < 0,05
8	Jesen	13,82	24,89	26,28	36,26	49,69	p < 0,05
10	Jesen	2,36	14,21	22,40	25,71	31,88	p < 0,05

Legenda: 1 Q – prvi kvartil; 3 Q – tretji kvartil; KWT – Kruskal–Wallisov test; ns – ni statistično značilno



Slika 7: Primerjava deležev viabilnih hondrocitov med sklepnimi hrustanci kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih zadnjih okončin jeseni na dan vzorčenja pri metodi s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom; ns, ni statistično značilno. Okvir predstavlja spodnji in zgornji kvartil, črta v okviru označuje mediano, ročaji označujejo najmanjšo in največjo vrednost brez osamelcev, ki so označeni s točkami.

Figure 7: Comparison of the proportion of viable chondrocytes between the articular cartilages of the knee joints of buried and unburied hind legs in the fall on the day of sampling via the confocal laser scanning microscope method; ns, not statistically significant. The box represents the lower and upper quartiles, the line in the box represents the median, and the handles represent the minimum and maximum values without outliers, which are indicated by dots.

4.2.2 Zima

Pozimi smo statistično značilne razlike v deležu viabilnih hondrocitov v primerjavi s 1. dnem ugotovili 5. dan vzorčenja v sklepnih hrustancih nezakopanih okončin (tabela 4) in 8. dan vzorčenja v sklepnih hrustancih zakopanih okončin (tabela 5). Delež viabilnih hondrocitov je v sklepnih hrustancih nezakopanih okončin začel padati 4. dan (tabela 4), v sklepnih hrustancih zakopanih okončin pa 5. dan vzorčenja (tabela 5). Do 3. dne vzorčenja ni bilo statistično značilnih razlik v deležu viabilnih hondrocitov med sklepnimi hrustanci zakopanih in nezakopanih okončin, (p-vrednost od 0,0524 do 0,4813). Ko smo primerjali deleže viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih zakopanih in nezakopanih okončin od 4. do 10. dne vzorčenja, smo ugotovili, da so imeli sklepni hrustanci zakopanih okončin statistično višji delež viabilnih hondrocitov (p-vrednosti 4. dan – 0,0005; 10. dan – 0,0310). V primerjavi med sklepnimi hrustanci zakopanih (14,25 %, IQR: 7,70 do 21,42 %) in nezakopanih (3,06 %, IQR: 0,10 do 9,59 %) okončin je bila mediana deleža viabilnih hondrocitov 10. dan vzorčenja višja pri sklepnih hrustancih zakopanih okončin (slika 8).

Tabela 4: Delež viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov nezakopanih zadnjih okončin (%) na dan vzorčenja pozimi in rezultati Kruskal–Wallisovega testa v primerjavi s prvim dnem z uporabo metode s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom

Table 4: Proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of unburied hind legs (%) by day of sampling in winter and Kruskal–Wallis test results compared to the first day via the confocal laser scanning microscope method

Dan	Letni čas	Minimum	1 Q	Mediana	3 Q	Maksimum	KWT
1	Zima	53,55	61,43	67,49	79,73	94,29	/
2	Zima	63,73	72,57	73,65	76,33	78,92	ns
3	Zima	56,35	59,44	65,63	70,03	76,23	ns
4	Zima	13,07	33,11	48,85	54,45	68,87	ns
5	Zima	8,82	13,48	25,63	33,51	55,19	p < 0,05
8	Zima	1,12	4,84	10,60	20,30	33,73	p < 0,05
10	Zima	0,00	0,10	3,06	9,59	17,92	p < 0,05

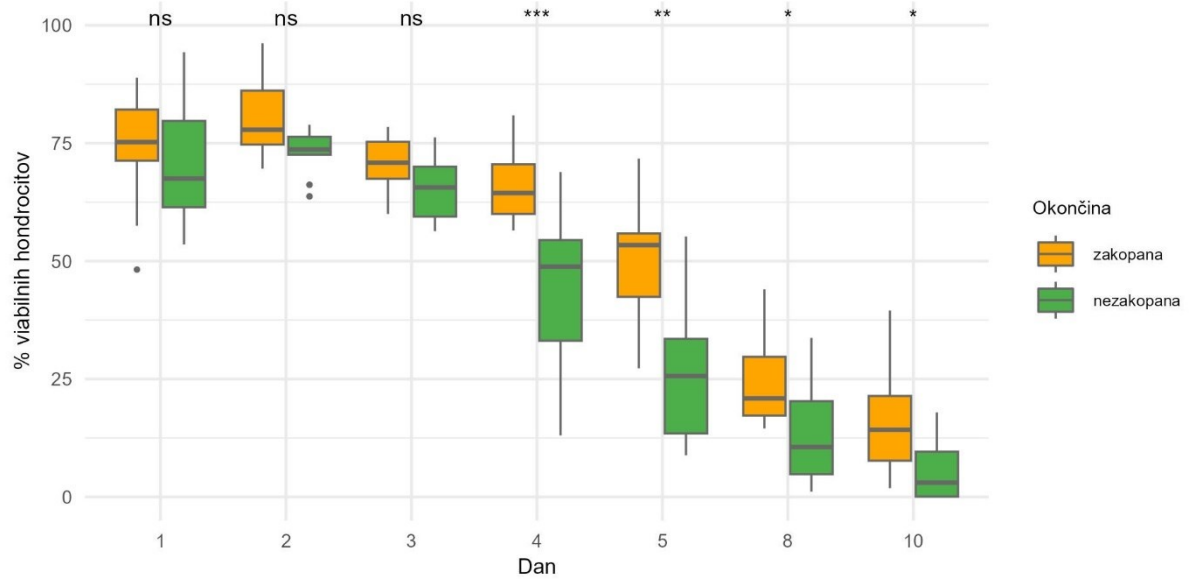
Legenda: 1 Q – prvi kvartil; 3 Q – tretji kvartil; KWT – Kruskal–Wallisov test; ns – ni statistično značilno

Tabela 5: Delež viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov zakopanih zadnjih okončin (%) na dan vzorčenja pozimi in rezultati Kruskal–Wallisovega testa v primerjavi s prvim dnem z uporabo metode s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom

Table 5: Proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of buried hind legs (%) by day of sampling in winter and Kruskal–Wallis test results compared to the first day via the confocal laser scanning microscope method

Dan	Letni čas	Minimum	1 Q	Mediana	3 Q	Maksimum	KWT
1	Zima	48,20	71,27	75,23	82,13	88,87	/
2	Zima	69,61	74,71	77,87	86,14	96,20	ns
3	Zima	60,00	67,47	70,87	75,29	78,46	ns
4	Zima	56,52	59,99	64,43	70,55	80,91	ns
5	Zima	27,27	42,44	53,41	55,87	71,74	ns
8	Zima	14,52	17,25	20,90	29,73	44,01	p < 0,05
10	Zima	1,88	7,70	14,25	21,42	39,53	p < 0,05

Legenda: 1 Q – prvi kvartil; 3 Q – tretji kvartil; KWT – Kruskal–Wallisov test; ns – ni statistično značilno



Slika 8: Primerjava deležev viabilnih hondrocitov med sklepnimi hrustanci kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih zadnjih okončin pozimi na dan vzorčenja pri metodi s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom; ns, ni statistično značilno; ***, $p < 0,0001$; **, $p < 0,001$; *, $p < 0,05$. Okvir predstavlja spodnji in zgornji kvartil, črta v okviru označuje mediano, ročaji označujejo najmanjšo in največjo vrednost brez osamelcev, ki so označeni s točkami.

Figure 8: Comparison of the proportion of viable chondrocytes between the articular cartilages of the knee joints of buried and unburied hind legs in winter on the day of sampling via the confocal laser scanning microscope method; ns, not statistically significant; ***, $p < 0.0001$; **, $p < 0.001$; *, $p < 0.05$. The box represents the lower and upper quartiles, the line in the box represents the median, and the handles represent the minimum and maximum values without outliers, which are indicated by dots.

4.2.3 Pomlad

Spomladi smo statistično značilne razlike v deležu viabilnih hondrocitov v primerjavi s 1. dnem ugotovili 5. dan vzorčenja v sklepnih hrustancih nezakopanih (tabela 6) in 8. dan vzorčenja v sklepnih hrustancih zakopanih okončin (tabela 7). Delež viabilnih hondrocitov je v sklepnih hrustancih nezakopanih okončin začel padati 4. dan (tabela 6), v sklepnih hrustancih zakopanih okončin pa 5. dan vzorčenja (tabela 7). Do 3. dne vzorčenja ni bilo statistično značilnih razlik v deležu viabilnih hondrocitov med sklepnimi hrustanci zakopanih in nezakopanih okončin, pri čemer so p-vrednosti znašale od 0,1051 do 0,3527, statistično značilnih razlik prav tako nismo ugotovili na 10. dan. Ko smo primerjali deleže viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih zakopanih in nezakopanih okončin od 4. do 8. dne vzorčenja, smo ugotovili, da so imeli sklepnih hrustanci zakopanih okončin statistično višji delež viabilnih hondrocitov (p-vrednost 4. dan – 0,0007; 8. dan – 0,0089). V primerjavi med sklepnimi hrustanci zakopanih (9,27 %, IQR: 5,92 do 11,16 %) in nezakopanih (4,29 %, IQR: 3,32 do 5,74 %) okončin je bila mediana deleža viabilnih hondrocitov 10. dan vzorčenja višja pri sklepnih hrustancih zakopanih okončin (slika 9).

Tabela 6: Delež viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov nezakopanih zadnjih okončin (%) na dan vzorčenja spomladi in rezultati Kruskal–Wallisovega testa v primerjavi s prvim dnevom z uporabo metode s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom

Table 6: Proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of unburied hind legs (%) by day of sampling in spring and Kruskal–Wallis test results compared to the first day via the confocal laser scanning microscope method

Dan	Letni čas	Minimum	1 Q	Mediana	3 Q	Maksimum	KWT
1	Pomlad	87,44	88,32	89,23	90,44	93,39	/
2	Pomlad	72,80	78,64	84,52	85,75	88,14	ns
3	Pomlad	72,65	79,18	82,79	84,56	85,77	ns
4	Pomlad	56,84	62,44	73,51	77,59	81,99	ns
5	Pomlad	14,05	22,25	29,86	32,54	69,66	p < 0,05
8	Pomlad	0,74	3,17	4,90	7,98	17,82	p < 0,05
10	Pomlad	0,00	3,32	4,29	5,74	11,80	p < 0,05

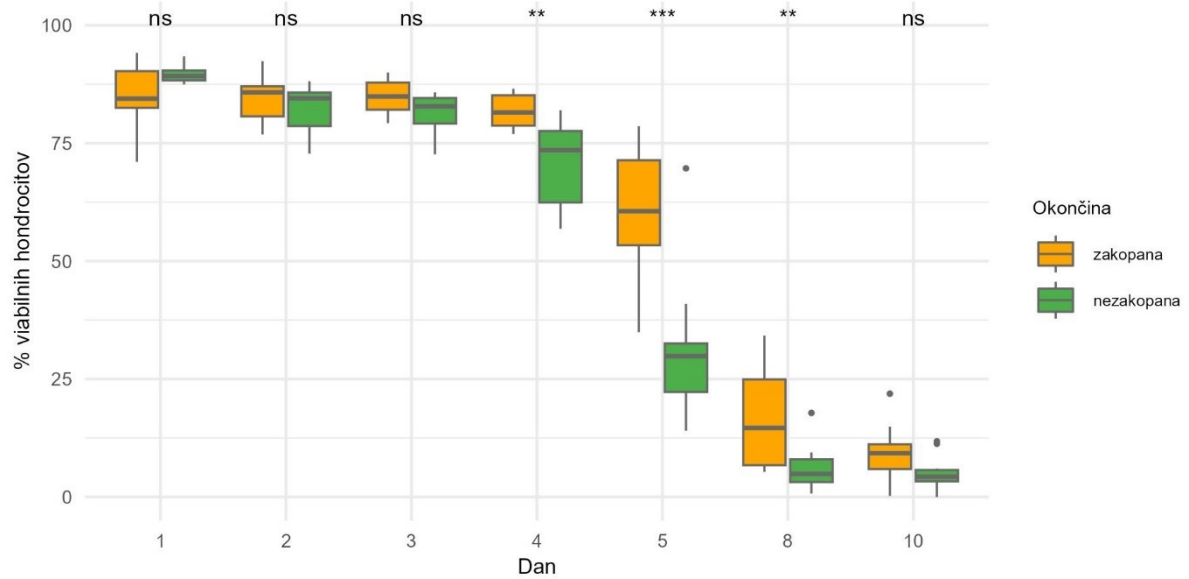
Legenda: 1 Q – prvi kvartil; 3 Q – tretji kvartil; KWT – Kruskal–Wallisov test; ns – ni statistično značilno

Tabela 7: Delež viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov zakopanih zadnjih okončin (%) na dan vzorčenja spomladi in rezultati Kruskal–Wallisovega testa v primerjavi s prvim dnevom z uporabo metode s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom

Table 7: Proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of buried hind legs (%) by day of sampling in spring and Kruskal–Wallis test results compared to the first day via the confocal laser scanning microscope method

Dan	Letni čas	Minimum	1 Q	Mediana	3 Q	Maksimum	KWT
1	Pomlad	71,03	82,48	84,44	90,27	94,15	/
2	Pomlad	76,86	80,69	85,75	87,05	92,38	ns
3	Pomlad	79,23	82,09	84,90	87,87	89,96	ns
4	Pomlad	76,96	78,74	81,52	85,15	86,55	ns
5	Pomlad	34,93	53,35	60,59	71,38	78,60	ns
8	Pomlad	5,31	6,74	14,65	24,91	34,20	p < 0,05
10	Pomlad	0,23	5,92	9,27	11,16	21,90	p < 0,05

Legenda: 1 Q – prvi kvartil; 3 Q – tretji kvartil; KWT – Kruskal–Wallisov test; ns – ni statistično značilno



Slika 9: Primerjava deležev viabilnih hondrocitov med sklepni hrustanci kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih zadnjih okončin spomladi na dan vzorčenja pri metodi s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom; ns, ni statistično značilno; *, $p < 0,0001$; **, $p < 0,001$. Okvir predstavlja spodnji in zgornji kvartil, črta v okviru označuje mediano, ročaji označujejo najmanjšo in največjo vrednost brez osamelcev, ki so označeni s točkami.**

Figure 9: Comparison of the proportion of viable chondrocytes between the articular cartilages of the knee joints of buried and unburied hind legs in spring on the day of sampling via the confocal laser scanning microscope method; ns, not statistically significant; *, $p < 0.0001$; **, $p < 0.001$. The box represents the lower and upper quartiles, the line in the box represents the median, and the handles represent the minimum and maximum values without outliers, which are indicated by dots.**

4.2.4 Poletje

Poleti smo statistično značilne razlike v deležu viabilnih hondrocitov v primerjavi s 1. dnem ugotovili 4. dan vzorčenja v sklepnih hrustancih zakopanih in nezakopanih okončin (tabeli 8 in 9). Delež viabilnih hondrocitov je v sklepnih hrustancih vseh okončin ne glede na to, ali so bile zakopane ali ne, začel padati že 2. dan vzorčenja (tabeli 8 in 9). Na 1. in 4. dan vzorčenja ni bilo statistično značilnih razlik v deležu viabilnih hondrocitov med sklepnimi hrustanci zakopanih in nezakopanih okončin (p-vrednost 1. dan – 0,2176; 4. dan – 0,0524). Ko smo primerjali deleže viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih zakopanih in nezakopanih okončin od 2. do 8. dne vzorčenja, smo ugotovili, da so imeli sklepnih hrustanci zakopanih okončin statistično višji delež viabilnih hondrocitov (p-vrednost 2. dan – 0,0147; 8. dan – 0,0002). V primerjavi med sklepnimi hrustanci zakopanih (3,27 %, IQR: 2,50 do 6,04 %) in nezakopanih (0,00 %, IQR: 0,00 do 0,00 %) okončin je bila mediana deleža viabilnih hondrocitov 8. dan vzorčenja višja pri sklepnih hrustancih zakopanih okončin (slika 10).

Tabela 8: Delež viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov nezakopanih zadnjih okončin (%) na dan vzorčenja poleti in rezultati Kruskal–Wallisovega testa v primerjavi s prvim dnem z uporabo metode s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom

Table 8: Proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of unburied hind legs (%) by day of sampling in summer and Kruskal–Wallis test results compared to the first day via the confocal laser scanning microscope method

Dan	Letni čas	Minimum	1 Q	Mediana	3 Q	Maksimum	KWT
1	Poletje	75,17	92,14	93,75	94,41	95,41	/
2	Poletje	49,67	58,02	64,59	69,91	88,35	ns
3	Poletje	17,55	25,35	35,14	47,44	68,29	ns
4	Poletje	9,44	14,54	20,87	42,30	51,89	p < 0,05
5	Poletje	0,00	0,00	0,00	0,00	5,18	p < 0,05
8	Poletje	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	p < 0,05

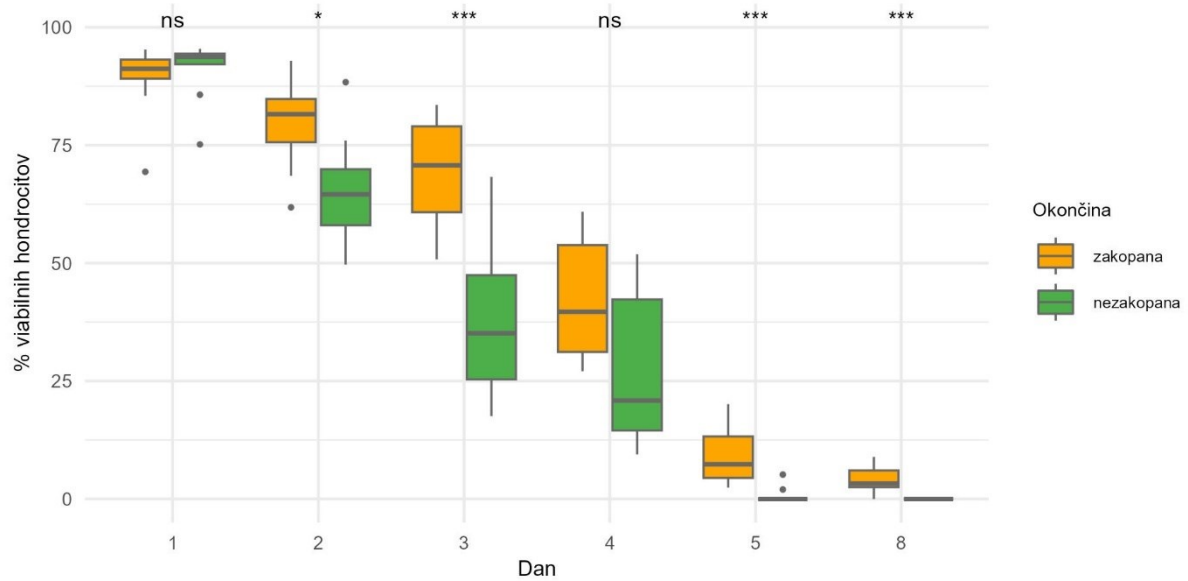
Legenda: 1 Q – prvi kvartil; 3 Q – tretji kvartil; KWT – Kruskal–Wallisov test; ns – ni statistično značilno

Tabela 9: Delež viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov zakopanih zadnjih okončin (%) na dan vzorčenja poleti in rezultati Kruskal–Wallisovega testa v primerjavi s prvim dnem z uporabo metode s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom

Table 9: Proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of buried hind legs (%) by day of sampling in summer and Kruskal–Wallis test results compared to the first day via the confocal laser scanning microscope method

Dan	Letni čas	Minimum	1 Q	Mediana	3 Q	Maksimum	KWT
1	Poletje	69,35	89,08	91,21	93,13	95,29	/
2	Poletje	61,82	75,64	81,57	84,81	92,86	ns
3	Poletje	50,80	60,80	70,75	78,98	83,54	ns
4	Poletje	27,08	31,17	39,69	53,82	60,88	p < 0,05
5	Poletje	2,43	4,45	7,35	13,25	20,11	p < 0,05
8	Poletje	0,00	2,50	3,27	6,04	8,92	p < 0,05

Legenda: 1 Q – prvi kvartil; 3 Q – tretji kvartil; KWT – Kruskal–Wallisov test; ns – ni statistično značilno



Slika 10: Primerjava deležev viabilnih hondrocitov med sklepnimi hrustanci kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih zadnjih okončin poleti na dan vzorčenja pri metodi s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom; ns, ni statistično značilno; ***, $p < 0,0001$; *, $p < 0,05$. Okvir predstavlja spodnji in zgornji kvartil, črta v okviru označuje mediano, ročaji označujejo najmanjšo in največjo vrednost brez osamelcev, ki so označeni s točkami.

Figure 10: Comparison of the proportion of viable chondrocytes between the articular cartilages of the knee joints of buried and unburied hind legs in summer on the day of sampling via the confocal laser scanning microscope method; ns, not statistically significant; ***, $p < 0.0001$; *, $p < 0.05$. The box represents the lower and upper quartiles, the line in the box represents the median, and the handles represent the minimum and maximum values without outliers, which are indicated by dots.

Povprečne temperature na površini in globini grobov, povprečje in standardna napaka v deležu viabilnih hondrocitov sklepnih hrustancev zakopanih in nezakopanih okončin za vsak dan vzorčenja (1., 2., 3., 4., 5., 8. in 10. dan po evtanaziji) in vsak letni čas so prikazani v Prilogi 2 na slikah 30–33.

4.3 REZULTATI METODE S TRIPANSKIM MODRILOM

Pozimi, spomladi in jeseni smo opazili 4. dan nabrekle hondrocite brez razločnega jedra, poleti pa 3. dan. Njihov delež je z oddaljenostjo od 1. dne naraščal. Nabrekle hondrocite smo šteli kot neviabilne.

Analiza vzorcev hrustanca z metodo s TM je potrdila statistično značilno razliko v deležu viabilnih hondrocitov med dnevi vzorčenja. Opisna statistika rezultatov za vse vzorce na posamezni dan in letni čas in rezultati Kruskal–Wallisovega testa v primerjavi s prvim dnem z uporabo metode s TM sta prikazani v tabelah 10–17. Razlike v deležih viabilnih hondrocitov med dnevi vzorčenja pri sklepnih hrustancih vseh okončin skupaj so bile pozimi in poleti po 3. dnevu, spomladi in jeseni pa po 5. dnevu vzorčenja statistično značilne ($p < 0,0001$, Kruskal-Wallisov test vsote rangov). V nobenem letnem času nismo zaznali statistično značilnih razlik v deležu viabilnih hondrocitov med zaporednima vzorčenjema.

Slike 11–14 prikazujejo primerjavo deležev viabilnih hondrocitov med sklepnimi hrustanci kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih zadnjih v različnih dneh vzorčenja (1., 2., 3., 4., 5., 8. in 10. dan po evtanaziji) za vsak letni čas z uporabo metode s TM. Nad vsakim okvirom z ročaji so rezultati Wilcoxonovega testa vsote rangov.

4.3.1 Jesen

Jeseni smo statistično značilne razlike v deležih viabilnih hondrocitov pri sklepnih hrustancih zakopanih in nezakopanih okončin v primerjavi s 1. dnem ugotovili 8. dan vzorčenja (tabeli 10 in 11). Delež viabilnih hondrocitov je v sklepnih hrustancih zakopanih in nezakopanih okončin začel padati 8. dan vzorčenja (tabeli 10 in 11). V tem letnem času ni bilo statistično značilnih razlik v deležu viabilnih hondrocitov med sklepnimi hrustanci zakopanih in nezakopanih okončin (p-vrednost od 0,2500 do 0,9100) (slika 11).

Tabela 10: Delež viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov nezakopanih zadnjih okončin (%) na dan vzorčenja jeseni in rezultati Kruskal–Wallisovega testa v primerjavi s prvim dnem z uporabo metode s tripanskim modrilom

Table 10: Proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of unburied hind legs (%) by day of sampling in the fall and Kruskal–Wallis test results compared to the first day via the trypan blue method

Dan	Letni čas	Minimum	1. Q	Mediana	3. Q	Maksimum	KWT
1	Jesen	48,06	71,17	85,66	88,23	96,06	/
2	Jesen	73,17	87,36	89,84	92,42	95,38	ns
3	Jesen	46,12	62,75	73,07	84,73	88,41	ns
4	Jesen	0,91	62,00	75,60	85,01	86,92	ns
5	Jesen	47,83	69,51	70,95	73,69	81,89	ns
8	Jesen	5,83	10,01	19,67	37,35	54,07	p < 0,05
10	Jesen	0,54	2,04	11,25	27,08	51,92	p < 0,05

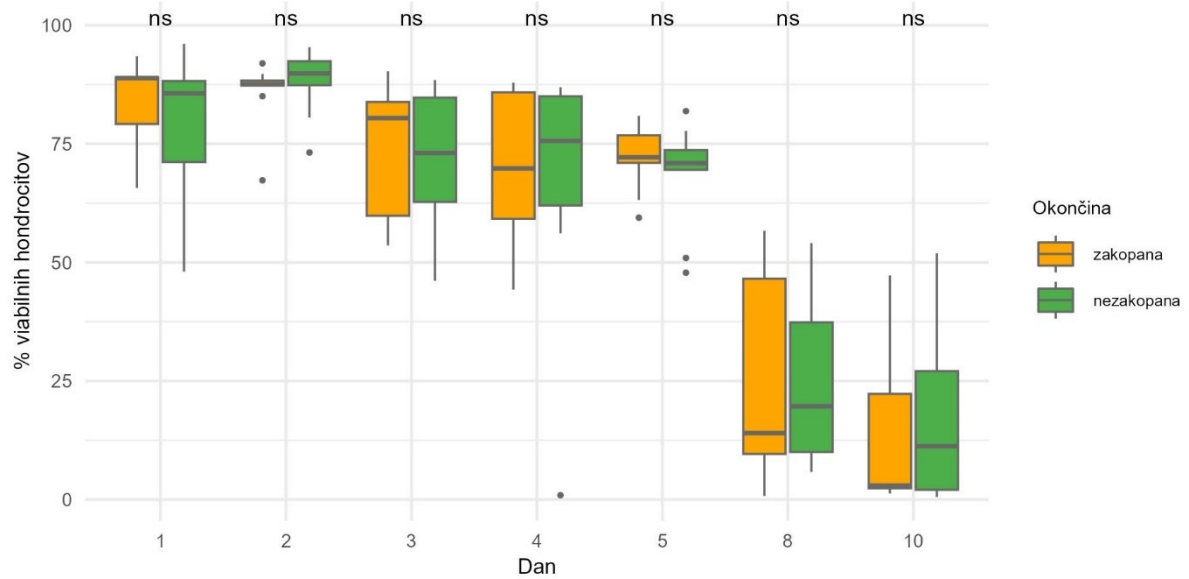
Legenda: 1 Q – prvi kvartil; 3 Q – tretji kvartil; KWT – Kruskal–Wallisov test; ns – ni statistično značilno

Tabela 11: Delež viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov zakopanih zadnjih okončin (%) na dan vzorčenja jeseni in rezultati Kruskal–Wallisovega testa v primerjavi s prvim dnem z uporabo metode s tripanskim modrilom

Table 11: Proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of buried hind legs (%) by day of sampling in the fall and Kruskal–Wallis test results compared to the first day via the trypan blue method

Dan	Letni čas	Minimum	1. Q	Mediana	3. Q	Maksimum	KWT
1	Jesen	65,69	79,18	88,84	89,04	93,44	/
2	Jesen	67,31	87,30	87,54	88,33	91,96	ns
3	Jesen	53,58	59,82	80,42	83,85	90,30	ns
4	Jesen	44,25	59,17	69,81	85,87	87,88	ns
5	Jesen	59,42	70,97	72,16	76,82	80,91	ns
8	Jesen	0,74	9,60	14,01	46,55	56,69	p < 0,05
10	Jesen	1,28	2,36	2,94	22,27	47,25	p < 0,05

Legenda: 1 Q – prvi kvartil; 3 Q – tretji kvartil; KWT – Kruskal–Wallisov test; ns – ni statistično značilno



Slika 11: Primerjava deležev viabilnih hondrocitov med sklepnimi hrustanci kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih zadnjih okončin jeseni na dan vzorčenja pri metodi s tripanskim modrilom; ns, ni statistično značilno. Okvir predstavlja spodnji in zgornji kvartil, črta v okviru označuje mediano, ročaji označujejo najmanjšo in največjo vrednost brez osamelcev, ki so označeni s točkami.

Figure 11: Comparison of the proportion of viable chondrocytes between the articular cartilages of the knee joints of buried and unburied hind legs in the fall on the day of sampling via the trypan blue method; ns, not statistically significant. The box represents the lower and upper quartiles, the line in the box represents the median, and the handles represent the minimum and maximum values without outliers, which are indicated by dots.

4.3.2 Zima

Pozimi smo statistično značilne razlike v deležu viabilnih hondrocitov v primerjavi s 1. dnem ugotovili 4. dan pri sklepnih hrustancih nezakopanih okončin (tabela 12) in 8. dan vzorčenja pri sklepnih hrustancih zakopanih okončin (tabela 13). Delež viabilnih hondrocitov je v sklepnih hrustancih nezakopanih okončin začel padati 3. dan (tabela 12), v sklepnih hrustancih zakopanih okončin pa 4. dan vzorčenja (tabela 13). Prva dva dni in od 5. do 10. dne vzorčenja ni bilo statistično značilnih razlik v deležu viabilnih hondrocitov med sklepnimi hrustanci zakopanih in nezakopanih okončin (p-vrednost od 0,7400 do 0,0600). Tretji in 4. dan vzorčenja so imeli sklepnimi hrustanci zakopanih okončin statistično višji delež viabilnih hondrocitov (p-vrednost 3. dan – 0,0435; 4. dan – 0,0021). V primerjavi med sklepnimi hrustanci zakopanih (4,40 %, IQR: 0,54 do 8,37 %) in nezakopanih (0,58 %, IQR: 0,00 do 4,11 %) okončin je bila mediana deleža viabilnih hondrocitov 10. dan vzorčenja višja pri sklepnih hrustancih zakopanih okončin (slika 12).

Tabela 12: Delež viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov nezakopanih zadnjih okončin (%) na dan vzorčenja pozimi in rezultati Kruskal–Wallisovega testa v primerjavi s prvim dnem z uporabo metode s tripanskim modrilom

Table 12: Proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of unburied hind legs (%) by day of sampling in winter and Kruskal–Wallis test results compared to the first day via the trypan blue method

Dan	Letni čas	Minimum	1. Q	Mediana	3. Q	Maksimum	KWT
1	Zima	71,60	74,90	80,09	87,05	93,95	/
2	Zima	43,09	66,29	76,00	80,57	89,45	ns
3	Zima	24,11	51,09	63,13	67,68	85,36	ns
4	Zima	2,02	27,45	44,61	49,18	70,94	p < 0,05
5	Zima	1,47	9,20	29,48	46,94	59,07	p < 0,05
8	Zima	0,00	1,78	3,67	7,65	11,07	p < 0,05
10	Zima	0,00	0,00	0,58	4,11	4,61	p < 0,05

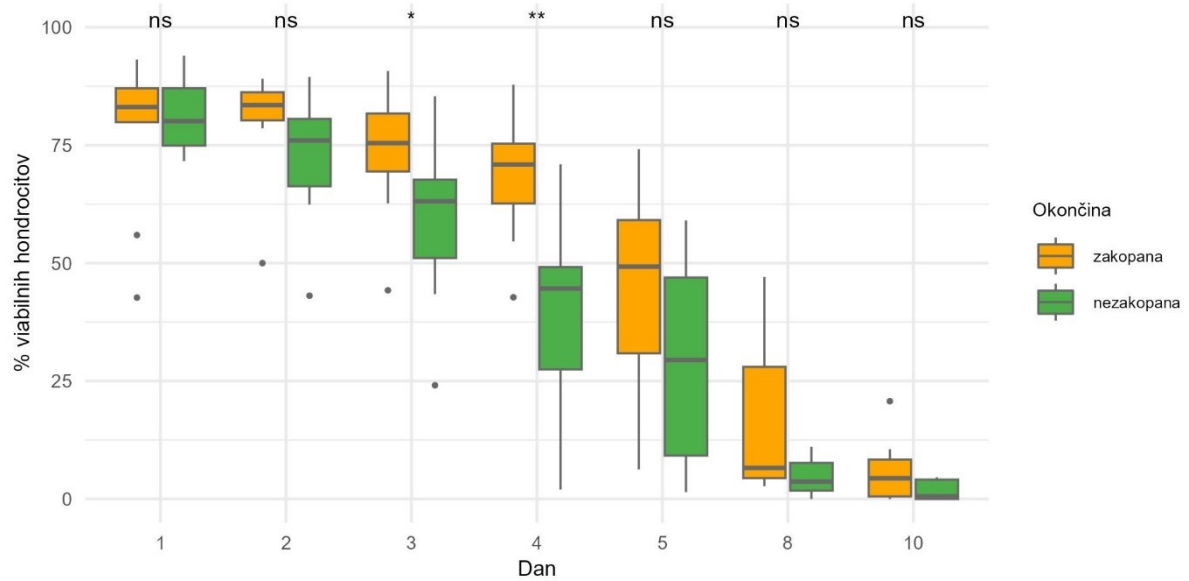
Legenda: 1 Q – prvi kvartil; 3 Q – tretji kvartil; KWT – Kruskal–Wallisov test; ns – ni statistično značilno

Tabela 13: Delež viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov zakopanih zadnjih okončin (%) na dan vzorčenja pozimi in rezultati Kruskal–Wallisovega testa v primerjavi s prvim dnem z uporabo metode s tripanskim modrilom

Table 13: Proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of buried hind legs (%) by day of sampling in winter and Kruskal–Wallis test results compared to the first day via the trypan blue method

Dan	Letni čas	Minimum	1. Q	Mediana	3. Q	Maksimum	KWT
1	Zima	42,69	79,86	83,09	87,04	93,15	/
2	Zima	50,00	80,27	83,52	86,23	89,10	ns
3	Zima	44,23	69,43	75,45	81,73	90,74	ns
4	Zima	42,75	62,63	70,90	75,31	87,81	ns
5	Zima	6,25	30,88	49,27	59,12	74,15	ns
8	Zima	2,70	4,42	6,60	28,00	47,06	p < 0,05
10	Zima	0,00	0,54	4,40	8,37	20,73	p < 0,05

Legenda: 1 Q – prvi kvartil; 3 Q – tretji kvartil; KWT – Kruskal–Wallisov test; ns – ni statistično značilno



Slika 12: Primerjava deležev viabilnih hondrocitov med sklepnimi hrustanci kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih zadnjih okončin pozimi na dan vzorčenja pri metodi s tripanskim modrilom; ns, ni statistično značilno; **, $p < 0,001$; *, $p < 0,05$. Okvir predstavlja spodnji in zgornji kvartil, črta v okviru označuje mediano, ročaji označujejo najmanjšo in največjo vrednost brez osamelcev, ki so označeni s točkami.

Figure 12: Comparison of the proportion of viable chondrocytes between the articular cartilages of the knee joints of buried and unburied hind legs in winter on the day of sampling via the trypan blue method; ns, not statistically significant; **, $p < 0.001$; *, $p < 0.05$. The box represents the lower and upper quartiles, the line in the box represents the median, and the handles represent the minimum and maximum values without outliers, which are indicated by dots.

4.3.3 Pomlad

Spomladi smo statistično značilne razlike v deležu viabilnih hondrocitov v primerjavi s 1. dnem ugotovili 8. dan vzorčenja pri sklepnih hrustancih nezakopanih okončin (tabela 14) in 10. dan vzorčenja pri sklepnih hrustancih zakopanih okončin (tabela 15). Delež viabilnih hondrocitov je v sklepnih hrustancih zakopanih in nezakopanih okončin začel padati 5. dan vzorčenja (tabeli 14 in 15). Na 1. dan in vse do 3. dne vzorčenja ter 5. in 10. dan vzorčenja ni bilo statistično značilnih razlik v deležu viabilnih hondrocitov med sklepnimi hrustanci zakopanih in nezakopanih okončin (p -vrednost od 0,0890 do 0,8530). Ko smo primerjali deleže viabilnih hondrocitov sklepnih hrustancev zakopanih in nezakopanih okončin 4. in 8. dan vzorčenja, smo ugotovili, da so imeli sklepnih hrustanci zakopanih okončin statistično višji delež viabilnih hondrocitov (p -vrednost 4. dan – 0,0190; 8. dan – 0,0110). V primerjavi med sklepnimi hrustanci zakopanih (2,69 %, IQR: 0,75 do 18,52 %) in nezakopanih (1,36 %, IQR: 0,34 do 4,82 %) okončin je bila mediana deleža viabilnih hondrocitov 10. dan vzorčenja višja pri sklepnih hrustancih zakopanih okončin (slika 13).

Tabela 14: Delež viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov nezakopanih zadnjih okončin (%) na dan vzorčenja spomladi in rezultati Kruskal–Wallisovega testa v primerjavi s prvim dnem z uporabo metode s tripanskim modrilom

Table 14: Proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of unburied hind legs (%) by day of sampling in spring and Kruskal–Wallis test results compared to the first day via the trypan blue method

Dan	Letni čas	Minimum	1. Q	Mediana	3. Q	Maksimum	KWT
1	Pomlad	57,54	62,42	68,86	76,71	81,46	/
2	Pomlad	63,29	69,61	72,81	77,48	91,27	ns
3	Pomlad	53,88	66,41	69,21	70,76	79,52	ns
4	Pomlad	53,02	59,12	61,16	64,80	73,58	ns
5	Pomlad	7,42	31,36	41,68	52,26	58,59	ns
8	Pomlad	0,00	0,19	1,09	4,04	15,25	p < 0,05
10	Pomlad	0,00	0,34	1,36	4,82	15,85	p < 0,05

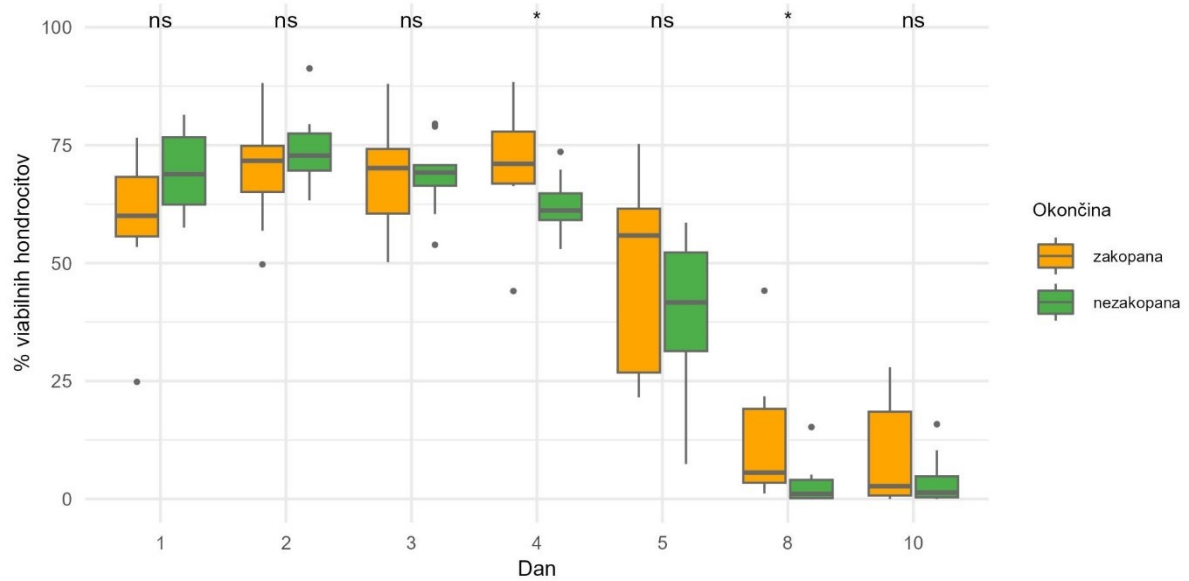
Legenda: 1 Q – prvi kvartil; 3 Q – tretji kvartil; KWT – Kruskal–Wallisov test; ns – ni statistično značilno

Tabela 15: Delež viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov zakopanih zadnjih okončin (%) na dan vzorčenja spomladi in rezultati Kruskal–Wallisovega testa v primerjavi s prvim dnem z uporabo metode s tripanskim modrilom

Table 15: Proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of buried hind legs (%) by day of sampling in spring and Kruskal–Wallis test results compared to the first day via the trypan blue method

Dan	Letni čas	Minimum	1. Q	Mediana	3. Q	Maksimum	KWT
1	Pomlad	24,83	55,67	60,04	68,27	76,57	/
2	Pomlad	49,73	65,07	71,70	74,84	88,19	ns
3	Pomlad	50,20	60,49	70,15	74,20	88,01	ns
4	Pomlad	44,08	66,86	71,04	77,86	88,39	ns
5	Pomlad	21,53	26,80	55,86	61,53	75,27	ns
8	Pomlad	1,15	3,43	5,61	19,12	44,15	ns
10	Pomlad	0,00	0,75	2,69	18,52	27,96	p < 0,05

Legenda: 1 Q – prvi kvartil; 3 Q – tretji kvartil; KWT – Kruskal–Wallisov test; ns – ni statistično značilno



Slika 13: Primerjava deležev viabilnih hondrocitov med sklepnimi hrustanci kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih zadnjih okončin spomladi na dan vzorčenja pri metodi s tripanskim modrilom; ns, ni statistično značilno; *, $p < 0,05$. Okvir predstavlja spodnji in zgornji kvartil, črta v okviru označuje mediano, ročaji označujejo najmanjšo in največjo vrednost brez osamelcev, ki so označeni s točkami.

Figure 13: Comparison of the proportion of viable chondrocytes between the articular cartilages of the knee joints of buried and unburied hind legs in spring on the day of sampling via the trypan blue method; ns, not statistically significant; *, $p < 0.05$. The box represents the lower and upper quartiles, the line in the box represents the median, and the handles represent the minimum and maximum values without outliers, which are indicated by dots.

4.3.4 Poletje

Poleti smo statistično značilne razlike v deležu viabilnih hondrocitov v primerjavi s 1. dnem vzorčenja ugotovili 4. dan pri sklepnih hrustancih zakopanih in nezakopanih okončin (tabeli 16 in 17). Delež viabilnih hondrocitov je v sklepnih hrustancih vseh okončin ne glede na to, ali so bile zakopane ali nezakopane, začel padati že 2. dan vzorčenja (tabeli 16 in 17). Statistično značilnih razlik v deležu viabilnih hondrocitov med sklepnimi hrustanci zakopanih in nezakopanih okončin nismo ugotovili 3., 4. in 8. dan vzorčenja (p-vrednost od 0,1230 do 0,3680). Ko smo primerjali deleže viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih zakopanih in nezakopanih okončin 1., 2. in 5. dan vzorčenja, smo ugotovili, da so imeli sklepni hrustanci zakopanih okončin statistično višji delež viabilnih hondrocitov (p-vrednost 1. in 2. dan – 0,0110; 5. dan – 0,0350). V primerjavi med sklepnimi hrustanci zakopanih (12,13 %, IQR: 3,47 do 22,58 %) in nezakopanih (4,10 %, IQR: 0,00 do 11,85 %) okončin je bila mediana deleža viabilnih hondrocitov 4. dan vzorčenja višja pri sklepnih hrustancih zakopanih okončin (slika 14).

Tabela 16: Delež viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov nezakopanih zadnjih okončin (%) na dan vzorčenja poleti in rezultati Kruskal–Wallisovega testa v primerjavi s prvim dnevom z uporabo metode s tripanskim modrilom

Table 16: Proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of unburied hind legs (%) by day of sampling in the fall and Kruskal–Wallis test results compared to the first day via the trypan blue method

Dan	Letni čas	Minimum	1. Q	Mediana	3. Q	Maksimum	KWT
1	Poletje	45,36	64,26	67,03	70,46	72,23	/
2	Poletje	2,13	12,86	20,01	29,58	34,33	ns
3	Poletje	2,26	9,61	15,79	32,57	57,89	ns
4	Poletje	0,00	0,00	4,10	11,85	26,04	p < 0,05
5	Poletje	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	p < 0,05
8	Poletje	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	p < 0,05

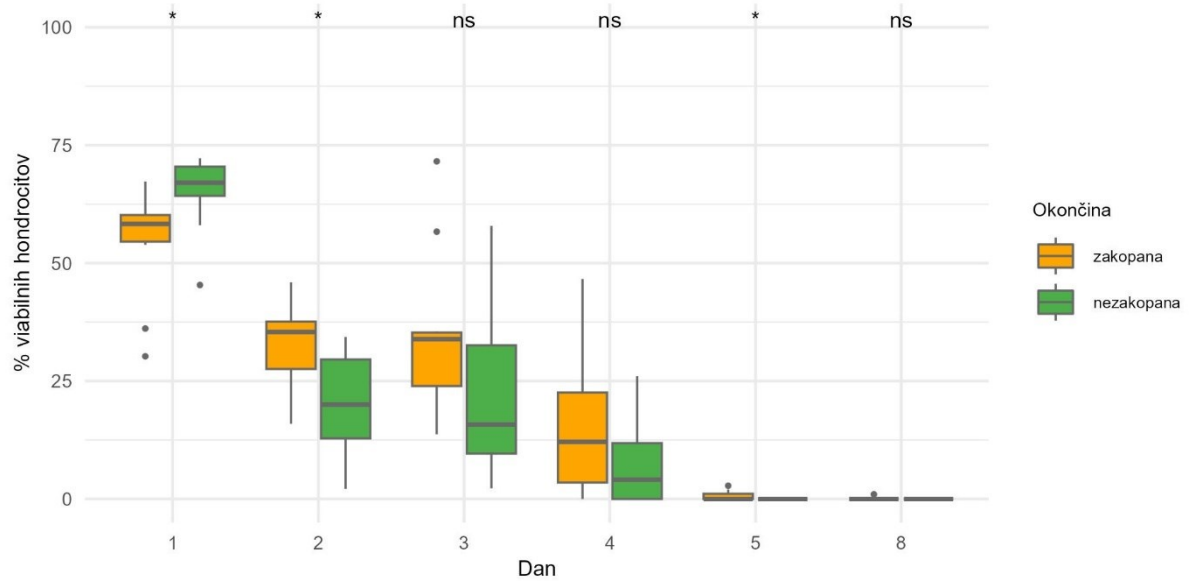
Legenda: 1 Q – prvi kvartil; 3 Q – tretji kvartil; KWT – Kruskal–Wallisov test; ns – ni statistično značilno

Tabela 17: Delež viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov zakopanih zadnjih okončin (%) na dan vzorčenja poleti in rezultati Kruskal–Wallisovega testa v primerjavi s prvim dnevom z uporabo metode s tripanskim modrilom

Table 17: Proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of buried hind legs (%) by day of sampling in the fall and Kruskal–Wallis test results compared to the first day via the trypan blue method

Dan	Letni čas	Minimum	1. Q	Mediana	3. Q	Maksimum	KWT
1	Poletje	30,25	54,55	58,30	60,20	67,31	/
2	Poletje	15,94	27,55	35,39	37,59	45,92	ns
3	Poletje	13,73	23,93	33,87	35,30	71,57	ns
4	Poletje	0,00	3,47	12,13	22,58	46,62	p < 0,05
5	Poletje	0,00	0,00	0,00	1,12	2,81	p < 0,05
8	Poletje	0,00	0,00	0,00	0,00	0,99	p < 0,05

Legenda: 1 Q – prvi kvartil; 3 Q – tretji kvartil; KWT – Kruskal–Wallisov test; ns – ni statistično značilno



Slika 14: Primerjava deležev viabilnih hondrocitov med sklepnimi hrustanci kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih zadnjih okončin poleti na dan vzorčenja pri metodi s tripanskim modrilom; ns, ni statistično značilno; *, $p < 0,05$. Okvir predstavlja spodnji in zgornji kvartil, črta v okviru označuje mediano, ročaji označujejo najmanjšo in največjo vrednost brez osamelcev, ki so označeni s točkami.

Figure 14: Comparison of the proportion of viable chondrocytes between the articular cartilages of the knee joints of buried and unburied hind legs in summer on the day of sampling via the trypan blue method; ns, not statistically significant; *, $p < 0.05$. The box represents the lower and upper quartiles, the line in the box represents the median, and the handles represent the minimum and maximum values without outliers, which are indicated by dots.

Povprečne temperature na površini in globini grobov, povprečje in standardna napaka v deležu viabilnih hondrocitov sklepnih hrustancev zakopanih in nezakopanih okončin za vsak dan vzorčenja (1., 2., 3., 4., 5., 8. in 10. dan po evtanaziji) in vsak letni čas so prikazani v Prilogi 3 na slikah 34–37.

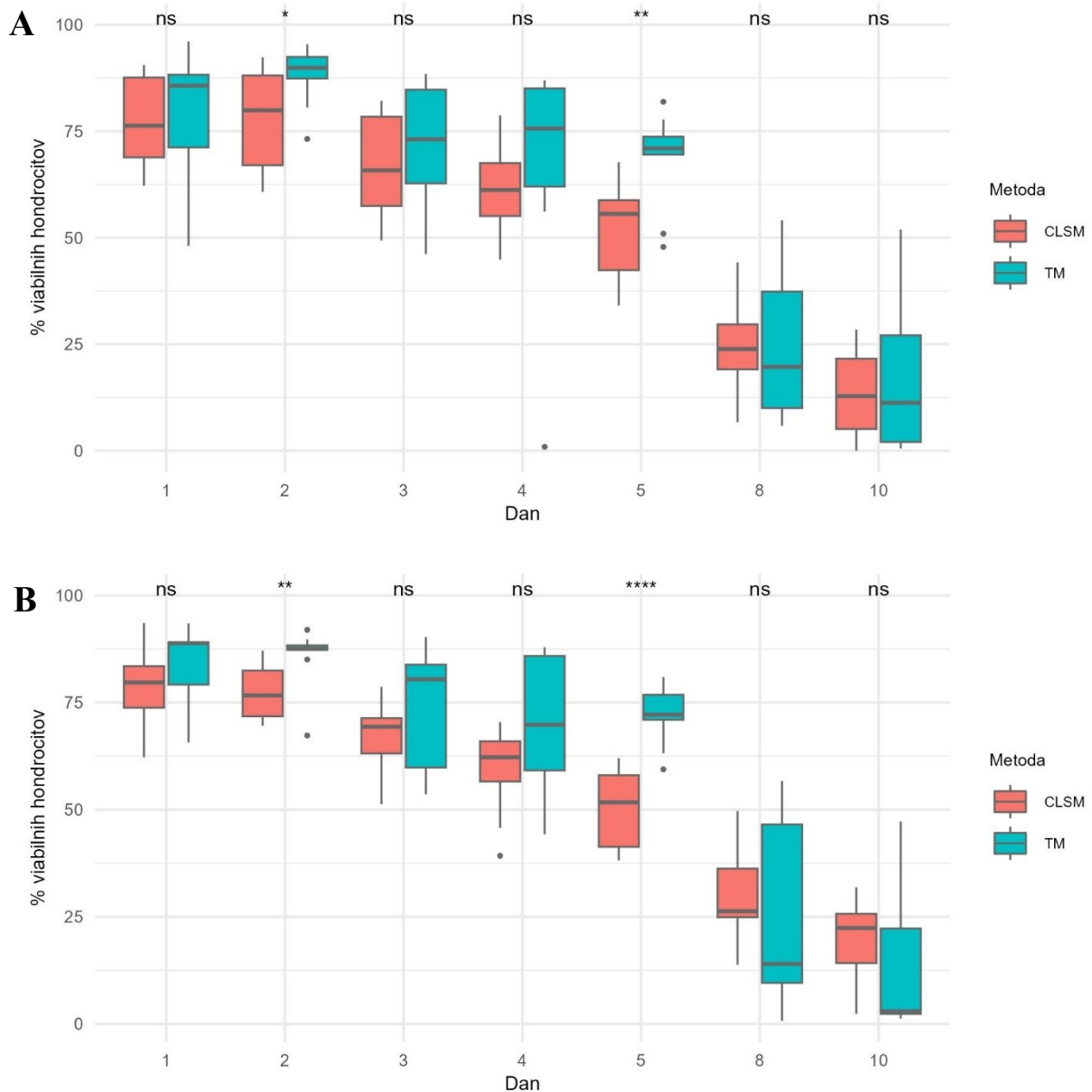
4.4 PRIMERJAVA REZULTATOV METODE S CLSM IN S TM

Slike 15–18 prikazujejo rezultate primerjav deležev viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih okončin med metodama s CLSM in TM. V vsakem paru slik je prikaz primerjave deleža viabilnih hondrocitov med sklepnimi hrustanci nezakopanih (A) in zakopanih okončin (B). Nad vsakim okvirom z ročaji so rezultati Wilcoxonovega testa vsote rangov.

4.4.1 Jesen

Jeseni smo statistično značilne razlike v deležu viabilnih hondrocitov med metodama s CLSM in TM pri sklepnih hrustancih nezakopanih okončin (slika 15 A) ugotovili le 2. in 5. dan vzorčenja (p-vrednosti 2. dan – 0,0360; 5. dan – 0,0040). Druge dni vzorčenja ni bilo statistično značilnih razlik v deležu viabilnih hondrocitov med metodama s CLSM in TM pri sklepnih hrustancih nezakopanih okončin, kljub temu pa je bil standardni odklon pri metodi s TM v primerjavi z metodo s CLSM višji 3., 4., 8. in 10. dan vzorčenja.

Jeseni smo statistično značilne razlike v deležu viabilnih hondrocitov med metodama s CLSM in TM pri sklepnih hrustancih zakopanih okončin (slika 15 B) ugotovili le 2. in 5. dan vzorčenja (p-vrednost 2. dan – 0,0020; 5. dan < 0,0001). Druge dni vzorčenja ni bilo statistično značilnih razlik v deležu viabilnih hondrocitov med metodama s CLSM in TM pri sklepnih hrustancih zakopanih okončin, kljub temu pa je bil standardni odklon v deležu viabilnih hondrocitov pri metodi s TM v primerjavi z metodo s CLSM višji 2., 3., 4., 8. in 10. dan vzorčenja.



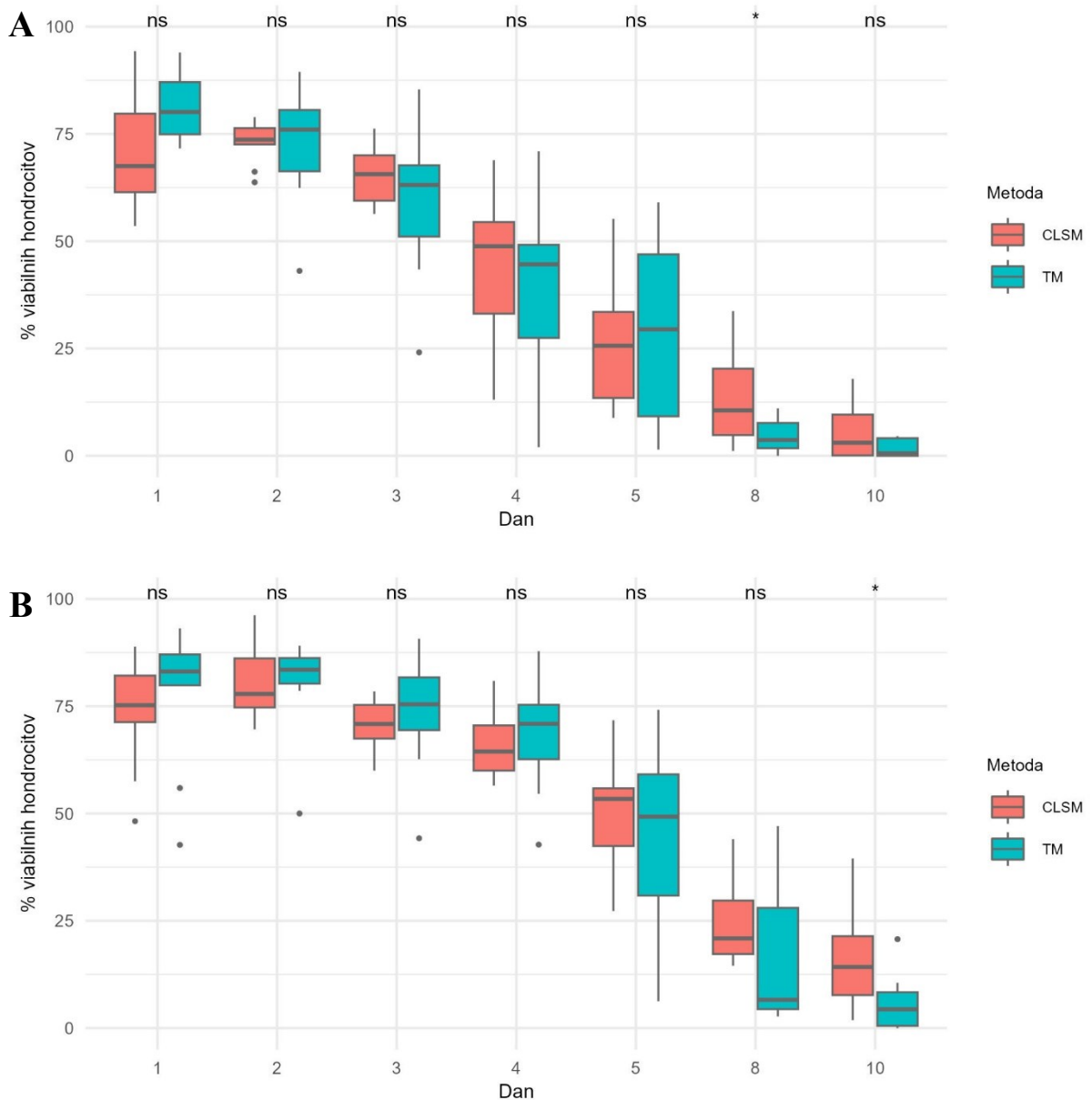
Slika 15: Primerjava deležev viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov nezakopanih (A) in zakopanih (B) zadnjih okončin med metodo s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom in metodo s tripanskim modrilom jeseni na dan vzorčenja; ns, ni statistično značilno; ****, $p < 0,0001$; **, $p < 0,001$; *, $p < 0,05$. Okvir predstavlja spodnji in zgornji kvartil, črta v okviru označuje mediano, ročaji označujejo najmanjšo in največjo vrednost brez osamelcev, ki so označeni s točkami.

Figure 15: Comparison of the proportions of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of unburied (A) and buried (B) hind legs between the confocal scanning microscopy method and the trypan blue method in the fall on the day of sampling; ns, not statistically significant; ****, $p < 0.0001$; **, $p < 0.001$; *, $p < 0.05$. The box represents the lower and upper quartiles, the line in the box indicates the median, the handles show the minimum and maximum values without outliers, which are indicated by dots.

4.4.2 Zima

Pozimi smo statistično značilne razlike v deležu viabilnih hondrocitov med metodama s CLSM in TM pri sklepnih hrustancih nezakopanih okončin (slika 16 A) ugotovili le 8. dan vzorčenja (p-vrednost 0,0380). Druge dni vzorčenja ni bilo statistično značilnih razlik v deležu viabilnih hondrocitov med metodama s CLSM in TM pri sklepnih hrustancih nezakopanih okončin, kljub temu pa je bil standardni odklon pri metodi s TM v primerjavi z metodo s CLSM višji 2., 3., 4. in 5. dan vzorčenja.

Pozimi smo statistično značilne razlike v deležu viabilnih hondrocitov med metodama s CLSM in TM pri sklepnih hrustancih zakopanih okončin (slika 16 B) ugotovili 10. dan vzorčenja (p-vrednost 0,0290). Druge dni vzorčenja ni bilo statistično značilnih razlik v deležu viabilnih hondrocitov med metodama s CLSM in TM pri sklepnih hrustancih zakopanih okončin, kljub temu pa je bil standardni odklon v deležu viabilnih hondrocitov pri metodi s TM v primerjavi z metodo s CLSM višji 2., 3., 4., 5. in 8. dan vzorčenja.



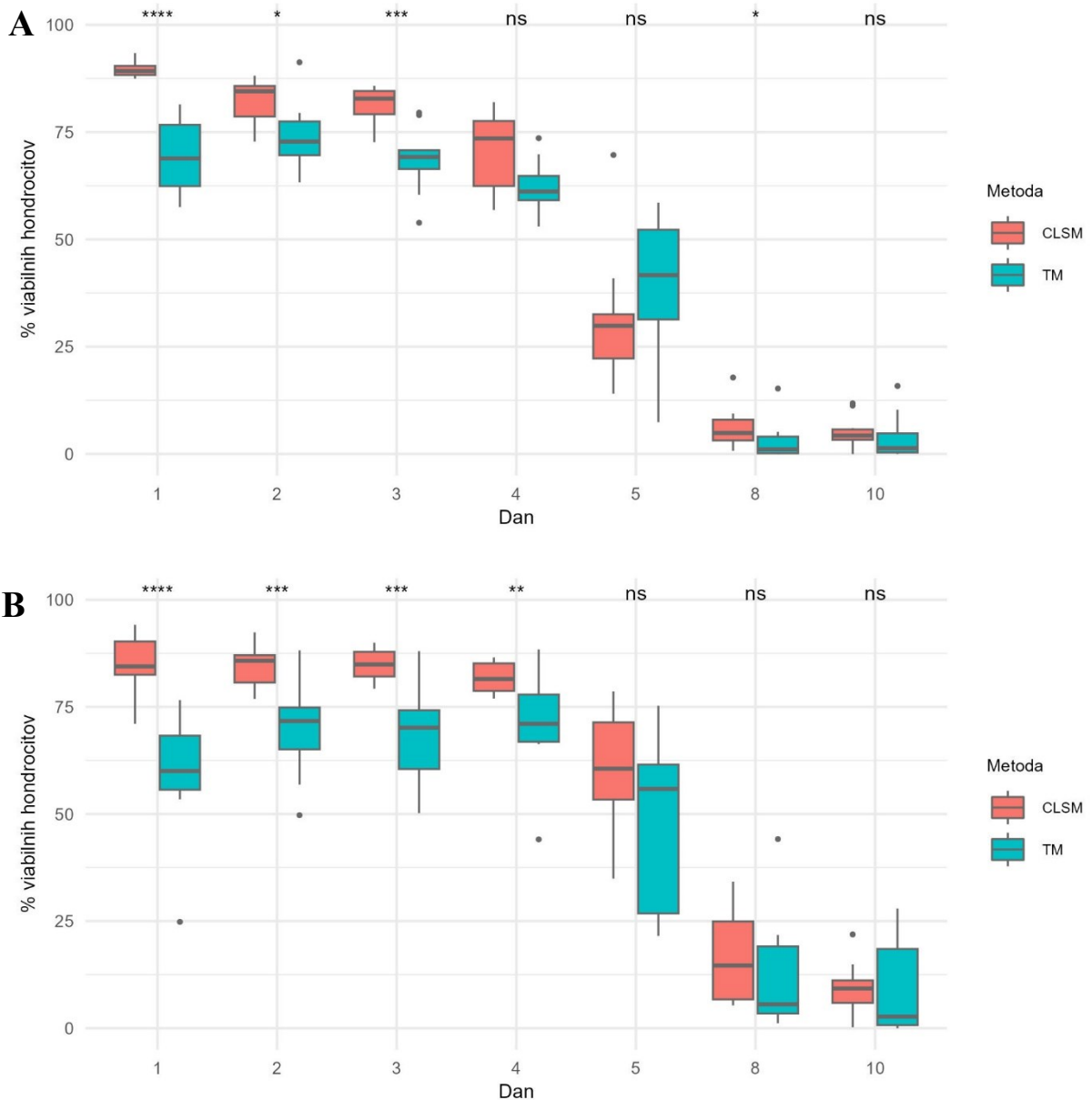
Slika 16: Primerjava deležev viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov nezakopanih (A) in zakopanih (B) zadnjih okončin med metodo s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom in metodo s tripanskim modrilom pozimi na dan vzorčenja; ns, ni statistično značilno; *, $p < 0,05$. Okvir predstavlja spodnji in zgornji kvartil, črta v okviru označuje mediano, ročaji označujejo najmanjšo in največjo vrednost brez osamelcev, ki so označeni s točkami.

Figure 16: Comparison of the proportions of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of unburied (A) and buried (B) hind legs between the confocal scanning microscopy method and the trypan blue method in winter on the day of sampling; ns, not statistically significant; *, $p < 0.05$. The box represents the lower and upper quartiles, the line in the box indicates the median, the handles show the minimum and maximum values without outliers, which are indicated by dots.

4.4.3 Pomlad

Spomladi smo statistično značilne razlike v deležu viabilnih hondrocitov med metodama s CLSM in TM pri sklepnih hrustancih nezakopanih okončin (slika 17 A) ugotovili prve 3 dni in 8. dan vzorčenja (p-vrednost od $< 0,0001$ do $0,0450$). Druge dni ni bilo statistično značilnih razlik v deležu viabilnih hondrocitov med metodama s CLSM in TM pri sklepnih hrustancih nezakopanih okončin, kljub temu pa je bil standardni odklon v deležu viabilnih hondrocitov pri metodi s TM v primerjavi z metodo s CLSM višji 2., 3., 5. in 10. dan vzorčenja.

Spomladi smo statistično značilne razlike v deležu viabilnih hondrocitov med metodama s CLSM in TM pri sklepnih hrustancih zakopanih okončin (slika 17 B) ugotovili prve 4 dni vzorčenja (p-vrednost od $< 0,0001$ do $0,0090$). V tem letnem času ni bilo statistično značilnih razlik v deležu viabilnih hondrocitov med metodama s CLSM in TM pri sklepnih hrustancih zakopanih okončin, kljub temu pa je bil standardni odklon v deležu viabilnih hondrocitov pri metodi s TM v primerjavi z metodo s CLSM višji vse dni vzorčenja.



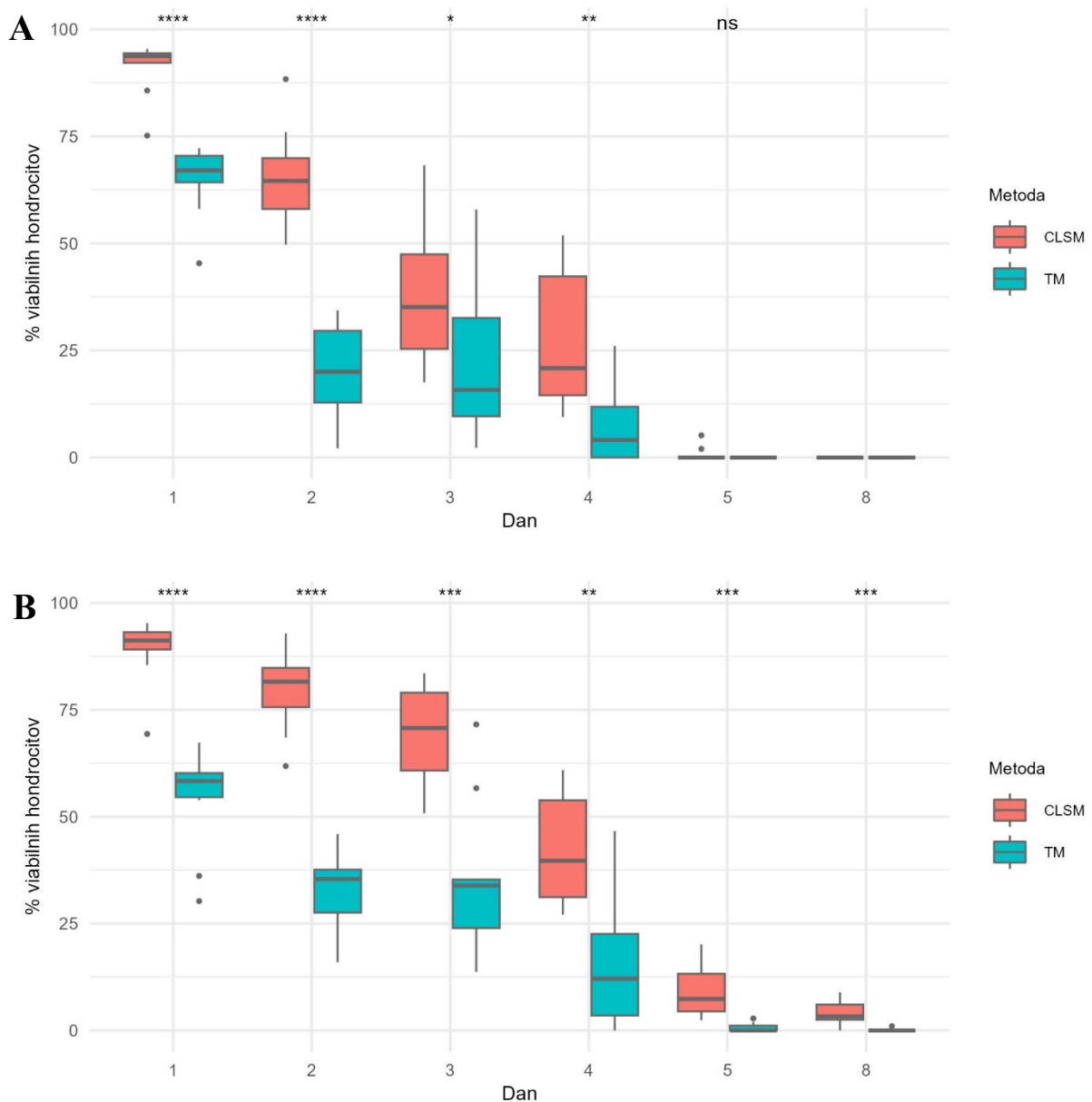
Slika 17: Primerjava deležev viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov nezakopanih (A) in zakopanih (B) zadnjih okončin med metodo s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom in metodo s tripanskim modrilom spomladi na dan vzorčenja; ns, ni statistično značilno; ***, $p < 0,0001$; **, $p < 0,001$; *, $p < 0,05$. Okvir predstavlja spodnji in zgornji kvartil, črta v okviru označuje mediano, ročaji označujejo najmanjšo in največjo vrednost brez osamelcev, ki so označeni s točkami.

Figure 17: Comparison of the proportions of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of unburied (A) and buried (B) hind legs between the confocal scanning microscopy method and the trypan blue method in spring on the day of sampling; ns, not statistically significant; ***, $p < 0.0001$; **, $p < 0.001$; *, $p < 0.05$. The box represents the lower and upper quartiles, the line in the box indicates the median, the handles show the minimum and maximum values without outliers, which are indicated by dots.

4.4.4 Poletje

Poleti smo statistično značilne razlike v deležu viabilnih hondrocitov med metodama s CLSM in TM pri sklepnih hrustancih nezakopanih okončin (slika 18 A) ugotovili prve 4 dni vzorčenja (p-vrednost od $< 0,0001$ do $0,0030$). 5. dan vzorčenja ni bilo statistično značilnih razlik v deležu viabilnih hondrocitov med metodama s CLSM in TM pri sklepnih hrustancih nezakopanih okončin, kljub temu pa je bil standardni odklon v deležu viabilnih hondrocitov pri metodi s TM v primerjavi z metodo s CLSM višji 3. dan vzorčenja.

Poleti smo statistično značilne razlike v deležu viabilnih hondrocitov med metodama s CLSM in TM pri sklepnih hrustancih zakopanih okončin (slika 18 B) ugotovili vse dni vzorčenja (p-vrednost $0,0001$ do $0,0010$). Standardni odklon v deležu viabilnih hondrocitov je bil pri metodi s TM v primerjavi z metodo s CLSM višji 2., 3. in 4. dan vzorčenja.

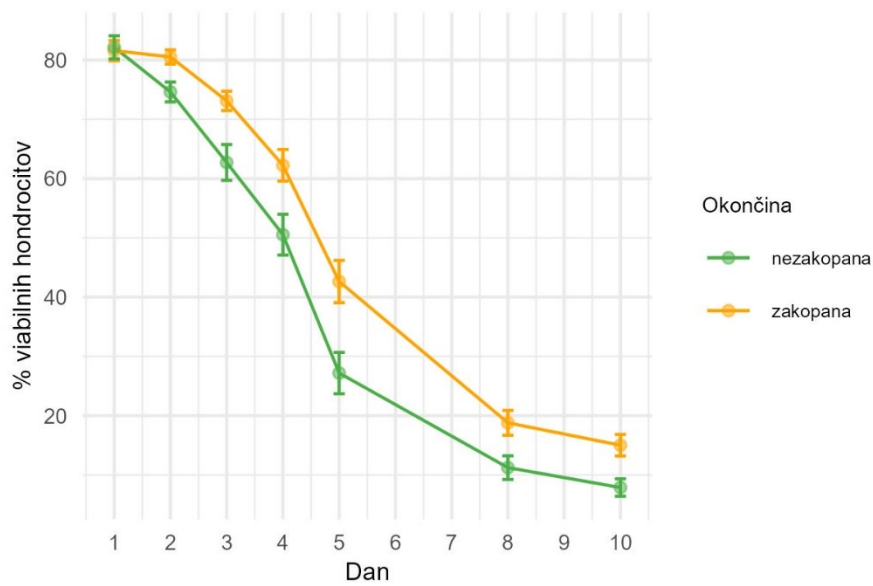


Slika 18: Primerjava deležev viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov nezakopanih (A) in zakopanih (B) zadnjih okončin med metodo s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom in metodo s tripanskim modrilom poleti na dan vzorčenja; ns, ni statistično značilno; ****, $p < 0,0001$; **, $p < 0,001$; *, $p < 0,05$. Okvir predstavlja spodnji in zgornji kvartil, črta v okviru označuje mediano, ročaji označujejo najmanjšo in največjo vrednost brez osamelcev, ki so označeni s točkami.

Figure 18: Comparison of the proportions of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of unburied (A) and buried (B) hind legs between the confocal scanning microscopy method and the trypan blue method in summer on the day of sampling; ns, not statistically significant; ****, $p < 0.0001$; **, $p < 0.001$; *, $p < 0.05$. The box represents the lower and upper quartiles, the line in the box indicates the median, the handles show the minimum and maximum values without outliers, which are indicated by dots.

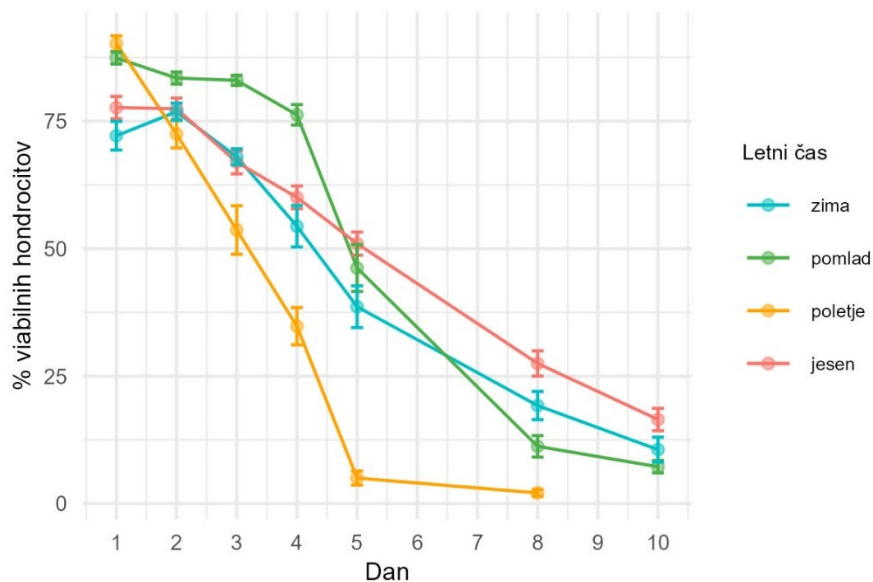
4.5 REGRESIJSKI MODEL

Z razvojem multiplega linearnega regresijskega modela smo proučili vpliv različnih dejavnikov na preživetje hondrocitov, saj smo hkrati upoštevali vse letne čase ter zakopane in nezakopane okončine. Ugotovili smo, da na delež viabilnih hondrocitov statistično značilno vplivata neodvisni spremenljivki zakop in dan vzorčenja ter njuna interakcija z letnimi časi ($p < 0,0001$). Rezultati so pokazali, da je delež viabilnih hondrocitov vsak dan povprečno padel za 4,32 %. Poleg tega je bil delež viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih nezakopanih okončin v povprečju nižji za 8,20 % v primerjavi s sklepnimi hrustanci zakopanih okončin. Na sliki 19 sta prikazani krivulji deleža viabilnih hondrocitov ločeno za sklepne hrustance zakopanih in nezakopanih okončin za vse letne čase skupaj. Večina dni vzorčenj in letnih časov je pokazala tudi statistično značilno interakcijo med tema dvema spremenljivkama, kar pomeni, da se delež viabilnih hondrocitov v posameznih dneh vzorčenja lahko spreminja glede na letni čas. Na sliki 20 so prikazane krivulje deleža viabilnih hondrocitov ločeno glede na letni čas za sklepne hrustance zakopanih in nezakopanih okončin skupaj. Model je pojasnil 87,86 % variacije v deležu viabilnih hondrocitov, ugotovljenim z metodo s CLSM. Preostalih 12,14 %, ki jih model ne pojasni, je posledica drugih spremenljivk, ki niso bile vključene v analizo.



Slika 19: Prikaz povprečnega deleža viabilnih hondrocitov v sklepni hrustanci kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih zadnjih okončin (točka) in standardne napake (ročaja) na dan vzorčenj glede na zakop okončin

Figure 19: Representation of the average percentage of viable chondrocytes in the buried and unburied articular cartilages (dot) and the standard error (bar) per sampling day depending on the burial of the sample



Slika 20: Prikaz povprečnega deleža viabilnih hondrocitov v sklepni hrustanci kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih zadnjih okončin (točka) in standardne napake (ročaja) na dan vzorčenj glede na letni čas

Figure 20: Representation of the average percentage of viable chondrocytes in the buried and unburied articular cartilages (dot) and the standard error (bar) per sampling day depending per season

4.6 REZULTATI ENTOMOLOŠKE PREISKAVE

Žuželke smo na nezakopanih okončinah opazili spomladi in poleti, medtem ko smo na zakopanih okončinah opazili posamezne žuželke le poleti. Pozimi in jeseni žuželk na okončinah nismo opazili. Poleti smo tik ob nezakopanih okončinah ugotovili višje temperature kot na površini groba, medtem ko se spomladi temperature tik ob okončinah niso razlikovale od temperatur na površini groba. Temperature tik ob zakopanih okončinah se poleti in spomladi niso razlikovale od temperatur v globini groba. Število žuželk, temperature tik ob nezakopanih okončinah, na grobu, povprečne dnevne temperature in prisotnost padavin predstavljamo v tabeli 18.

4.6.1 Pomlad

Spomladi do 8. dne vzorčenja po evtanaziji na okončinah nismo opazili žuželk ali njihovih razvojnih oblik. 8. dan vzorčenja smo na sklepnem hrustancu vseh nezakopanih okončin opazili malo ličink muh družine *Calliphora* spp., posamezne ličinke muh družine *Sarcophagidae* spp. in hrošče rodu *Oiceoptoma* spp. ter *Hipster* spp. Žuželke so 8. in 10. dan vzorčenja prekrivale manj kot 25 % okončine. 10. dan vzorčenja smo opazili le še hrošče rodu *Oiceoptoma* spp. Temperatura tik ob nezakopanih okončinah se ni znatno razlikovala od temperature na površini grobov. Na sklepnem hrustancu zakopanih okončin spomladi nismo opazili žuželk ali njihovih ličink.

4.6.2 Poletje

Prve ličinke muh družine *Calliphora* spp. so se poleti na nezakopanih okončinah pojavile 2. dan po evtanaziji prašičev in so prekrivale manj kot 25 % okončine. Temperatura tik ob nezakopanih okončinah je bila za 0,6 °C višja od temperature na površini grobov.

4. dan vzorčenja se je število ličink muh družine *Calliphora* spp. precej povečalo, žuželke so prekrivale med 25 in 50 % okončine, mehka tkiva okončin so bila blago obžrta. Temperatura tik ob nezakopanih okončinah je bila za 1,1 °C višja od temperature na površini grobov.

5. dan vzorčenja je bilo število ličink muh družine *Calliphora* spp. največje, žuželke so prekrivale več kot 50 % okončine, opazili pa smo tudi posamezne hrošče rodu *Creophilus* spp. in *Saprinus* spp., mehka tkiva okončin so bila zmerno obžrta, delno so se kazale kosti, na zemlji

v okolici okončin pa smo opazili belo peno. Temperatura tik ob nezakopanih okončinah je bila za 2,2 °C višja od temperature na površini grobov.

8. dan vzorčenja se je število ličink muh družine *Calliphora* spp. močno zmanjšalo, žuželke so prekrivale manj kot 25 % okončine, opazili smo tudi posamezne hrošče rodu *Creophilus* spp. in *Saprinus* spp. Mehka tkiva okončin so bila pretežno obžrta, kosti so bile skoraj popolnoma gole, hrustanec pa izsušen. Temperatura tik ob nezakopanih okončinah je bila za 0,2 °C višja od temperature na površini grobov.

Na sklepnem hrustancu zakopanih okončin smo 4., 5. in 8. dan vzorčenja opazili le posamezne hrošče rodu *Creophilus* spp., ličink muh na okončinah ni bilo. Temperatura tik ob nezakopanih okončinah je bila enaka temperaturi na površini grobov. Razkroj nezakopanih okončin je prikazan na slikah 21–25.

Tabela 18: Semikvantitativna ocena števila žuželk temperatura izmerjena tik ob nezakopanih zadnjih okončinah, temperatura na površini, povprečna dnevna temperatura in padavine poleti in spomladi.

Table 18: Semiquantitative assessment of the number of arthropods, the temperature measured directly by the hind legs, the surface temperature and the average daily temperature and precipitation in the summer and spring months.

Dan	Letni čas	Število žuželk na/v zakopanih okončinah	Število žuželk na/v nezakopanih okončinah	Temperature tik ob nezakopanih okončinah (°C)	Temperature na površini (°C)	Povprečne dnevne temperature (°C)	Padavine
1.	Pomlad	/	/	11,1	11,1	13,0	Ne
2.	Pomlad	/	/	6,1	6,1	12,1	Ne
3.	Pomlad	/	/	8,3	8,3	12,7	Ne
4.	Pomlad	/	/	9,3	9,3	10,1	Da
5.	Pomlad	/	/	7,3	7,3	11,3	Ne
8.	Pomlad	/	+	11,3	11,2	11,2	Da
10.	Pomlad	/	+	7,1	7	11,6	Ne
1.	Poletje	/	/	26,3	26,3	28,1	Ne
2.	Poletje	/	+	21,5	20,9	25,2	Da
3.	Poletje	/	+	17,9	17,4	18,5	Da
4.	Poletje	P	++	17,8	16,7	22,4	Da
5.	Poletje	P	+++	18,2	16	25,8	Ne
8.	Poletje	P	+	20,7	20,5	23,2	Ne

Legenda: / = ni bilo žuželk, P = posamezne, + = malo (< 25 %), ++ = zmerno (25–50 %), +++ = veliko (> 50 %) število žuželk.



Slika 21: Nezakopane zadnje okončine poleti – 2. dan vzorčenja; malo število ličink (rdeča puščica).

Figure 21: Unburied hind legs in summer – 2nd day of sampling; small number of larvae (red arrow).



Slika 22: Nezakopane zadnje okončine poleti – 3. dan vzorčenja; malo število ličink (rdeča puščica).

Figure 22: Unburied hind legs in summer – 3rd day of sampling; small number of larvae (red arrow).



Slika 23: Nezakopane zadnje okončine poleti – 4. dan vzorčenja; zmerno število ličink (rdeča puščica).

Figure 23: Unburied hind legs in summer – 4th day of sampling; moderate number of larvae (red arrow).



Slika 24: Nezakopane zadnje okončine poleti – 5. dan vzorčenja; veliko število ličink (rdeča puščica), pena (zelena puščica).

Figure 24: Unburied hind legs in summer – 5th day of sampling; large number of larvae (red arrow), foam (green arrow).



Slika 25: Nezakopane zadnje okončine poleti – 8. dan vzorčenja; pretežno obžrta mehka tkiva.

Figure 25: Unburied hind legs in summer – 8th day of sampling; soft tissues are largely eaten away.

5 RAZPRAVA

Čeprav je hrustanec tkivo, ki je dobro zavarovano pred vplivi okolja, in čeprav so hondrociti obstojne celice z dolgo življenjsko dobo, zaščitene z veliko ZCM, so bili ti v zadnjih desetletjih pri določanju PMI v humani forenzični medicini in forenzični veterini deležni malo pozornosti. Večina od teh maloštevilnih in razmeroma skopih raziskav, s katerimi so ugotavljali viabilnost hondrocitov in z nekaterimi celo skušali določiti PMI, je potekala v nadzorovanih *in vitro* pogojih (135, 144, 146, 155, 156, 158). Ti lahko zgolj posnemajo posamezne dejavnike, ki jim je truplo izpostavljeno v naravnem okolju, ne morejo pa upoštevati vseh dejavnikov in njihovega medsebojnega vpliva.

Vrzel v določanju PMI z ugotavljanjem viabilnosti hondrocitov smo skušali vsaj delno zapolniti z našo raziskavo, v kateri smo v naravnem okolju proučili vpliv zunanjih dejavnikov – časa, temperature, vlage in žuželk na viabilnost hondrocitov v kolenskih sklepih zakopanih in nezakopanih prašičjih okončin – in posledično preverjali, ali delež viabilnih hondrocitov v naravnem okolju pada na enak način kot v *in vitro* pogojih. Za ugotavljanje viabilnosti hondrocitov smo izbrali metodo s CLSM, ki je bila najpogosteje uporabljena metoda v sorodnih raziskavah (144, 146, 149, 173), in s tem želeli ugotoviti, ali je metoda sploh primerna za ugotavljanje viabilnosti hondrocitov in posledično določanje PMI pri prašičih. Ker ta metoda zahteva specifično znanje in drago opremo, zaradi česar je manj primerna za rutinsko uporabo, smo za primerjavo v naši raziskavi delež viabilnih hondrocitov ugotavljali tudi z metodo s TM, ki je cenovno ugodnejša, njena izvedba pa je dokaj enostavna. Rezultate obeh metod smo primerjali med seboj. Hrustanec kolenskih sklepov prašičev smo uporabili zaradi podobnosti s hrustancem kolenskih sklepov ljudi, saj prav prašiče pogosto uporabljajo kot analog človeškemu truplu tudi v drugih tafonomskih raziskavah. Anatomska in fiziološka podobnost prašičev z ljudmi namreč zagotavlja dobro podlago za empirične raziskave razgradnje trupla v forenzični entomologiji, tafonomiji in ekologiji (22, 44, 93, 164). Vzorce hrustanca smo odvzeli iz kolenskih sklepov, saj smo zaradi njihove velikosti lahko odvzeli zadostno število vzorcev osteohondralnih cilindrov in s tem omogočili ustrezno statistično vrednotenje rezultatov. Obenem je hrustanec v kolenskih sklepih v primerjavi s hrustanci glave, vratu in trupa manj izpostavljen telesnim bakterijam, ki so najštevilčnejše v prebavilih in dihalih (5, 146).

Našo raziskavo smo zasnovali tako, da smo eno okončino vsakega prašiča pustili na površini zemlje, drugo pa zakopali v zemljo, v t. i. "plitke grobove" globine 50 cm, v katerih so bila zakopana trupla v opisanih forenzičnih primerih pri ljudeh (174, 175). Z zakopom okončin smo želeli izključiti ali vsaj omejiti vpliv temperaturnih nihanj, padavin in žuželk na hrustanec in s tem preveriti učinek zakopa na viabilnost hondrocitov ter na koncu primerjati viabilnost hondrocitov pri zakopanih in nezakopanih okončinah.

Med raziskavo smo vsak dan vzorčenja izmerili temperaturo s termometrom s sondo, ki je omogočal merjenje temperature, kjer so bile okončine, in sicer na površini zemlje in zakopane v grobove. Dodatne vremenske podatke in podatke o povprečni, najnižji in najvišji dnevni temperaturi okolice smo pridobili z glavne meteorološke postaje za Osrednjo Slovenijo, ki je od kraja raziskave sicer oddaljena 3,4 km, a je v okolju s podobno mikroklimo, kot jo ima kraj raziskave.

V podobnih raziskavah so nekateri raziskovalci hondrocite šteli ročno (146), nekateri pa avtomatsko z uporabo različnih računalniških programov (147–149). Da bi ugotovili najboljši način štetja za našo raziskavo, smo v t. i. pilotski raziskavi hondrocite z metodo s CLSM šteli ročno in avtomatsko z uporabo programa ImageJ, ki je bil pogosto uporabljen program za štetje celic tudi v drugih podobnih raziskavah (146). Ker program ni razlikoval delcev propadlih celičnih membran od viabilnih hondrocitov in ni zaznal vseh hondrocitov, zlasti ko so se ti prekrivali, smo v pilotski raziskavi ob primerjavi rezultatov avtomatskega in ročnega štetja ugotovili odstopanja v deležu viabilnih hondrocitov. Zaradi napak, ki so nastale pri avtomatskem štetju, smo se odločili, da štetje s CLSM izvajamo zgolj ročno. Pri metodi s TM smo štetje hondrocitov opravljali ročno z uporabo Bürker-Türkove števne komore in svetlobnega mikroskopa.

Ker literature o viabilnosti hondrocitov v naravnem okolju nismo zasledili, rezultati raziskav, ki so bile pretežno opravljene na kolenskih sklepih ljudi, pa so zelo skopi, smo ugotovitve naše raziskave primerjali z ugotovitvami *in vitro* raziskav na kolenskih sklepih ljudi in na humanih presadkih hrustanca, uporabljenih v tkivnih bankah in za zdravljenje osteoartritisa. Hrustanec so v teh raziskavah hranili v optimalnem okolju, ki je hondrocitom omogočalo najdaljši čas preživetja (135, 146, 155, 156). Rezultate naše raziskave smo primerjali tudi z rezultati forenzičnih *in vitro* raziskav, v katerih so vzorce hrustanca človeških kolenskih sklepov hranili v celičnih medijih, ki naj bi posnemali razmere v človeških truplih, in v različnih, a stabilnih

temperaturnih območjih (134, 149, 159). Te raziskave so ugotovljale vpliv le posameznega zunanjega dejavnika na delež viabilnih hondrocitov, najpogosteje vpliv temperature, časa po odvzemu hrustanca in vpliv celičnih medijev, v katerih so hranili hrustanec. V teh raziskavah pa niso ugotovljali vpliva vlage, aktivnosti žuželk, zakopa, padavin in drugih zunanjih dejavnikov ter medsebojnega vpliva več dejavnikov, ki jim je izpostavljeno truplo v naravnem okolju in lahko na truplo ali drug na drugega delujejo sinergistično ali antagonistično.

V naši raziskavi smo v vseh letnih časih z obema metodama v 10-dnevnom obdobju vzorčenja ugotovili postopen padec deleža viabilnih hondrocitov v hrustancih kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih okončin. Obenem smo ugotovili, da je delež viabilnih hondrocitov vsak dan povprečno padel za 4,32 %. V prvih dneh vzorčenja smo pri zakopanih in nezakopanih okončinah v vseh letnih časih ugotovili majhen, statistično neznačilen padec deleža viabilnih hondrocitov, ki so ga v prvih dneh vzorčenja opazili tudi v *in vitro* raziskavah, namenjenih zdravljenju humanega osteoartritisa, in v forenzičnih *in vitro* raziskavah na vzorcih človeškega hrustanca (134, 135, 144, 146, 155, 159). V nekaterih od teh raziskav so to obdobje poimenovali obdobje platoja. Menimo, da je obdobje platoja posledica majhnih potreb po kisiku in hranilih, ki jih imajo hondrociti, zato v prvih dneh po smrti organizma propadajo zelo počasi. K daljšemu času preživetja hondrocitov pa so najverjetneje pripomogli tudi ZCM in tkiva, ki obdajajo hrustanec (kite in fascije). Kite in fascije so hondrocitom najverjetneje nudile zaščito pred dejavniki okolja, porozna mreža, ki jo oblikuje ZCM, pa je po našem mnenju najverjetneje tudi po smrti organizma omogočila difuzijo zalog hranil in kisika iz sinovijske tekočine, obenem pa mikrobioti onemogočila dostop do hondrocitov in s tem preprečila njihov razkroj. Po porabi zaloge hranil in kisika v sinovijski tekočini so hondrociti najverjetneje prešli v anaeroben metabolizem in izgubili sposobnost vzdrževanja homeostaze, zato so začeli postopoma vedno hitreje propadati. Kumar in sod. (2018) so ugotovili, da ob izgubi sposobnosti vzdrževanja homeostaze nastanejo nepopravljive poškodbe celične membrane, zaradi katerih iztekajo citosolni encimi (38), ki so po našem mnenju poškodovali membrane drugih hondrocitov. Menimo, da so se ob sproščanju citosolnih encimov v naši raziskavi sprostile tudi celične esteraze, ki so pri metodi s CLSM hidrolizirale acetoksimetilni ester barvila Ca-AM. Prost kalcein se je najverjetneje kopičil v ZCM in ga obarval zeleno, vendar pa to obarvanje ni bilo tako močno, da bi povzročilo težave pri štetju hondrocitov. V naši raziskavi je bila intenzivnost zelenega obarvanja ZCM sorazmerna z deležem neviabilnih hondrocitov.

Pri primerjavi deležev viabilnih hondrocitov v zakopanih in nezakopanih okončinah z metodo s CLSM smo ugotovili, da je delež viabilnih hondrocitov v zakopanih okončinah v primerjavi z nezakopanimi okončinami začel padati kasneje, padec pa je bil počasnejši, ob tem pa je imel hrustanec zakopanih okončin povprečno 8,20 % večji delež viabilnih hondrocitov kot hrustanec nezakopanih okončin. Menimo, da je prst, ki je ustvarila bariero med hrustancem zakopanih okončin in zunanjim okoljem, s tem zmanjšala vpliv okoljskih dejavnikov. V nam dostopnih raziskavah so ugotovili, da se vpliv okoljskih dejavnikov, kot so padavine, temperaturna nihanja, mrhovinarji in prisotnost žuželk, z globino zakopa trupla zmanjšuje. Trupla, zakopana v globini, manjši od 30 cm, so v teh raziskavah razpadala hitreje kot trupla, zakopana v globino 50 cm ali globlje, grobovi z globino 50 cm so namreč ohranjali stabilnejše temperature in obenem trupla ščitili pred vplivom dežja, ki s poškodovanjem tkiva pospešuje razkroj tkiv, z ohranjanjem vlažne podlage pa prepreči izsušitev trupla, ki bi sicer upočasnila ali popolnoma ustavila delovanje razkrojevalcev trupla, predvsem ličink muh in bakterij (90–93). Tudi v naši raziskavi smo v grobovih ugotovili stabilnejše temperature kot na površini, zato menimo, da je prst delovala kot izolacijska plast in s tem v grobovih ohranjala stabilnejše temperature kot na površini.

Kot smo pričakovali, smo razlike v temperaturah ugotovili tudi v različnih letnih časih. Jeseni so temperature med vzorčenji v grobovih znašale od 8,2 do 12,5 °C, dnevne temperature pa od 2,3 do 14,1 °C. Povprečna temperatura v grobovih je jeseni znašala 11,3 °C, povprečna dnevna temperatura pa 7,4 °C. Pri primerjavi deležev viabilnih hondrocitov v zakopanih in nezakopanih okončinah z metodo s CLSM jeseni noben dan vzorčenja nismo ugotovili statistično značilnih razlik. Z metodo s CLSM pa smo ugotovili, da je bil padec deleža viabilnih hondrocitov v hrustancih kolenskih sklepov nezakopanih okončin jeseni prvih 5 dni majhen in v primerjavi s 1. dnem vzorčenja statistično neznačilen, ne moremo pa izključiti, da ni bil statistično neznačilen do 7. dneva, saj 6. in 7. dan nismo vzorčili. V hrustancih kolenskih sklepov zakopanih okončin pa smo z metodo s CLSM ugotovili, da je bil padec deleža viabilnih hondrocitov majhen in v primerjavi s 1. dnem vzorčenja statistično neznačilen prve 4 dni. V naslednjih vzorčenjih pa smo v hrustancih kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih okončin zabeležili velik in v primerjavi s 1. dnem vzorčenja statistično značilen padec deleža viabilnih hondrocitov. Jeseni smo ugotovili, da je delež viabilnih hondrocitov v hrustancih kolenskih sklepov zakopanih okončin začel statistično značilno padati prej kot pri nezakopanih okončinah, kar nas je presenetilo, saj smo pričakovali, da bo delež viabilnih hondrocitov začel

statistično značilno padati prej v sklepnih hrustancih nezakopanih kot v sklepnih hrustancih zakopanih okončin. Ker so bile v tem obdobju razlike v temperaturah na površini in v grobovih zelo majhne, menimo, da je bil hrustanec zakopanih in nezakopanih okončin izpostavljen podobnim temperaturam, zaradi česar sklepamo, da je to odstopanje posledica drugih dejavnikov. Hkrati menimo, da je delež viabilnih hondrocitov v hrustancih kolenskih sklepov zakopanih okončin začel jeseni dejansko padati pred 8. dnevom vzorčenja, a ker 6. in 7. dan po evtanaziji nismo vzorčili, tega ne moremo zanesljivo trditi.

Pozimi so temperature med vzorčenjem v grobovih znašale od 2,5 do 5,3 °C, dnevne temperature pa od -5,1 do 3,9 °C. Povprečna temperatura v grobovih je pozimi znašala 3,9 °C, povprečna dnevna temperatura pa je pozimi znašala 0,9 °C. Pri primerjavi deležev viabilnih hondrocitov v zakopanih in nezakopanih okončinah z metodo s CLSM pozimi prve 3 dni nismo ugotovili statistično značilnih razlik. V drugih dneh vzorčenja pa smo ugotovili statistično značilne razlike v deležu viabilnih hondrocitov v hrustancih kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih okončin. Z metodo s CLSM smo ugotovili, da je bil padec deleža viabilnih hondrocitov v hrustancih kolenskih sklepov nezakopanih okončin pozimi prve 4 dni majhen in v primerjavi s 1. dnem vzorčenja statistično neznačilen. V hrustancih kolenskih sklepov zakopanih okončin pa smo z metodo s CLSM ugotovili, da je bil padec deleža viabilnih hondrocitov majhen in v primerjavi s 1. dnem vzorčenja statistično neznačilen prvih 5 dni, ne moremo pa izključiti, da ni bil statistično neznačilen do 7. dneva, saj 6. in 7. dan nismo vzorčili. V naslednjih vzorčenjih pa smo v hrustancih kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih okončin zabeležili velik in v primerjavi s 1. dnem vzorčenja statistično značilen padec deleža viabilnih hondrocitov. V raziskavah, namenjenih zdravljenju osteoartritisa, je začetni postopni padec deleža viabilnih hondrocitov pri podobni temperaturi 4 °C trajal več kot 15 dni, delež viabilnih hondrocitov pa je po enem mesecu znašal tudi do 70 % (135, 146, 155). V forenzičnih *in vitro* raziskavah na vzorcih človeškega hrustanca je začetni postopni padec deleža viabilnih hondrocitov pri temperaturi 4 °C trajal 5 do 10 dni, delež viabilnih hondrocitov pa je v tem obdobju znašal 85 do 96 % (134, 144, 159). Do podobnih ugotovitev so prišli tudi Hicks in sod. (2006), ki so v forenzičnih raziskavah v sklepnem hrustancu trupel ljudi ugotovili, da je bila viabilnost hondrocitov najvišja pri temperaturi 4 °C. V njihovi raziskavi je en mesec po smrti osebe bilo viabilnih še 70 % hondrocitov, dva meseca pa 38 % (146). Tudi v naši raziskavi je bil hrustanec zakopanih okončin pozimi izpostavljen podobni temperaturi, vendar smo v primerjavi s prej omenjenimi raziskavami ugotovili večji padec deleža viabilnih hondrocitov,

delež viabilnih hondrocitov pa je bil nižji in je 5. dan vzorčenja v hrustancih kolenskih sklepov zakopanih okončin znašal 53,41 %. V naši raziskavi so bile temperature v grobovih stabilnejše od temperatur na površini, a so tudi tam vsaj minimalno nihale, teh nihanj pa v *in vitro* raziskavah ni bilo. Menimo, da sta nižji delež viabilnih hondrocitov in razlika v dolžini obdobja platoja med našo raziskavo in prej omenjenimi raziskavami posledica manjših temperaturnih nihanj, ki smo jih ugotovili tako v grobovih kot tudi v okolju. Prav ugotavljanje in dokazovanje razlik v viabilnosti hondrocitov v naravnem okolju, kjer je razpadajoči hrustanec izpostavljen vsem okoljskim dejavnikom, in *in vitro* razmerah pa je bil smisel naše raziskave, s katero smo dokazali, da rezultati *in vitro* raziskav glede viabilnosti hondrocitov in posledičnem določanju PMI niso merodajni za določanje PMI v dejanskih forenzičnih primerih pri živalih in ljudeh, ko leži truplo v naravnem okolju. V naši raziskavi sta na delež viabilnih hondrocitov tudi pozimi pomembno vplivala zakop in z njim povezana temperatura, saj so bile dnevne temperature nestabilne in tudi do 8,1 °C nižje od temperatur v grobovih izmerjenih isti dan, podnevi pa so padle tudi pod ledišče. Menimo, da so temperature pod 0 °C v sklepih nezakopanih okončin pozimi povzročile hitrejši in višji padec deleža viabilnih hondrocitov kot v sklepih zakopanih okončin, saj so ugotovili, da temperature pod lediščem in počasno zamrzovanje povzročajo nastanek ledenih kristalov, ki poškodujejo membrane hondrocitov in njihovih organelov, s tem pa močno pospešijo njihov propad (157, 175, 176).

Spomladi so temperature med vzorčenjem v grobovih znašale od 9,2 do 11,8 °C, dnevne temperature pa od 4,2 do 18,2 °C. Povprečna temperatura v grobovih je spomladi znašala 9,9 °C, povprečna dnevna temperatura pa 11,7 °C. Pri primerjavi deležev viabilnih hondrocitov v zakopanih in nezakopanih okončinah z metodo s CLSM spomladi prve 3 dni in 10. dan nismo ugotovili statistično značilnih razlik. V ostalih dneh vzorčenja pa smo ugotovili statistično značilne razlike v deležu viabilnih hondrocitov v hrustancih kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih okončin. Z metodo s CLSM smo ugotovili, da je bil padec deleža viabilnih hondrocitov v hrustancih kolenskih sklepov nezakopanih okončin spomladi prve 4 dni majhen in v primerjavi s 1. dnem vzorčenja statistično neznačilen. V hrustancih kolenskih sklepov zakopanih okončin pa smo z metodo s CLSM ugotovili, da je bil padec deleža viabilnih hondrocitov majhen in v primerjavi s 1. dnem vzorčenja statistično neznačilen prvih 5 dni, ne moremo pa izključiti, da ni bil statistično neznačilen do 7. dneva, saj 6. in 7. dan nismo vzorčili. V naslednjih vzorčenjih pa smo v hrustancih kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih okončin zabeležili velik in v primerjavi s 1. dnem vzorčenja statistično značilen padec deleža

viabilnih hondrocitov. Menimo, da so nestabilne in višje dnevne temperature v primerjavi s temperaturami v grobovih tudi spomladi povzročile višji padec deleža viabilnih hondrocitov v sklepih nezakopanih okončin, ki je v primerjavi z zakopanimi nastopil prej.

Poleti so temperature med vzorčenjem v grobovih znašale od 17,7 do 19,8 °C, dnevne temperature pa od 15,7 do 34 °C. Povprečna temperatura v grobovih je poleti znašala 18,7 °C, povprečna dnevna temperatura pa 23,9 °C. Med našo raziskavo temperature v grobovih poleti niso presegle 30 °C in so bile tudi do 14,7 °C nižje od dnevnih temperatur izmerjenih isti dan. Pri primerjavi deležev viabilnih hondrocitov v zakopanih in nezakopanih okončinah z metodo s CLSM poleti 1. in 4. dan vzorčenja nismo ugotovili statistično značilnih razlik. V drugih dneh vzorčenja pa smo ugotovili statistično značilne razlike v deležu viabilnih hondrocitov v hrustancih kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih okončin. Z metodo s CLSM smo ugotovili, da je bil padec deleža viabilnih hondrocitov v hrustancih kolenskih sklepov nezakopanih in zakopanih okončin poleti v prvih 3 dneh majhen in v primerjavi s 1. dnem vzorčenja statistično neznačilen. V naslednjih vzorčenjih pa smo v hrustancih kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih okončin zabeležili velik in v primerjavi s 1. dnem vzorčenja statistično značilen padec deleža viabilnih hondrocitov. Menimo, da so nestabilne in višje dnevne temperature v primerjavi s temperaturami v grobovih tudi poleti povzročile višji padec deleža viabilnih hondrocitov v sklepih nezakopanih okončin, ki je v primerjavi z zakopanimi nastopil prej. Ob primerjavi letnih časov pa smo ugotovili, da je bil ne glede na zakop padec deleža viabilnih hondrocitov največji prav poleti. Tedaj je v primerjavi z drugimi letnimi časi prav tako nastopil najhitreje. Menimo, da je slednje posledica visokih dnevnih temperatur, predvsem pa temperatur nad 30 °C. Ugotovili so, da temperature nad 30 °C močno pospešijo propad hondrocitov (159).

V naši raziskavi smo ugotovili znatne razlike v deležu viabilnih hondrocitov med poletnimi in zimskimi meseci, pri čemer je bila viabilnost pozimi višja. Ugotovitve naše raziskave so se razlikovale od ugotovitev raziskave Rogersa in sod. (2011), ki med zimskimi in poletnimi meseci niso ugotovili znatnih razlik v času nastanka sprememb, ki so bile posledica razkroja hrustanca, kot sta sprememba barve in izguba hrustančevine. Okončine prašičev so zakopali v globino, manjšo od 20 cm, ki najverjetneje ni zagotavljala ustrezne zaščite pred vplivi temperature, a je poleti vseeno verjetno nudila delno zaščito pred vplivom žuželk (167). Razlike med ugotovitvami naše in njihove raziskave so najverjetneje posledica razlik v globini grobov, saj smo v naši raziskavi uporabili grobove globine 50 cm, ki so vzdrževali stabilnejšo

temperaturo, kot je bila na površini, preprečili ali vsaj omilili pa so tudi vpliv drugih zunanjih dejavnikov.

Med našo raziskavo so bile temperature v grobovih večino dni v vseh letnih časih podobne temperaturam, pri katerih so tudi v drugih raziskavah z metodo s CLSM ugotovili najdaljšo viabilnost in najvišji delež viabilnih hondrocitov. Najpogosteje omenjena temperatura je 4 °C, za katero Qi J in sod. (2016) menijo, da zmanjša aktivnost encimov, upočasni metabolizem hondrocitov in zmanjša njihove potrebe po hranilih, s tem pa podaljša njihovo preživetje (171). Najvišji delež viabilnih hondrocitov v hrustancu, shranjenem pri 4 °C, so ugotovili tudi v raziskavah na hrustancu človeških presadkov (146, 153, 155, 177, 178). Alibegović in sod. (2014) pa so ugotovili, da je bil delež viabilnih hondrocitov v hrustancu kolenskih sklepov ljudi, hranjenem pri temperaturi 11 in 23 °C, višji kot pri temperaturi 4 °C, medtem ko so najnižji delež viabilnih hondrocitov ugotovili v hrustancu, hranjenem pri temperaturi 35 °C (159).

Na podlagi naših ugotovitev in ugotovitev prej omenjenih raziskav menimo, da je višja viabilnost hondrocitov v hrustancih kolenskih sklepov zakopanih okončin najverjetneje predvsem posledica stabilnejših temperatur, ki poleti niso presegle 30 °C, pozimi pa niso padle pod ledišče. Kljub razlikam med temperaturami v grobovih in na površini ter med letnimi časi pa nismo ugotovili statistično značilnega neposrednega vpliva temperature kot samostojnega dejavnika na viabilnost hondrocitov, saj je bila temperatura le eden izmed številnih med seboj tesno povezanih zunanjih dejavnikov, ki so v predstavljenem regresijskem modelu zajete v spremenljivki letni čas. V predstavljenem regresijskem modelu smo uporabili deleže viabilnih hondrocitov, ki smo jih ugotovili z metodo s CLSM, saj je bila ta v raziskavah, kjer so določali delež viabilnih hondrocitov, najpogosteje uporabljena (144, 146, 149, 173).

Letni čas in globina zakopa sta v naši raziskavi pomembno vplivala tudi na število žuželk in njihovih ličink. Jeseni in pozimi nismo opazili žuželk ali njihovih ličink v zakopanih in nezakopanih okončinah. Žuželk v teh letnih časih najverjetneje nismo opazili, saj so bile temperature na površini in v grobovih nižje od 10 °C. Znano je namreč, da vse vrste muh pri temperaturi, nižji od 10 °C, prenehajo odlagati jajčeca, izjemoma jih odlagajo le, ko je površina trupla toplejša od okolice, npr., če je truplo izpostavljeno soncu (171).

Spomladi smo v nezakopanih okončinah 8. in 10. dan vzorčenja opazili majhno število muh iz družine *Calliphora* spp. in njihovih ličink, v zakopanih okončinah pa žuželk nismo opazili. Menimo, da je majhno število žuželk v nezakopanih okončinah posledica nizkih temperatur, saj so ugotovili, da so muhe iz družine *Calliphora* spp. aktivne pri temperaturah med 12 in 30 °C (179–182). Spomladi smo v naši raziskavi na površini zabeležili povprečno temperaturo 11,7 °C, v grobovih pa 9,9 °C. V zakopanih okončinah pa žuželk najverjetneje nismo opazili zaradi prsti, ki je tem onemogočila dostop do okončin, in zaradi temperature, nižje od 10 °C. Poleti smo v nezakopanih okončinah od 2. do 8. dne opazili muhe iz družine *Calliphora* spp. in njihove ličinke. Njihovo število je postopno naraščalo do 5. dne in nato 8. dan padlo, saj so do tedaj obžrle vsa mehka tkiva nezakopanih okončin. V zakopanih okončinah pa smo v tem letnem času opazili zgolj posamezne hrošče iz rodu *Oiceoptoma* spp., ki v zakopanih okončinah niso povzročili vidnih sprememb na tkivih. Z naraščanjem števila ličink smo poleti po 3. dnevu vzorčenja tik ob nezakopanih okončinah ugotovili tudi do 2,2 °C višjo temperaturo od temperature na površini groba. Ugotovili so, da je temperatura trupla, ki je prekrito z ličinkami, zlasti tistimi v poznejših razvojnih stopnjah, lahko tudi do 7 °C višja od temperature okolice (86, 87). Število žuželk je poleti izrazito vplivalo na hitrost razkroja okončin, saj so ličinke v 8 dneh do kosti obžrle večino mehkih tkiv vseh nezakopanih okončin in s tem neposredno izpostavile hrustanec okoljskim dejavnikom in mikrobioti. Hrustanec se je zato hitreje izsušil, zaradi česar se je delež viabilnih hondrocitov hitro zmanjšal in bil že 5. dan vzorčenja manjši od 1 %. 8. dan vzorčenja smo se odločili, da z vzorčenjem prenehamo, saj je bil delež viabilnih hondrocitov v hrustancih kolenskih sklepov nezakopanih okončin 0 %, v zakopanih pa manjši od 5 %. Mehka tkiva nezakopanih okončin so bila popolnoma obžrta, mehka tkiva zakopanih okončin pa so ostala nedotaknjena. Menimo, da je na število žuželk in ličink poleti vplival tudi dež, saj smo po koncu tridnevnega deževnega obdobja ugotovili, da se je število žuželk znatno povečalo. Čeprav nismo ugotovili statistično značilnega neposrednega vpliva dežja na delež viabilnih hondrocitov, menimo, da je ta poleti nanj vplival posredno, saj je žuželkam najverjetneje otežil dostop do nezakopanih okončin in s tem upočasnil razkroj okončin. Zmanjšano aktivnost žuželk so v deževnem in hladnem obdobju opazili tudi Pittner in sod. (2020) (22).

V naši raziskavi smo delež viabilnih hondrocitov primerjali z metodama s CLSM in TM. Jeseni in pozimi v istih dneh vzorčenja med metodama nismo ugotovili statistično značilnih razlik v deležu viabilnih hondrocitov, razlike pa so bile statistično značilne spomladi in poleti. Na podlagi naših ugotovitev menimo, da sta obe metodi primerni za ugotavljanje deleža viabilnih hondrocitov. Ker je bil padec deleža viabilnih hondrocitov pri obeh metodah postopen in je sledil pričakovanemu vzorcu propada hondrocitov, pa menimo, da sta obe metodi primerni tudi za določanje PMI na podlagi deleža viabilnih hondrocitov. Metodi prav tako izpolnjujeta zahteve, ki so jih postavili Madea in sod. (2005 in 2004), saj omogočata kvantitativen opis in matematično ovrednotenje sprememb, hkrati pa je možno ovrednotiti vpliv okoljskih dejavnikov, kot so temperatura, vlaga, padavine in zakop (3, 4).

Pri primerjavi variabilnosti deleža viabilnih hondrocitov med metodama pa smo ugotovili, da je bila variabilnost deležev viabilnih hondrocitov v hrustancih kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih okončin v vseh letnih časih na posamezni dan vzorčenja višja pri metodi s TM kot pri metodi s CLSM, razen poleti, kjer je bila v hrustancu zakopanih okončin variabilnost višja z uporabo metode s CLSM, v hrustancu nezakopanih okončin pa je bila višja z uporabo metode s TM. Menimo, da je zaradi tega metoda s CLSM primernejša za ugotavljanje deleža viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov prašičev od metode s TM. Ker menimo, da je metoda s CLSM primernejša za ugotavljanje deleža viabilnih hondrocitov, smo za izdelavo regresijskega modela uporabili deleže viabilnih hondrocitov, ki smo jih ugotovili z metodo s CLSM, namesto deležev viabilnih hondrocitov, ki smo jih ugotovili z metodo s TM. Razlike v variabilnosti deleža viabilnih hondrocitov so najverjetneje posledica izvedbe metod. Metoda s TM namreč zahteva mehansko in encimsko obdelavo hrustanca, dolgo, 18-urno inkubacijo in centrifugiranje, med katerima najverjetneje nastajajo nepopravljive poškodbe hondrocitov, zato določeno število hondrocitov najverjetneje propade. Pred rutinsko uporabo metode s TM v forenzični medicini je treba z raziskavami v *in vitro* pogojih in pri stabilnih temperaturnih območjih optimizirati metodo in določiti najmanjše količine hrustanca, ki ga potrebujemo za izvedbo metode, ugotoviti najkrajši možni čas inkubacije in izboljšati medij za inkubacijo hrustanca. Pri metodi s TM je bil čas inkubacije v naši raziskavi dolg, saj smo uporabili ves hrustanec, ki je ostal po metodi s CLSM, zato menimo, da bi bilo bolje, da se v nadaljnjih raziskavah pri metodi s TM uporabi zgornja polovica oz. površinska plast hrustanca, ki v primerjavi s preostalimi plastmi vsebuje večji delež hondrocitov glede na volumen hrustančevine, kot to opisujejo Buckwalter in sod. (2005) ter Mow in sod. (1984) (116, 127).

Menimo, da bo z uporabo površinske plasti hrustanca čas inkubacije krajši, saj bo količina hrustanca za razkroj manjša, kljub temu pa bo v vzorcu zadostna količina hondrocitov, ki jih potrebujemo za metodo s TM. Kljub napisanemu pa je prednost metode s TM predvsem v njeni nizki ceni in enostavni izvedbi, zato je po našem mnenju primernejša za rutinsko uporabo v praksi kot dražja in zahtevnejša metoda s CLMS. Metoda s CLSM je po našem mnenju primernejša kot potrditvena metoda in bi z dodatnimi raziskavami lahko postala standardna metoda za raziskave o deležu viabilnih hondrocitov. Enakega mnenja so tudi Alibegović in sod. (2011), ki so primerjali metodo s CLSM in metodo s CVA (144).

V naši raziskavi smo prvi proučevali padec deleža viabilnih hondrocitov v hrustancu kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih okončin prašičev v naravnem okolju z uporabo metod s CLSM in TM. Ugotovili smo, da je pri prašičih na podlagi padca deleža viabilnih hondrocitov možno določiti PMI v naravnem okolju, zlasti z uporabo metode s CLSM. Menimo, da bi z metodo s CLSM in na podlagi padca deleža viabilnih hondrocitov lahko določili PMI v naravnem okolju tudi pri drugih živalskih vrstah, in ker se tkivo prašičev pogosto uporablja kot analog človeškega tkiva, menimo, da so ugotovitve naše raziskave uporabne tako v forenzični veterini kot tudi v forenzični medicini. Kljub našemu mnenju želimo izpostaviti, da smo med jemanjem vzorcev verjetno v določeni meri negativno vplivali na hrustanec, kar je bilo zaradi samega postopka raziskave neizogibno. Kolenske sklepe smo morali odpreti in jih pustiti odprte do konca vzorčenja, kar je verjetno bolj ali manj vplivalo na razvoj mikrobiote in hitrost izsuševanja površine hrustanca. Da bi negativen vpliv na hondrocite čim bolj zmanjšali, smo sklepe po vsakem vzorčenju pokrili s kožo in jih povili s Coban povojem. Obenem smo zakopane okončine med raziskavo večkrat odkopali in ponovno zakopali, s čimer smo jih izpostavili temperaturi na površini groba, ki ni bila enaka tisti v grobu, a le za kratek čas. Obstaja tudi možnost, da je poletni del tekočin, ki so nastale ob razkroju nezakopanih okončin, pronical tudi do zakopanih in s tem povečal vlažnost v grobovih. Opisane alteracije so v določeni meri verjetno vplivale na rezultate naše raziskave, vendar ne toliko, da ti ne bi bili kredibilni in aplikativno uporabni v forenziki. Na podlagi rezultatov naše raziskave smo ustvarili grafe (Priloga 2, slike 30–33 in Priloga 3, slike 34–37), s katerimi smo lahko v različnih letnih časih določali PMI na podlagi ugotovljenega deleža viabilnih hondrocitov do vključno 10. dne po smrti živali z metodama s CLSM in TM. Z našimi grafi smo lahko razlikovali zgodnji PMI od prvih dni poznega posmrtnega obdobja (4. do 10. dan), nismo pa mogli razlikovati med posameznimi dnevi v obdobju platoja, saj so bile statistične razlike v deležu viabilnih

hondrocitov v primerjavi s 1. dnem vzorčenja premajhne, da bi lahko z grafi zanesljivo določili PMI. Po obdobju platoja pa je bila statistična razlika v deležu viabilnih hondrocitov v primerjavi s 1. dnem vzorčenja večja in statistično značilna, zato smo lahko z grafi določili PMI. Kot številne tafonomske raziskave in raziskave, opravljene v t. i. "body farms", je bila tudi naša raziskava izvedena le na enem področju s specifično klimo, naši grafi so zato uporabni zgolj v podobnem okolju in podobnih temperaturnih območjih, kot so bila v naši raziskavi. Pri njihovi uporabi v drugačnih pogojih je zato potrebna previdnost, oceno PMI pa je treba dopolniti z rezultati drugih metod za določanje PMI, kot sta forenzična entomologija in nastanek posmrtnih sprememb na truplih. K natančnejši oceni PMI bi pripomogel tudi temperaturni nomogram, ki v veterinarski forenziki ni izdelan. Tudi Franceschetti in sod. (2023) menijo, da je v praksi za določanje PMI treba uporabljati več metod hkrati, saj se tedaj izključijo pomanjkljivosti posamezne metode, ocena PMI pa je natančnejša. Kljub natančnejši oceni PMI, ki jo lahko podamo ob hkratni uporabi več metod, pa lahko zgolj približno določimo čas smrti, točen čas namreč lahko določimo le z izpovedjo kredibilnih prič in video dokazov (7). Z novimi raziskavami, v katerih bi v enakem okolju pogosteje vzorčili hondrocite, bi lahko natančneje proučili vpliv okoljskih dejavnikov, predvsem vpliv temperatur in padavin, z raziskavami v drugačnih okoljih, v katerih bi poleg vpliva temperature in padavin preiskovali tudi vpliv različnih vrst prsti in globine zakopa, pa bi lahko izboljšali natančnost naših grafov. Z ugotovitvami, pridobljenimi v tovrstnih raziskavah, bi lahko oblikovali lestvico za ocenjevanje PMI na podlagi deleža viabilnih hondrocitov, ki bi bila uporabna podobno kot Henssgejev temperaturni nomogram (27) in bi upoštevala dejavnike, kot so temperatura, zakop in padavine.

6 ZAKLJUČKI

1. Različne okoljske razmere vplivajo na viabilnost hondrocitov.

Različne okoljske razmere izrazito vplivajo na viabilnost hondrocitov. Največji vpliv imata letni čas in zakop, s katerima so povezane spremembe v temperaturi in relativni vlažnosti ter prisotnost žuželk. Temperature, višje od 30 °C, in velika temperaturna nihanja znatno zmanjšajo delež viabilnih hondrocitov. Zakop okončin na globini 50 cm pa bistveno zmanjša vpliv okoljskih dejavnikov in znatno upočasni razkroj hrustanca in s tem propad hondrocitov.

2. Konfokalna mikroskopija je primerna metoda za ugotavljanje viabilnosti prašičjih hondrocitov pri določanju PMI.

Z metodo s CLSM in z metodo s TM je možno določiti viabilnost prašičjih hondrocitov. V vseh letnih časih, razen poleti, je bila variabilnost deležev viabilnih hondrocitov vsak dan vzorčenja višja pri metodi s TM kot pri metodi s CLSM, kar kaže, da je metoda s CLSM natančnejša za ugotavljanje PMI na podlagi deleža viabilnih hondrocitov.

3. Na podlagi viabilnosti hondrocitov lahko natančno določimo PMI v naravnem okolju.

V začetnih dneh razkroja, v t. i. obdobju platoja, je padec deleža viabilnih hondrocitov premajhen, da bi lahko natančno določili PMI. Dolžina obdobja platoja se med letnimi časi razlikuje, v naši raziskavi je bila najkrajša poleti. Jeseni, pozimi in spomladi smo po treh do štirih dneh, poleti pa po dveh dneh ugotovili hiter padec deleža viabilnih hondrocitov, na podlagi katerega smo lahko določili PMI v naslednjih dneh vzorčenja.

Druge ugotovitve:

Število žuželk in njihovih ličink je odvisno od letnega časa in prisotnosti padavin. V naši raziskavi so poleti in spomladi prevladovali ličinke muh iz družine *Calliphora* spp., jeseni in pozimi pa žuželk in njihovih ličink nismo opazili. Zaradi njihovega metabolizma je bila temperatura tik ob nezakopanih okončinah do 2,2 °C višja kot temperatura okolice. Ličinke so poleti v osmih dneh obžrle vsa mehka tkiva nezakopanih okončin in s tem neposredno izpostavile hrustanec okoljskim dejavnikom in mikrobioti. Hrustanec se je zato hitreje izsušil, zaradi česar se je delež viabilnih hondrocitov hitro zmanjšal.

7 POVZETEK

Določanje časa od pogina do najdbe trupla oz. ugotavljanje starosti trupla spada med največje izzive sodne veterine in medicine. Kljub desetletjem raziskav PMI je zaradi vpliva notranjih in zunanjih dejavnikov ter maloštevilnih raziskav v naravnem okolju natančnost njegovega določanja še vedno nizka, zlasti v poznem posmrtnem obdobju. Pri določanju PMI se lahko vplivom notranjih in zunanjih dejavnikov izognemo z uporabo predelkov, tj. delov telesa, ki so bolj zavarovani pred vplivom okolja in kasneje razpadajo. Mednje spada tudi hrustanec, ki je visoko specializirano, neoživčeno in neožiljeno tkivo, zgrajeno iz ZCM in hondrocitov. V *in vitro* pogojih so ugotovili, da hondrociti ohranjajo svojo viabilnost še dolgo po smrti osebe, zlasti kadar je hrustanec hranjen v optimalnih razmerah. V raziskavah za določanje viabilnosti hondrocitov je bila najpogosteje uporabljena metoda vitalnega barvanja, pri kateri se hondrocite obarva z barviloma Ca-AM in EthD-1, rezultate pa odčita z uporabo CLSM.

V naši raziskavi smo uporabili hrustanec kolenskih sklepov prašičev pasme landras. Po evtanaziji smo zadnje okončine prašičev označili z zaporedno številko in oznako P ali G in jih odstranili v kolčnem sklepu. Kolenske sklepe smo odprli s široko artrotomijo in z OAST odvzeli vzorec hrustanca. Po odvzemu osteohondralnih cilindrov smo sklepe spet pokrili s kožo in jih povili s Coban povojem, okončine z oznako G zakopali v grob z globino 50 cm, okončine z oznako P pa položili na površino nad zakopanimi okončinami. Vzorce hrustanca smo odvzeli na dan evtanazije (1. dan), nato v enodnevnih intervalih naslednje 4 dni ter 8. in 10. dan po evtanaziji. V sredini vsakega vzorca hrustanca smo odrezali tri rezine hrustanca debeline 250 µm in jih inkubirali v raztopini Ca-AM in EthD-1. S CLSM smo posneli konfokalne slike hondrocitov, na katerih smo prešteli število zeleno (viabilni) in rdeče (neviabilni) obarvanih hondrocitov ter izračunali delež viabilnih hondrocitov. Preostanku hrustanca, ki je ostal po rezanju za metodo s CLSM, smo raztopili ZCM, iz suspenzije izolirali hondrocite in jih obarvali s TM. Število viabilnih hondrocitov smo prešteli z uporabo Bürker-Türkove števne komore. Opisan postopek smo ponovili v vseh letnih časih.

Ugotovili smo, da je bil delež viabilnih hondrocitov poleti, spomladi in pozimi statistično značilno višji v hrustancih kolenskih sklepov zakopanih okončin. Menimo, da je to posledica izolacijske sposobnosti prsti, ki je vzdrževala stabilno temperaturo, pozimi pa preprečila, da bi temperatura v grobovih padla pod ledišče, poleti pa da bi preseгла 30 °C. Ugotovili smo, da je viabilnost hondrocitov ne glede na letni čas padala v odvisnosti od temperature in časa po smrti

in da je bil padec deleža viabilnih hondrocitov sprva majhen in je ustrezal obdobju platoja. Temu je sledil velik in v primerjavi s 1. dnem vzorčenja statistično značilen padec deleža viabilnih hondrocitov. Največji padec deleža viabilnih hondrocitov in najkrajše obdobje platoja smo ugotovili poleti, sledila sta jesen in zima, najpočasnejši padec deleža viabilnih hondrocitov pa smo ugotovili spomladi. Obdobja platoja so bila v naši raziskavi v primerjavi z rezultati podobnih *in vitro* raziskav krajša, delež viabilnih hondrocitov pa manjši. Menimo, da je razlika posledica številnih in spreminjajočih se dejavnikov okolja, predvsem temperaturnih nihanj, poleti pa tudi vpliva žuželk. Žuželke smo v nezakopanih okončinah opazili le spomladi in poleti, pri čemer so bile številčnejše poleti. V zakopanih okončinah smo zgolj poleti opazili posamezne žuželke. Število žuželk je poleti izrazito vplivalo na hitrost razkroja okončin, saj so ličinke v 8 dneh do kosti obžrle večino mehkih tkiv vseh nezakopanih okončin in s tem neposredno izpostavile hrustanec okoljskim dejavnikom in mikrobioti. Spomladi pa žuželke niso povzročile znatnih poškodb na mehkih tkivih.

Ob primerjavi deleža viabilnih hondrocitov med metodama s CLSM in TM nismo ugotovili statistično značilnih razlik pozimi in jeseni, razlike pa so bile v posameznih dneh spomladi in poleti, zato menimo, da sta obe metodi primerni za določanje PMI. Pri primerjavi variabilnosti deleža viabilnih hondrocitov med metodama pa smo ugotovili, da je bila variabilnost deležev viabilnih hondrocitov v hrustancih kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih okončin v vseh letnih časih na posamezni dan vzorčenja višja pri metodi s TM, razen poleti, kjer je bila v sklepnih hrustancih zakopanih okončin variabilnost višja z uporabo metode s CLSM. Na podlagi teh ugotovitev menimo, da je metoda s CLSM primernejša za ugotavljanje deleža viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov prašičev od metode s TM.

Na podlagi rezultatov naše raziskave smo ustvarili grafe, s katerimi smo lahko v različnih letnih časih določali PMI na podlagi ugotovljenega deleža viabilnih hondrocitov do vključno 10. dne po smrti živali z metodama s CLSM in TM. Z našimi grafi smo lahko razlikovali le zgodnje posmrtno obdobje od prvih dni (4. do 10. dan) poznega posmrtnega obdobja, nismo pa mogli razlikovati med posameznimi dnevi v obdobju platoja, saj so bile statistične razlike v deležu viabilnih hondrocitov v primerjavi s 1. dnem vzorčenja premajhne, da bi lahko z grafi zanesljivo določili PMI.

Menimo, da je z uporabo metode s CLSM možno določiti PMI na podlagi viabilnosti hondrocitov v naravnem okolju v različnih letnih časih. Zaradi številnih okoljskih dejavnikov,

ki lahko znatno vplivajo na viabilnost hondrocitov, menimo, da so potrebne nadaljnje raziskave, v katerih bi v istem ali v podobnem okolju pogosteje vzorčili hrustanec, kot smo ga v naši raziskavi.

8 SUMMARY

Determining the time between death and the discovery of the corpse or determining the age of a corpse is one of the greatest challenges in forensic veterinary medicine and human forensic medicine. Despite decades of PMI research, the accuracy of the determination is still low due to the influence of internal and external factors and the small number of studies in the natural environment, especially in the late postmortem period. When determining the PMI, the influence of internal and external factors can be avoided by using compartments, i.e., parts of the body that are better protected from environmental influences and decompose later. This includes cartilage, a highly specialised, nonrevitalised and nonvascularised tissue composed of ZCM and chondrocytes. Chondrocytes have been found to remain viable under *in vitro* conditions long after the death of an individual, especially when cartilage is stored under optimal conditions. In studies attempting to determine the viability of chondrocytes, the vital staining method has been the most commonly used, in which chondrocytes are stained with the dyes Ca-AM and EthD-1 and the results are read via CLSM.

In our study, we used cartilage from the knee joints of landrace pigs. After euthanasia, the hind limbs of the pigs were labelled with a serial number, marked P or G and removed at the hip joint. The knee joints were opened with wide arthrotomy and a cartilage sample was taken via the OAST. After the removal of the osteochondral cylinders, the joints were closed, covered with skin and wrapped with a Coban bandage. The limbs labelled G were buried in a 50 cm deep grave, and the limbs labelled P were placed on the surface above the buried limbs. Cartilage samples were collected on the day of euthanasia (Day 1), then at one-day intervals over the next 4 days and on Days 8 and 10 after euthanasia. Three 250 µm thick cartilage slices were cut in the centre of each cartilage sample and incubated in Ca-AM and EthD-1 solution. Confocal images of the chondrocytes were taken with CLSM, on which we counted the number of green (viable) and red (nonviable) stained chondrocytes and calculated the proportion of viable chondrocytes. After CLSM sectioning, the ZCM was dissolved in the remaining cartilage, and the chondrocytes were isolated from the suspension and stained with TM. The number of viable chondrocytes was counted using a Bürker-Türk counting chamber. We repeated the described procedure through all four seasons.

We found that the proportion of viable chondrocytes in the knee joints of buried limbs was significantly greater in the summer, spring and winter. We hypothesise that this is due to the insulating effect of the soil, which maintained a stable temperature and prevented the temperature in the graves from dropping below freezing in winter and exceeding 30 °C in summer.

We found that chondrocyte viability decreased as a function of temperature and time after death, regardless of season, and that the decrease in the proportion of viable chondrocytes was initially small and corresponded to the plateau period. This was followed by a larger and statistically significant decrease in the proportion of viable chondrocytes compared with the first day of sampling. The largest decrease in the proportion of viable chondrocytes and the shortest plateau period were observed in summer, followed by fall and winter, and the slowest decrease in the proportion of viable chondrocytes was observed in spring. Compared with the results of similar *in vitro* studies, the plateau phases in our study were shorter, and the proportion of viable chondrocytes was lower. We hypothesise that this difference is due to numerous and changing environmental factors, especially temperature fluctuations and to the influence of insects in summer. Insects were observed only on unburied limbs in spring and summer and were more numerous in summer. Individual insects were observed only on buried limbs in summer. The number of insects in summer had a significant effect on the rate of limb decomposition, as the larvae ate away most of the soft tissue of all unburied limbs down to the bone within 8 days, directly exposing the cartilage to environmental factors and the microbiota. In spring, however, the insects caused no significant damage to the soft tissue.

When we compared the proportion of viable chondrocytes between the CLSM and TM methods, we found no statistically significant differences in winter and fall, but in spring and summer, there were differences on individual days; thus, we assume that both methods are suitable for determining the PMI. When comparing the variability in the proportion of viable chondrocytes between the two methods, we found that the variability in the proportion of viable chondrocytes in the cartilage of the knee joints of buried and unburied limbs was greater with the TM method on a single day in all seasons, except in summer, when it was greater in the articular cartilage of buried limbs with the CLSM method. These results suggest, that the CLSM method is more suitable than the TM method for determining the proportion of viable chondrocytes in the articular cartilage of the knee joints of pigs.

Based on our research results, we prepared graphs to determine the PMI in different seasons on the basis of determined proportion of viable chondrocytes up to and including the tenth day after the death of the animals via the CLSM and TM methods. We were able to determine the proportion of viable chondrocytes up to and including the tenth day after the death of the animals via the CLSM and TM methods. With our graphs, we could distinguish the early postmortem period from the first days (4–10 days) of the late postmortem period, but not individual days during the plateau period, as there were no significant differences in the proportion of viable chondrocytes compared with Day 1 of the sample collection to accurately determine PMI using our graphs.

We believe that with the CLSM method, it is possible to determine the PMI based on the viability of chondrocytes in the natural environment in different seasons. Owing to the many environmental factors that can significantly affect chondrocyte viability, further studies in which cartilage is sampled more frequently in the same or similar environments as those in our study are needed.

9 ZAHVALA

Rad bi se zahvalil mentorju **dr. Mitji Gombaču**, ki me je vzel pod svoje peruti, mi pomagal pri oblikovanju raziskave, opravljanju raztelesb in pisanju disertacije, ki bi bila brez njegove pomoči nočna mora vsakega lektorja. Hvala za vse motivacijske pogovore, tako prijetne kot tudi manj prijetne, ter za vse dodatno znanje s področja patologije in forenzične veterine, ki sem ga pridobil v teh letih. Hvala tudi somentorju **dr. Arminu Alibegoviću** za pomoč pri oblikovanju laboratorijskega dela raziskave in vzpostavitvi metod.

Rad bi se zahvalil tudi:

- **dr. Robertu Frangežu** za pomoč pri vzpostavitvi metode s CLSM in za pomoč pri pisanju in objavi članka,
- **dr. Heleni Motaln** z Inštituta Jožef Stefan za pomoč pri izvajanju metode CLSM,
- **Juriju Omahnu** in **Benjaminu Cerku** za tehnično pomoč pri izvedbi poizkusa,
- **Katarini Pavlin** in **Domnu Maju Frasu**, ki sta prevzela moje zadolžitve, ko sem to najbolj potreboval,
- **dr. Kristini Tekavec**, **dr. Sabini Šturm** in **Tamari Dolenšek, dipl. ACVP**, za pogovore in nasvete med opravljanjem raziskav ter za znanje, ki so mi ga v teh letih predale,
- **Biljani Grubišič** za pomoč pri administrativnih zadevah na področju doktorata, za odgovore na moja tisočera vprašanja in za njeno potrpljenje,
- komisiji za vse pripombe in nasvete pri oblikovanju raziskave in pri pisanju disertacije in sodelavcem na IPDRČ za vse lepe trenutke in neprestano pomoč,
- **Petru Njegovcu, dr. vet. med.**, in **farmi Ihan, d.o.o.**, za priskrbo kadavrov prašičev,
- **Marjani Jus** za lektoriranje slovenskega besedila.

Rad bi se zahvalil tudi svoji družini:

- **očetu Miranu** in **babici Ani**, ki sta me spodbujala že pri mojih prvih korakih v veterinarski karieri in nadaljevala med doktorskim študijem, me prenašala in vedrila ter ob koncih tedna in praznikih poskrbela, da od mene nista ostali le kost in koža,
- **Ani Hedl** za njeno potrpežljivost, spodbudo, podporo, kosila in večerje med raziskavo in pisanjem disertacije.

Posebno zahvalo namenjam **dr. Tanji Knific** za vse kave, kosila in nasvete ter statistične analize in pomoč pri njihovi interpretaciji. Brez nje bi ta doktorat ostal zgolj idejna zasnova.

10 LITERATURA

1. Brooks JW. Postmortem changes in animal carcasses and estimation of the postmortem interval. *Vet Pathol* 2016; 53(5): 929–40. doi: 10.1177/0300985816629720
2. Henssge C, Madea B. Estimation of the time since death. *Forensic Sci Int* 2007; 165(2/3): 182–4. doi: 10.1016/j.forsciint.2006.05.017
3. Madea B. Is there recent progress in the estimation of the postmortem interval by means of thanatochemistry? *Forensic Sci Int* 2005; 151(2/3): 139–49
doi: 10.1016/j.forsciint.2005.01.013
4. Henßge C, Madea B. Estimation of the time since death in the early post-mortem period. *Forensic Sci Int* 2004; 144(2/3): 167–75. doi: 10.1016/j.forsciint.2004.04.051
5. Alibegović A, Balažić J, Petrovič D, et al. The optimal combination of cartilage source and apparatus for long-term in vitro chondrocyte viability analysis. *J Forensic Sci* 2012; 57(6): 1601–7 doi: 10.1111/j.1556-4029.2012.02175.x
6. Knight B. The evolution of methods for estimating the time of death from body temperature. *Forensic Sci Int* 1988; 36(1/2): 47–55.
doi: 10.1016/0379-0738(88)90214-9
7. Franceschetti L, et al. Estimation of late postmortem interval: where do we stand? A literature review. *Biology (Basel)* 2023; 12(6): 783. doi: 10.3390/biology12060783
8. Alibegović A. Cartilage: a new parameter for the determination of the postmortem interval? *J Forensic Leg Med* 2014; 27: 39–45. doi: 10.1016/j.jflm.2014.08.005
9. Erlandsson M, Munro R. Estimation of the post-mortem interval in beagle dogs. *Sci Justice* 2007; 47(4): 150–4. doi: 10.1016/j.scijus.2007.09.005
10. Munro R, Munro HMC. Some challenges in forensic veterinary pathology: a review. *J Comp Pathol* 2013; 149(1): 57–73. doi: 10.1016/j.jcpa.2012.10.001
11. Michael AC, Worrell MB, Pless JE. Postmortem changes in soft tissues. In: Gill-King H, eds. *Forensic taphonomy the postmortem fate of human remains*. 1st ed. Boca Raton: CRC Press, 1997: 151–64
12. Van Den Oever R. A review of the Literature as to the present possibilities and limitations in estimating the time of death. *Med Sci Law* 1976; 16(4): 269–76.
doi: 10.1177/002580247601600411
13. Jaafar S, Nokes LD. Examination of the eye as a means to determine the early postmortem period: a review of the literature. *Forensic Sci Int* 1994; 64(2/3): 185–9.

- doi: 10.1016/0379-0738(94)90230-5
14. Wróblewski B, Ellis M. Eye changes after death. *Br J Surg* 1970; 57(1): 69–71.
doi: 10.1002/bjs.1800570117
 15. Bardale RV, Tumram NK, Dixit PG, Deshmukh AY. Evaluation of histologic changes of the skin in postmortem period. *Am J Forensic Med Pathol* 2012; 33(4): 357–61.
doi: 10.1097/PAF.0b013e31822c8f21
 16. Madea B. Methods for determining time of death.
Forensic Sci Med Pathol 2016; 12(4): 451–85. doi: 10.1007/s12024-016-9776-y
 17. Babapulle CJ, Jayasundera NP. Cellular changes and time since death.
Med Sci Law 1993; 33(3): 213–22. doi: 10.1177/002580249303300306
 18. Wyler D, Marty W, Bär W. Correlation between the post-mortem cell content of cerebrospinal fluid and time of death. *Int J Legal Med* 1994; 106(4): 194–9.
doi: 10.1007/BF01371336
 19. Madea B. Importance of supravitality in forensic medicine.
Forensic Sci Int 1994; 69(3): 221–41. doi: 10.1016/0379-0738(94)90386-7
 20. Saukko P, Knight B. *Knight's forensic pathology*. 4th ed. Boca Raton: CRC press, 2015
 21. Meurs J, Krap T, Duijst W. Evaluation of postmortem biochemical markers: completeness of data and assessment of implication in the field.
Sci Justice 2019; 59(2): 177–80. doi: 10.1016/j.scijus.2018.09.002
 22. Pittner S, Bugelli V, Weitgasser K, et al. A field study to evaluate PMI estimation methods for advanced decomposition stages. *Int J Legal Med* 2020; 134(4): 1361–73.
doi: 10.1007/s00414-020-02278-0
 23. Nokes LD, Flint T, Williams JH, Knight BH. The application of eight reported temperature-based algorithms to calculate the postmortem interval.
Forensic Sci Int 1992; 54(2): 109–25. doi: 10.1016/0379-0738(92)90155-P
 24. Christensen AM, Passalacqua N V, Bartelink EJ. Forensic taphonomy. In: Christensen AM, eds. *Forensic anthropology current methods and practice*. 2nd ed. Cambridge: Academic Press, 2019: 145–81
 25. Abdulazeez IO, Noordin MM. Algor mortis pattern in dogs, a guide to estimation of time of death. *Pertanika J Trop Agric Sci* 2010; 33(1): 105–11
 26. Laplace K, Baccino E, Peyron PA. Estimation of the time since death based on body

- cooling: a comparative study of four temperature-based methods.
Int J Legal Med 2021; 135(6): 2479–87. doi: 10.1007/s00414-021-02635-7
27. Henssge C. Death time estimation in case work. I. The rectal temperature time of death nomogram. *Forensic Sci Int* 1988; 38(3): 209–36 doi: 10.1016/0379-0738(88)90168-5
28. Henssge C, Beckmann ER, Wischhusen F, Brinkmann B. Determination of the time of death by measurement of central brain temperature. *Z Rechtsmed* 1984; 93(1): 1–22. doi: 10.1007/BF00202979
29. Dent BB, Forbes SL, Stuart BH. Review of human decomposition processes in soil. *Environ Geol* 2003; 45: 576–85. doi: 10.1007/s00254-003-0913-z
30. Shrestha R, Kanchan T, Krishan K. Methods of estimation of time since death. Treasure Island: StatPearls. 2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549867/> (20. 12. 2023)
31. Hall M, Whitaker A, Richards C. Forensic entomology. In: Márquez-Grant N, eds. *Forensic Ecology Handbook: from crime scene to court*. Hoboken: Wiley, 2012; 111–40
32. Matuszewski S, Szafałowicz M. Temperature-dependent appearance of forensically useful beetles on carcasses. *Forensic Sci Int* 2013; 229(1/3): 92–9. doi: 10.1016/j.forsciint.2013.03.034
33. Villet M, Richards C, Midgley J. Contemporary precision, bias and accuracy of minimum post-mortem intervals estimated using development of carrion-feeding insects. In: Amendt J, eds. *Current concepts in forensic entomology*. 1st ed. Dordrecht : Springer, 2010: 109–37
34. Amendt J, Campobasso CP, Gaudry E, Reiter C, LeBlanc HN, Hall JRM. Best practice in forensic entomology – standards and guidelines. *Int J Legal Med* 2007; 121(2): 90–104. doi: 10.1007/s00414-006-0086-x
35. Wescott DJ. Recent advances in forensic anthropology: decomposition research. *Forensic Sci Res* 2018; 3(4): 327–42. doi: 10.1080/20961790.2018.1488571
36. Merck MD, Miller DM. Postmortem changes and the postmortem interval. In: Merck M, eds. *Veterinary forensics: animal cruelty investigations*. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 2013: 255–71
37. Myburgh J, L'Abbé EN, Steyn M, Becker PJ. Estimating the postmortem interval (PMI) using accumulated degree-days (ADD) in a temperate region of South Africa.

- Forensic Sci Int 2013; 229(1/3): 165.e1-6. doi: 10.1016/j.forsciint.2013.03.037
38. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Cell injury, cell death, and adaptations. In: Kumar V, eds. Robbins Basic pathology. 5th ed. New York: Elsevier, 2018: 31–56
39. Megyesi MS, Nawrocki SP, Haskell NH. Using accumulated degree-days to estimate the postmortem interval from decomposed human remains. J Forensic Sci 2005; 50(3): 618-26. doi: 10.1520/JFS2004017
40. Michaud J-P, Moreau G. A statistical approach based on accumulated degree-days to predict decomposition-related processes in forensic studies. J Forensic Sci 2011; 56(1): 229–32. doi: 10.1111/j.1556-4029.2010.01559.x
41. Moffatt C, Simmons T, Lynch-Aird J. An improved equation for TBS and ADD: establishing a reliable postmortem interval framework for casework and experimental studies. J Forensic Sci 2016; 61(suppl. 1): S201-7. doi: 10.1111/1556-4029.12931
42. Maile AE, Inoue CG, Barksdale LE, Carter DO. Toward a universal equation to estimate postmortem interval. Forensic Sci Int 2017; 272: 150–3. doi: 10.1016/j.forsciint.2017.01.013
43. Pittner S, Bugelli V, Benbow ME, et al. The applicability of forensic time since death estimation methods for buried bodies in advanced decomposition stages. PLoS One 2020; 15(12): e0243395. doi: 10.1371/journal.pone.0243395
44. Matuszewski S, Hall MJR, Moreau G, Schoenly KG, Tarone AM, Villet MH. Pigs vs people: the use of pigs as analogues for humans in forensic entomology and taphonomy research. Int J Legal Med 2020; 134(2): 793–810. doi: 10.1007/s00414-019-02074-5
45. Galloway A, Birkby WH, Jones AM, Henry TE, Parks BO. Decay rates of human remains in an arid environment. J Forensic Sci 1989; 34(3): 607–16. doi: 10.1520/JFS12680J
46. Sorg MH. Developing regional taphonomic standards. Washington: U.S. Department of Justice, 2013. <https://www.ojp.gov/ncjrs/virtual-library/abstracts/developing-regional-taphonomic-standards> (2. 10. 2021)
47. Haglund W, Sorg M. Chemical and ultrastructural aspects of decomposition. In: Haglund WD, eds. Forensic taphonomy: the postmortem fate of human remains. 1st ed. Boca Raton: CRC Press, 1997: 93–108
48. Vass AA. The elusive universal post-mortem interval formula. Forensic Sci Int 2011; 204(1/3): 34–40. doi: 10.1016/j.forsciint.2010.04.052

49. Carter DO, Yellowlees D, Tibbett M. Temperature affects microbial decomposition of cadavers (*Rattus rattus*) in contrasting soils. *Appl Soil Ecol* 2008; 40(1): 129–37. doi: 10.1016/j.apsoil.2008.03.010
50. Zwietering MH, de Wit JC, Cuppers HG, van 't Riet K. Modeling of bacterial growth with shifts in temperature. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60(1): 204–13. doi: 10.1128/aem.60.1.204-213.1994
51. Mundim KC, Baraldi S, Machado HG, Vieira FMC. Temperature coefficient (Q10) and its applications in biological systems: beyond the Arrhenius theory. *Ecol Modell* 2020; 431: 109127. doi: 10.1016/j.ecolmodel.2020.109127
52. Zogg GP, Zak DR, Ringelberg DB, White DC, MacDonald NW, Pregitzer KS. Compositional and functional shifts in microbial communities due to soil warming. *Soil Sci Soc Am J* 1997; 61(2): 475–81. doi: 10.2136/sssaj1997.03615995006100020015x
53. Carter DO, Tibbett M. Taphonomic mycota: fungi with forensic potential. *J Forensic Sci* 2003; 48(1): 1–4. doi: 10.1520/JFS2002169
54. Tomberlin JK, Mohr R, Benbow ME, Tarone AM, VanLaerhoven S. A roadmap for bridging basic and applied research in forensic entomology. *Annu Rev Entomol* 2011; 56: 401–21. doi: 10.1146/annurev-ento-051710-103143
55. Tomberlin JK, Crippen TL, Tarone AM, et al. A review of bacterial interactions with blow flies (Diptera: Calliphoridae) of medical, veterinary, and forensic importance. *Ann Entomol Soc Am* 2017; 110(1): 19–36. doi: 10.1093/aesa/saw086
56. Shinomiya T, Shinomiya K, Orimoto C, Minami T, Tohno Y, Yamada M. In- and out-flows of elements in bones embedded in reference soils. *Forensic Sci Int* 1998; 98(1/2): 109–18. doi: 10.1016/s0379-0738(98)00140-6
57. Turner B, Wiltshire P. Experimental validation of forensic evidence: a study of the decomposition of buried pigs in a heavy clay soil. *Forensic Sci Int* 1999; 101(2): 113–22. doi: 10.1016/S0379-0738(99)00018-3
58. Rodriguez WC, Bass WM. Decomposition of buried bodies and methods that may aid in their location. *J Forensic Sci* 1985; 30(3): 836–52
59. Schultz JJ. Variables affecting the gross decomposition of buried bodies in florida: controlled graves using pig (*sus scrofa*) cadavers as a proxy for human bodies. *Florida Sci* 2007; 70(2): 157–65

60. Carter DO, Yellowlees D, Tibbett M. Moisture can be the dominant environmental parameter governing cadaver decomposition in soil. *Forensic Sci Int* 2010; 200(1/3): 60–6. doi: 10.1016/j.forsciint.2010.03.031
61. Rodriguez WC. Decomposition of buried and submerged bodies. In: Haglund WD, eds. *Forensic taphonomy: the postmortem fate of human remains*. 1st ed. Boca Raton: CRC Press, 1997: 469–82
62. Munro R, Munro HMC. Estimation of time since death. In: Munro R, eds. *Animal abuse and unlawful killing*. 1st ed. Edinburgh: W.B. Saunders, 2008: 88–93
63. Ceciliason A-S, Käll B, Sandler H. Mummification in a forensic context: an observational study of taphonomic changes and the post-mortem interval in an indoor setting. *Int J Legal Med* 2023; 137(4): 1077–88. doi: 10.1007/s00414-023-02986-3
64. Hamilton SJ, Green MA. Gross post-mortem changes in the human body. In: Schotsmans EMJ, eds. *Taphonomy of human remains: forensic analysis of the dead and the depositional environment*. 1st ed. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2017: 9–25
65. Higgs N, Pokines JT. Marine environmental alterations to bone. In: Pokines JT, eds. *Manual of forensic taphonomy*. 1st ed. Boca Raton: CRC Press, 2014: 143–80
65. Forbes SL, Dent BB, Stuart BH. The effect of soil type on adipocere formation. *Forensic Sci Int* 2005; 154(1): 35–43. doi: 10.1016/j.forsciint.2004.09.108
66. Caruso JL. Decomposition changes in bodies recovered from water. *Acad forensic Pathol* 2016; 6(1): 19–27. doi: 10.23907/2016.003
67. Vass AA, Bass WM, Wolt JD, Foss JE, Ammons JT. Time since death determinations of human cadavers using soil solution. *J Forensic Sci* 1992; 37(5): 1236–53. doi: 10.1520/JFS13311J
68. Forbes SL, Stuart BH, Dent BB. The effect of the burial environment on adipocere formation. *Forensic Sci Int* 2005; 154(1): 24–34. doi: 10.1016/j.forsciint.2004.09.107
69. Hopkins DW, Wiltshire PEJ, Turner BD. Microbial characteristics of soils from graves: an investigation at the interface of soil microbiology and forensic science. *Appl Soil Ecol* 2000; 14(3): 283–8. doi: 10.1016/S0929-1393(00)00063-9
70. Carter DO, Yellowlees D, Tibbett M. Cadaver decomposition in terrestrial ecosystems. *Naturwissenschaften* 2007; 94(1): 12–24. doi: 10.1007/s00114-006-0159-1
71. Rousk J, Brookes PC, Bååth E. Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization.

- Appl Environ Microbiol 2009; 75(6): 1589–96. doi: 10.1128/AEM.02775-08
72. Stuart BH, Ueland M. Decomposition in aquatic environments. In: Schotsmans EMJ, eds. *Taphonomy of human remains: forensic analysis of the dead and the depositional environment*. 1st ed. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2017: 235–50
73. Janaway RC, Percival SL, Wilson A. Decomposition of human remains. In: Percival SL, ed. *Microbiology and aging: clinical manifestations*. New Jersey: Humana press, 2009: 313–34
74. Cobough KL, Schaeffer SM, DeBruyn JM. Functional and structural succession of soil microbial communities below decomposing human cadavers. *PLoS One* 2015; 10(6): e0130201. doi: 10.1371/journal.pone.0130201
75. Crippen T, Singh B. Forensic and decomposition microbiology. In: Tomberlin J, eds. *Forensic entomology: international dimensions and frontiers*. 1st ed. Boca Raton: CRC Press, 2015: 249–62
76. Payne JA. A summer carrion study of the baby pig *Sus Scrofa* Linnaeus. *Ecology* 1965; 46(5): 592–602. doi: 10.2307/1934999
77. Ren L, Shang Y, Chen W, et al. A brief review of forensically important flesh flies (Diptera: Sarcophagidae). *Forensic Sci Res* 2018; 3(1): 16–26. doi: 10.1080/20961790.2018.1432099
78. Catts EP, Goff ML. Forensic entomology in criminal investigations. *Annu Rev Entomol* 1992; 37: 253–72. doi: 10.1146/annurev.en.37.010192.001345
79. Hall M, Whitaker A, Richards C. Forensic entomology. In: Márquez-Grant N, eds. *Forensic ecology handbook: from crime scene to court*. 1st ed. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2012: 111–40
80. Rodriguez WC, Bass WM. Insect activity and its relationship to decay rates of human cadavers in East Tennessee. *J Forensic Sci* 1983; 28(2): 423–32. doi: 10.1520/JFS11524J
81. Reed HB. A study of dog carcass communities in Tennessee, with special reference to the insects. *Am Midl Nat* 1958; 59(1): 213–45. doi: 10.2307/2422385
82. Campobasso CP, Di Vella G, Introna F. Factors affecting decomposition and Diptera colonization. *Forensic Sci Int* 2001; 120(1/2): 18–27. doi: 10.1016/s0379-0738(01)00411-x
84. P Nuorteva. Studies on the significance of flies in the transmission of polyomyelitis. III.

- The composition of the blowfly fauna and the activity of the flies during the epidemic season of polyomyelitis in South Finland. *Ann Entomol Fenn* 1959;(25):121–5
85. Introna F, Campobasso C. Forensic dipterology. In: Papp L, eds. *Manual of Palaearctic Diptera*. 1st ed. Budapest: Science Herald, 2000: 793–846
86. Catts EP. Problem in estimating the postmortem interval in death investigations. *J Agric Entomol* 1992; 9(4): 245–55
87. Goodbrod JR, Goff ML. Effects of larval population density on rates of development and interactions between two species of chrysomya (Diptera: Calliphoridae) in laboratory culture. *J Med Entomol* 1990; 27(3): 338–43. doi: 10.1093/jmedent/27.3.338
88. Early M, Goff ML. Arthropod succession patterns in exposed carrion on the Island of O’ahu, Hawaiian Islands, USA. *J Med Entomol* 1986; 23(5): 520–31. doi: 10.1093/jmedent/23.5.520
89. Tullis K, Goff ML. Arthropod succession in exposed carrion in a tropical rainforest on O’ahu Island, Hawai’i. *J Med Entomol* 1987; 24(3): 332–9. doi: 10.1093/jmedent/24.3.332
90. Deonier CC. Carcass temperatures and their relation to winter blowfly populations and activity in the Southwest. *J Econ Entomol* 1940; 33(1): 166–70. doi: 10.1093/jee/33.1.166
91. Morton RJ, Lord WD. Taphonomy of child-sized remains: a study of scattering and scavenging in Virginia, USA. *J Forensic Sci* 2006; 51(3): 475–9. doi: 10.1111/j.1556-4029.2006.00134.x
92. Willey P, Snyder LM. Canid modification of human remains: implications for time-since-death estimations. *J Forensic Sci* 1989; 34(4): 894–901. doi: 10.1520/JFS12718J
93. Steadman DW, Dautartas A, Kenyhercz MW, Jantz LM, Mundorff A, Vidoli GM. Differential scavenging among pig, rabbit, and human subjects. *J Forensic Sci* 2018; 63(6): 1684–91. doi: 10.1111/1556-4029.13786
94. Ubelaker DH, DeGaglia CM. The impact of scavenging: perspective from casework in forensic anthropology. *Forensic Sci Res* 2020; 5(1): 32–7. doi: 10.1080/20961790.2019.1704473
95. Haglund WD. Contribution of rodents to postmortem artifacts of bone and soft tissue. *J Forensic Sci* 1992; 37(6): 1459–65. doi: 10.1520/JFS13338J
96. Schotsmans EMJ, Denton J, Dekeirsschieter J, et al. Effects of hydrated lime and

- quicklime on the decay of buried human remains using pig cadavers as human body analogues. *Forensic Sci Int* 2012; 217(1/3): 50–9. doi: 10.1016/j.forsciint.2011.09.025
97. Wilson AS, Janaway RC, Holland AD, et al. Modelling the buried human body environment in upland climes using three contrasting field sites. *Forensic Sci Int* 2007; 169(1): 6–18. doi: 10.1016/j.forsciint.2006.07.023
98. Vass AA, Barshick S-A, Sega G, et al. Decomposition chemistry of human remains: a new methodology for determining the postmortem interval. *J Forensic Sci* 2002; 47(3): 542–53. doi: 10.1520/JFS15294J
99. Rai JK, Pickles BJ, Perotti MA. The impact of the decomposition process of shallow graves on soil mite abundance. *J Forensic Sci* 2022; 67(2): 605–18. doi: 10.1111/1556-4029.14906
100. Sorg MH, Haglund WD. Current research in forensic taphonomy. In: Dirkmaat CD, ed. *A companion to forensic anthropology*. 1st ed. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2012: 477–98
101. Mann RW, Bass WM, Meadows L. Time since death and decomposition of the human body: variables and observations in case and experimental field studies. *J Forensic Sci* 1990; 35(1): 103–11. doi: 10.1520/JFS12806J
102. Eurell JA, Frappier BL. *Dellmann's textbook of veterinary histology*. 6th ed. Iowa: John Wiley & Sons, 2006: 37–47
103. Kierszenbaum AL, Tres L. *Histology and cell biology: an introduction to pathology*. Amsterdam: Elsevier Health Sciences, 2015. 155-60
104. Stockwell RA. *Biology of cartilage cells*. Cambridge: Cambridge University Press, 1979
105. Archer CW, Francis-West P. The chondrocyte. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35(4): 401–4. doi: 10.1016/S1357-2725(02)00301-1
106. Carballo CB, Nakagawa Y, Sekiya I, Rodeo SA. Basic science of articular cartilage. *Clin Sports Med* 2017; 36(3): 413–25. doi: 10.1016/j.csm.2017.02.001
107. Kheir E, Shaw D. Hyaline articular cartilage. *Orthop Trauma* 2009; 23(6): 450–5. doi: 10.1016/j.mporth.2009.01.003
108. Knudson CB, Knudson W. Cartilage proteoglycans. *Semin Cell Dev Biol* 2001; 12(2): 69–78. doi: 10.1006/scdb.2000.0243
109. Keuttner K, Goldberg V. Molecular biology of collagens in normal and osteoarthritic

- cartilage: osteoarthritic disorders.
- Rosemont: American academy of orthopaedic surgeons, 1995: 131–46
110. Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. *Histology: a text and atlas*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003
111. Zelenski NA, Leddy HA, Sanchez-Adams J, et al. Type VI collagen regulates pericellular matrix properties, chondrocyte swelling, and mechanotransduction in mouse articular cartilage. *Arthritis Rheumatol* 2015; 67(5): 1286–94.
doi: 10.1002/art.39034
112. Kuettner KE, Schleyerbach R, Peyron J, Hascall V. Structure and function of dermatan sulfate proteoglycans in articular cartilage. In: Kuettner KE, ed. *Articular cartilage and osteoarthritis*. 1st ed. Michigan: Raven press, 1992: 45–63
113. Roughley PJ, Lee ER. Cartilage proteoglycans: structure and potential functions. *Microsc Res Tech* 1994; 28(5): 385–97. doi: 10.1002/jemt.1070280505
114. Kuettner K, Schleyerbach R, Hascall V. *Cartilage proteoglycans: articular cartilage biochemistry*. New York: Raven Press, 1986: 39–57
115. Jeffrey DR, Watt I. Imaging hyaline cartilage. *Br J Radiol* 2003; 76(911): 777–87.
doi: 10.1259/bjr/51504520
116. Buckwalter JA, Mankin HJ, Grodzinsky AJ. Articular cartilage and osteoarthritis. *Instr Course Lect Acad Orthop Surg* 2005; 54: 465-80
117. Buckwalter JA, Rosenberg LC. Electron microscopic studies of cartilage proteoglycans: direct evidence for the variable length of the chondroitin sulfate-rich region of proteoglycan subunit core protein. *J Biol Chem* 1982; 257(16): 9830–9
118. Buckwalter JA, Pita JC, Muller FJ, Nessler J. Structural differences between two populations of articular cartilage proteoglycan aggregates. *J Orthop Res* 1994; 12(1): 144–8. doi: 10.1002/jor.1100120118
119. Joshi S, Kaushik M, Agarwal M, Daruka M. Extracellular matrix: a regenerative conduit in dentistry. *IP Int J Periodontol Implantol* 2023; 8(2): 65–70.
doi: 10.18231/j.ijpi.2023.014
120. Mow VC, Xin LL. Biomechanics of articular cartilage and determination of material properties. *Med Sci Sports Exerc* 2008 Feb; 40(2): 193-9.
doi: 10.1249/mss.0b013e31815cb1fc
121. Buckwalter JA, Rosenberg LA. Articular cartilage: composition, structure, response to

- injury, and methods of facilitation repair. In: Ewing JW, ed. *Articular cartilage and knee joint function: basic science and arthroscopy*. 1st ed. New York: Raven press, 1990: 19–56
122. Buckwalter JA, Woo SL. *Articular cartilage: biomechanics*. In: Buckwalter JA, eds. *Injury and repair of the musculoskeletal soft tissues*. 1st ed. Park Ridge: American Academy of Orthopedics Surgeons, 1988: 548
123. Roughley PJ. Articular cartilage and changes in arthritis noncollagenous proteins and proteoglycans in the extracellular matrix of cartilage. *Arthritis Res* 2001; 3(6): 342–7. doi: 10.1186/ar326
124. Wang Y, Wei L, Zeng L, He D, Wei X. Nutrition and degeneration of articular cartilage. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2013; 21(8): 1751–62. doi: 10.1007/s00167-012-1977-7
125. Fam H, Bryant JT, Kontopoulou M. Rheological properties of synovial fluids. *Biorheology* 2007; 44(2): 59–74
126. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect* 1998; 47: 477–86
127. Mow VC, Holmes MH, Michael Lai W. Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: a review. *J Biomech* 1984; 17(5): 377–94. doi: 10.1016/0021-9290(84)90031-9
128. Hwang WS, Li B, Jin LH, Ngo K, Schachar NS, Hughes GN. Collagen fibril structure of normal, aging, and osteoarthritic cartilage. *J Pathol* 1992; 167(4): 425–33. doi: 10.1002/path.1711670413
129. Jeffery AK, Blunn GW, Archer CW, Bentley G. Three-dimensional collagen architecture in bovine articular cartilage. *J Bone Joint Surg Br* 1991; 73(5): 795–801. doi: 10.1302/0301-620X.73B5.1894669
130. Eschweiler J, Horn N, Rath B, et al. The biomechanics of cartilage: an overview. *Life* 2021; 11(4): 302. doi: 10.3390/life11040302.
131. Vavpotič M, Turk T, Martinčič DŠ, Balažic J. Characteristics of the number of odontoblasts in human dental pulp post-mortem. *Forensic Sci Int* 2009; 193(1/3): 122–6. doi: 10.1016/j.forsciint.2009.09.023
132. Madea B, Herrmann N, Henbge C. Precision of estimating the time since death by vitreous potassium – comparison of two different equations.

- Forensic Sci Int 1990; 46(3): 277–84. doi: 10.1016/0379-0738(90)90313-N
133. Madea B, Kreuser C, Banaschak S. Postmortem biochemical examination of synovial fluid – a preliminary study. *Forensic Sci Int* 2001; 118(1): 29–35.
doi: 10.1016/S0379-0738(00)00372-8
134. Lasczkowski GE, Aigner T, Gamedinger U, Weiler G, Bratzke H. Visualization of postmortem chondrocyte damage by vital staining and confocal laser scanning 3D microscopy. *J Forensic Sci* 2002; 47(3): 663–6
135. Williams SK, Amiel D, Ball ST, et al. Prolonged storage effects on the articular cartilage of fresh human osteochondral allografts. *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85(11): 2111–20. doi: 10.2106/00004623-200311000-00008
136. Mow VC, Ateshian GA, Spilker RL. Biomechanics of diarthrodial joints: a review of twenty years of progress. *J Biomech Eng* 1993; 115(4B): 460-7.
doi: 10.1115/1.2895525
137. Maroudas A. Physicochemical properties of articular cartilage. In: Freeman MAR, ed. *Adult articular cartilage*. 1st ed. Tunbridge Wells: Pitman Medical, 1979: 215–90.
138. Maroudas A. Transport of solutes through cartilage: permeability to large molecules. *J Anat* 1976; 122(2): 335–47
139. Paul JP. Approaches to design: force actions transmitted by joints in the human body. *Proc R Soc London Ser B Biol Sci* 1976; 192(1107): 163–72.
doi: 10.1098/rspb.1976.0004
140. Hodge WA, Fijan RS, Carlson KL, Burgess RG, Harris WH, Mann RW. Contact pressures in the human hip joint measured in vivo.
Proc Natl Acad Sci 1986; 83(9): 2879–83. doi: 10.1073/pnas.83.9.2879
141. Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC. *Manual of clinical microbiology*. 13th ed. Washington: ASM Press, 2015
142. Schulz HN, Jørgensen BB. Big bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2001; 55(1): 105–37.
doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.105
143. Kajander EO, Kuronen I, Akerman KK, Pelttari A, Ciftcioglu N. Nanobacteria from blood: the smallest culturable autonomously replicating agent on Earth.
Proc SPIE. 1997: 420–8. doi: 10.1117/12.278796
144. Alibegović A, Petrovič D, Velikonja NK, Balažic J, Drobnič M. Comparison of cartilage sources and methods for the ex-vivo determination of chondrocyte viability.

- Rom J *Leg Med* 2011; 19(4): 265–70. doi: 10.4323/rjlm.2011.265
145. Ganguly K, McRury ID, Goodwin PM, Morgan RE, Augé WK. Native chondrocyte viability during cartilage lesion progression: normal to surface fibrillation. *Cartilage* 2010; 1(4): 306–11. doi: 10.1177/1947603510373918
146. Hicks DL, Sage AB, Schumacher BL, et al. Stored human septal chondrocyte viability analyzed by confocal microscopy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2006; 132(10): 1137–42. doi: 10.1001/archotol.132.10.1137
147. Bush PG, Hodkinson PD, Hamilton GL, Hall AC. Viability and volume of in situ bovine articular chondrocytes: changes following a single impact and effects of medium osmolarity. *Osteoarthritis Cartilage* 2005; 13(1): 54–65. doi: 10.1016/j.joca.2004.10.007
148. Hembree WC, Ward BD, Furman BD, et al. Viability and apoptosis of human chondrocytes in osteochondral fragments following joint trauma. *J Bone Joint Surg Br* 2007; 89(10): 1388–95. doi: 10.1302/0301-620X.89B10.18907
149. Drobnič M, Marš T, Alibegović A, et al. Viability of human chondrocytes in an ex Vivo model in relation to temperature and cartilage depth. *Folia Biol (Praha)* 2005; 51(4): 103–8
150. Liu L, Dharmadhikari S, Shontz K, et al. Regeneration of partially decellularized tracheal scaffolds in a mouse model of orthotopic tracheal replacement. *J Tissue Eng* 2021; 12: 204173142110174. doi: 10.1177/20417314211017417
151. Otsuki S, Brinson DC, Creighton L, et al. The effect of glycosaminoglycan loss on chondrocyte viability: a study on porcine cartilage explants. *Arthritis Rheum* 2008; 58(4): 1076–85. doi: 10.1002/art.23381
152. Muhammad SA, Nordin N, Hussin P, Mehat MZ, Tan SW, Fakurazi S. Optimization of protocol for isolation of chondrocytes from human articular cartilage. *Cartilage* 2021; 13 (suppl. 2): 872S–84S. doi: 10.1177/1947603519876333
153. Amiel D, Harwood FL, Hoover JA, Meyers M. A histological and biochemical assessment of the cartilage matrix obtained from in vitro storage of osteochondral allografts. *Connect Tissue Res* 1989; 23(1): 89–99. doi: 10.3109/03008208909103906
154. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol* 2015; 111(1): A3.B.1–A3.B.3.

doi: 10.1002/0471142735.ima03bs111

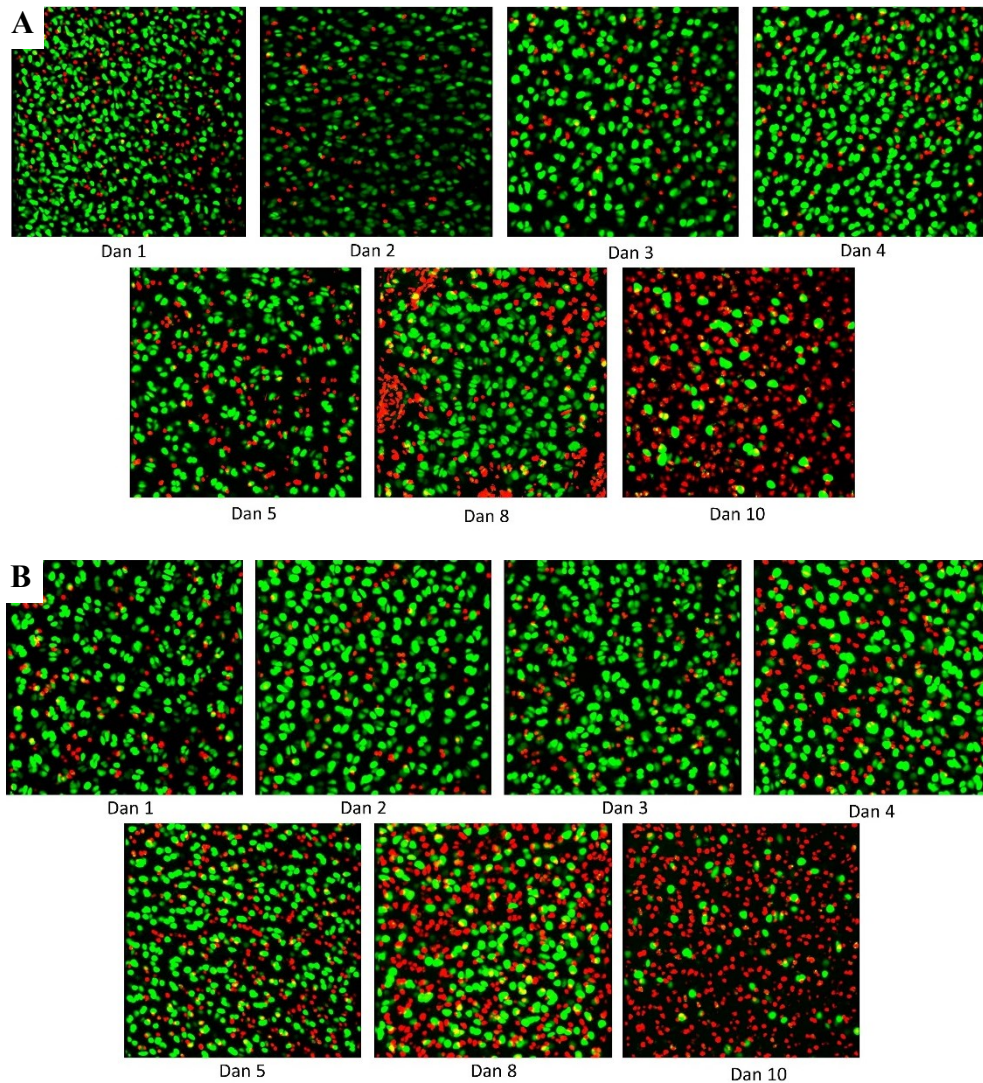
155. Pallante AL, Bae WC, Chen AC, Görtz S, Bugbee WD, Sah RL. Chondrocyte viability is higher after prolonged storage at 37 degrees C than at 4 degrees C for osteochondral grafts. *Am J Sports Med* 2009; 37(suppl. 1): 24S-32S. doi: 10.1177/0363546509351496
156. Csöngé L, Bravo D, Newman-Gage H, et al. Banking of osteochondral allografts, Part II. Preservation of chondrocyte viability during long-term storage. *Cell Tissue Bank* 2002; 3(3) :161–8. doi: 10.1023/A:1023687419152
157. Pearsall AW 4th, Tucker JA, Hester RB, Heitman RJ. Chondrocyte viability in refrigerated osteochondral allografts used for transplantation within the knee. *Am J Sports Med* 2004; 32(1): 125–31. doi: 10.1177/0095399703258614
158. Williams RJ 3rd, Dreese JC, Chen CT. Chondrocyte survival and material properties of hypothermically stored cartilage: an evaluation of tissue used for osteochondral allograft transplantation. *Am J Sports Med* 2004; 32(1): 132–9. doi: 10.1177/0095399703258733
159. Alibegović A, Balažić J, Petrovič D, Hribar G, Blagus R, Drobnič M. Viability of human articular chondrocytes harvested postmortem: changes with time and temperature of in vitro culture conditions. *J Forensic Sci* 2014; 59(2): 522–8. doi: 10.1111/1556-4029.12330
160. Fancher JP, Aitkenhead-Peterson JA, Farris T, et al. An evaluation of soil chemistry in human cadaver decomposition islands: potential for estimating postmortem interval (PMI). *Forensic Sci Int* 2017; 279: 130–9. doi: 10.1016/j.forsciint.2017.08.002
161. Suckling JK, Spradley MK, Godde K. A longitudinal study on human outdoor decomposition in Central Texas. *J Forensic Sci* 2016; 61(1): 19–25. doi: 10.1111/1556-4029.12892
162. Stokes S, Márquez-Grant N, Greenwood C. Establishing a minimum PMI for bone sun bleaching in a UK environment with a controlled desert-simulated comparison. *Int J Legal Med* 2020; 134(6): 2297–306. doi: 10.1007/s00414-020-02385-y
163. Keough N, Myburgh J, Steyn M. Scoring of decomposition: a proposed amendment to the method when using a pig model for human studies. *J Forensic Sci* 2017; 62(4): 986–93. doi: 10.1111/1556-4029.13390
164. Dautartas A, Kenyhercz MW, Vidoli GM, Meadows Jantz L, Mundorff A, Steadman

- DW. Differential decomposition among pig, rabbit, and human remains. *J Forensic Sci* 2018; 63(6): 1673–83. doi: 10.1111/1556-4029.13784
165. Wallman JF. Body farms. *Forensic Sci Med Pathol* 2017; 13(4): 487–9. doi: 10.1007/s12024-017-9932-z
166. Schoenly KG, Haskell NH, Hall RD, Gbur JR. Comparative performance and complementarity of four sampling methods and arthropod preference tests from human and porcine remains at the Forensic Anthropology Center in Knoxville, Tennessee. *J Med Entomol* 2007; 44(5): 881–94. doi: 10.1603/0022-2585(2007)44[881:cpacof]2.0.co;2
167. Rogers CJ, Clark K, Hodson BJ, Whitehead MP, Sutton R, Schmerer WM. Postmortem degradation of porcine articular cartilage. *J Forensic Leg Med* 2011; 18(2): 52–6. doi: 10.1016/j.jflm.2010.11.006
168. Uradni list RS, št. 38/13 – uradno prečiščeno besedilo, 21/18 – ZNOrg, 92/20, 159/21 in 109/23 (3. 12. 1999)
169. Ojima T, et al. Transverse incision advantages for total knee arthroplasty. *J Orthop Sci* 2011;16(5):524–30. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00776-011-0133-4>
170. Szpila K. Key for the identification of third instars of European blowflies (Diptera: Calliphoridae) of forensic importance BT. In: Amendt J, eds. *Current concepts in forensic entomology*. 1st ed. Dordrecht: Springer, 2010: 43–56
169. Byrd JH, Tomberlin JK. *Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations*. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press, 2019: 39-389
172. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. 2022. <https://www.r-project.org/> (24. 11. 2022)
173. Xia Z, Murray D, Hulley PA, Triffitt JT, Price AJ. The viability and proliferation of human chondrocytes following cryopreservation. *J Bone Joint Surg Br* 2008; 90(9): 1245–8. doi: 10.1302/0301-620X.90B9.20652
171. Qi J, Hu Z, Song H, et al. Cartilage storage at 4 °C with regular culture medium replacement benefits chondrocyte viability of osteochondral grafts in vitro. *Cell Tissue Bank* 2016; 17(3): 473–9. doi: 10.1007/s10561-016-9556-7
172. Pritzker KPH, Gross AE, Langer F, Luk SC, Houpt JB. Articular cartilage transplantation. *Hum Pathol* 1977; 8(6): 635–51. doi: 10.1016/S0046-8177(77)80093-2
173. Bujía J, Kremer D, Sudhoff H, Viviente E, Sprekelsen C, Wilmes E. Determination of

- viability of cryopreserved cartilage grafts.
Eur Arch Otorhinolaryngol 1995; 252(1): 30–4. doi: 10.1007/BF00171437
174. Oates KM, Chen AC, Young EP, Kwan MK, Amiel D, Convery FR. Effect of tissue culture storage on the in vivo survival of canine osteochondral allografts.
J Orthop Res 1995; 13(4): 562–9. doi: 10.1002/jor.1100130411
175. Rodrigo JJ, Thompson E, Travis C. Deep-freezing versus 4 degrees preservation of avascular osteocartilaginous shell allografts in rats.
Clin Orthop Relat Res 1987; (218): 268–75
176. Amendt J, Zehner R, Reckel F. The nocturnal oviposition behaviour of blowflies (Diptera: Calliphoridae) in Central Europe and its forensic implications.
Forensic Sci Int 2008; 175(1): 61–4. doi: 10.1016/j.forsciint.2007.05.010
177. Salimi M, Rassi Y, Oshaghi M, Chatrabgoun O, Limoe M, Rafizadeh S. Temperature requirements for the growth of immature stages of blowflies species, *Chrysomya albiceps* and *Calliphora vicina*, (Diptera:Calliphoridae) under laboratory conditions.
Egypt J Forensic Sci 2018; 8(1): 28. doi: 10.1186/s41935-018-0060-z
178. Ody H, Bulling MT, Barnes KM. Effects of environmental temperature on oviposition behavior in three blow fly species of forensic importance.
Forensic Sci Int 2017; 275: 138–43. doi: 10.1016/j.forsciint.2017.03.001
179. Hans KR, LeBouthillier R, VanLaerhoven SL. Effect of temperature on oviposition behavior and egg load of blow flies (Diptera: Calliphoridae).
J Med Entomol 2019; 56(2): 441–7. doi: 10.1093/jme/tjy173

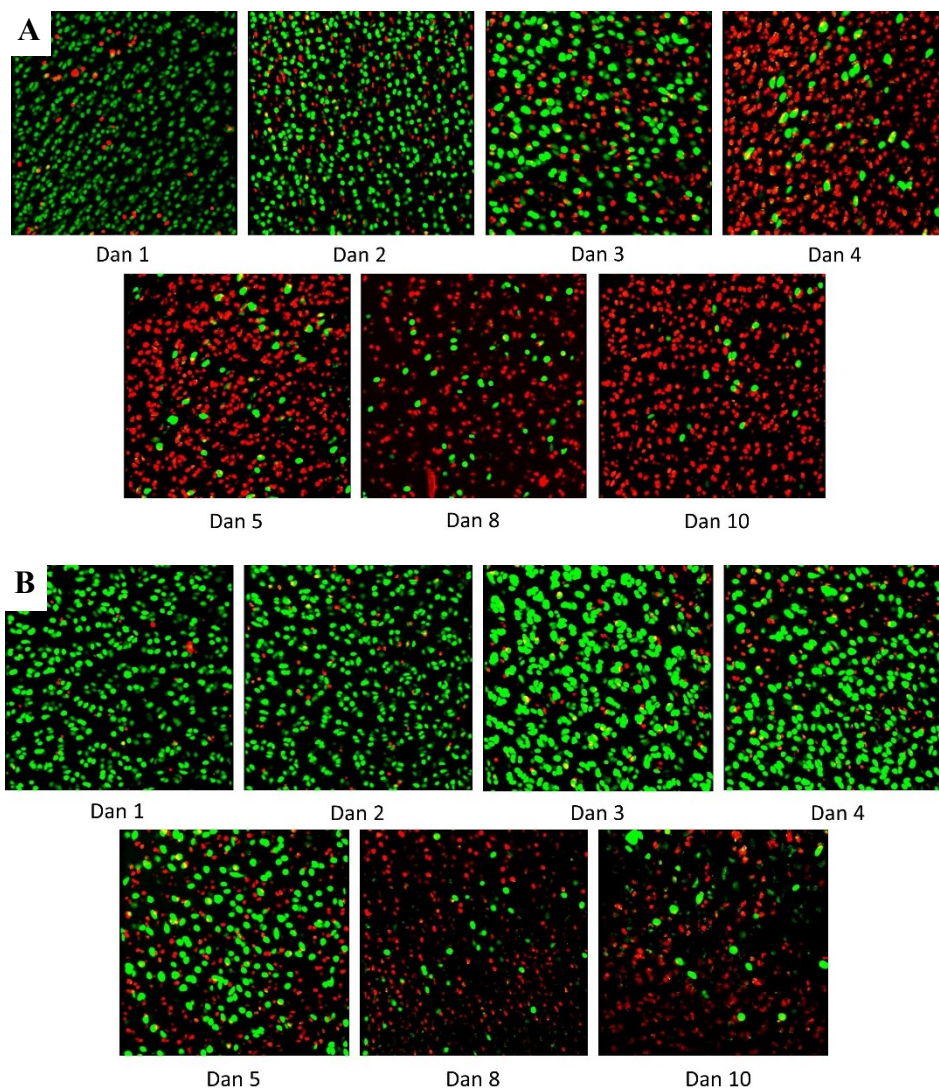
11 PRILOGE

11.1 PRILOGA 1



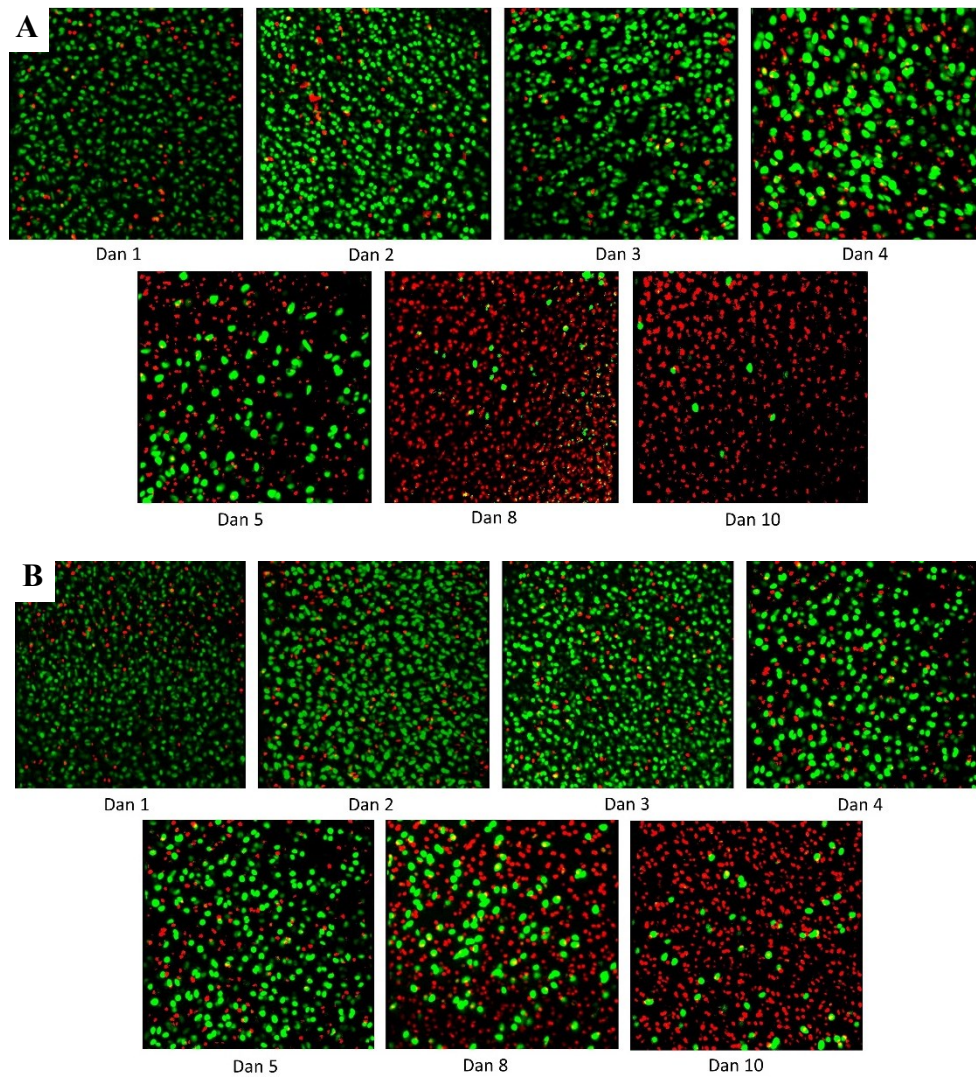
Slika 26: Prikaz padca deleža viabilnih hondrocitov jeseni z uporabo metode s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom; nezakopane zadnje okončine (A), zakopane zadnje okončine (B). Viabilni hondrociti z zeleno obarvano citoplazmo; neviabilni hondrociti z rdeče obarvanim jedrom.

Figure 26: An example of the decrease in the proportion of viable chondrocytes in the fall observed via confocal laser scanning microscopy method; unburied hind legs (A), buried hind legs (B). Viable chondrocytes with the cytoplasm stained green; nonviable chondrocytes with the nucleus stained red.



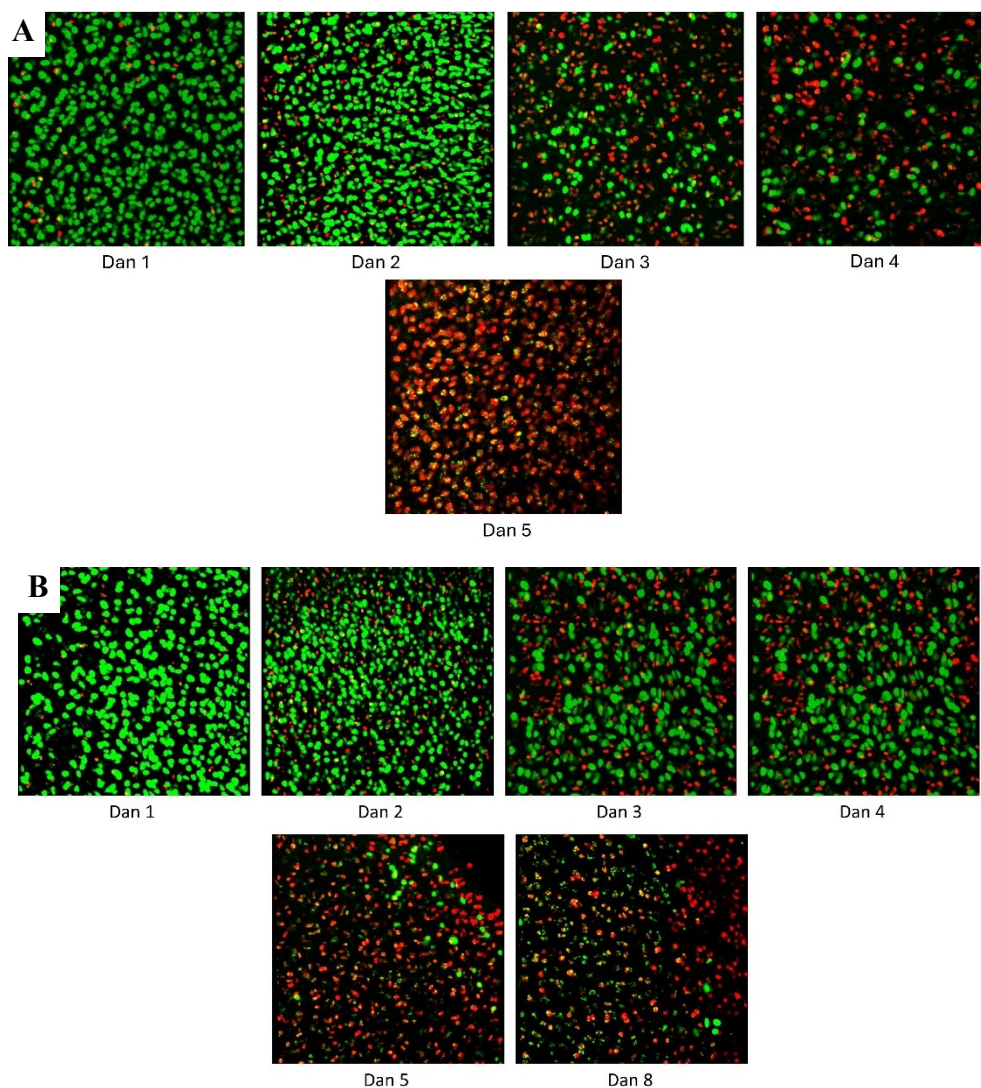
Slika 27: Prikaz padca deleža viabilnih hondrocitov pozimi z uporabo metode s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom; nezakopane zadnje okončine (A), zakopane zadnje okončine (B). Viabilni hondrociti z zeleno obarvano citoplazmo; neviabilni hondrociti z rdeče obarvanim jedrom.

Figure 27: An example of the decrease in the proportion of viable chondrocytes in winter observed via confocal laser scanning microscopy method; unburied hind legs (A), buried hind legs (B). Viable chondrocytes with the cytoplasm stained green; nonviable chondrocytes with the nucleus stained red.



Slika 28: Prikaz padca deleža viabilnih hondrocitov pomladi z uporabo metode s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom; nezakopane zadnje okončine (A), zakopane zadnje okončine (B). Viabilni hondrociti z zeleno obarvano citoplazmo in neviabilni hondrociti z rdeče obarvanim jedrom.

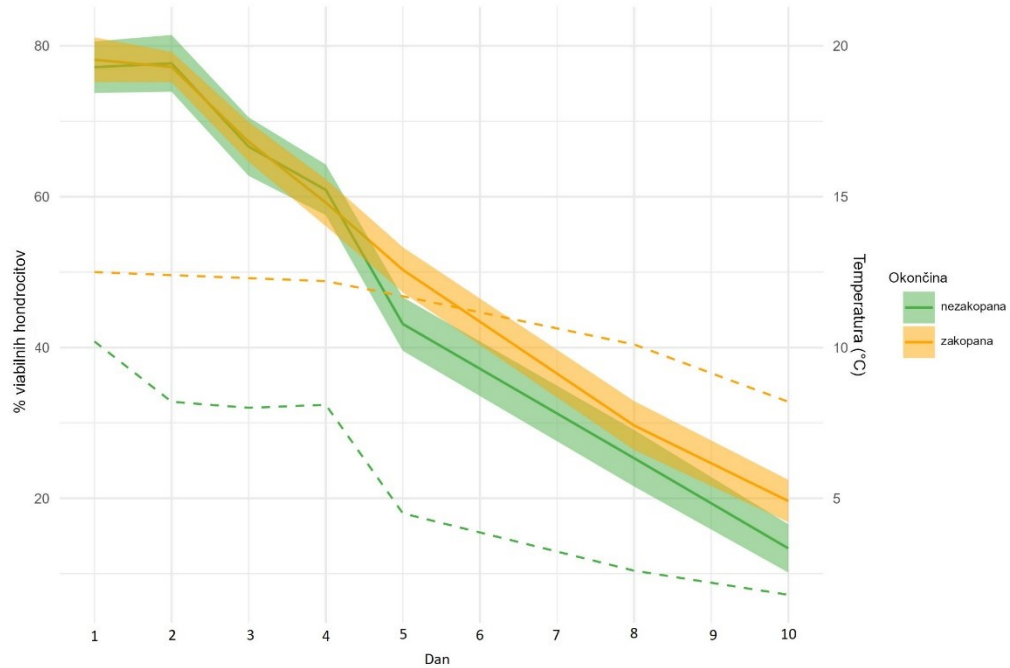
Figure 28: An example of the decrease in the proportion of viable chondrocytes in spring observed via confocal laser scanning microscopy method; unburied hind legs (A), buried hind legs (B). Viable chondrocytes with the cytoplasm stained green; nonviable chondrocytes with the nucleus stained red.



Slika 29: Prikaz padca deleža viabilnih hondrocitov poleti z uporabo metode s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom; nezakopane zadnje okončine (A), zakopane zadnje okončine (B). Viabilni hondrociti z zeleno obarvano citoplazmo in neviabilni hondrociti z rdeče obarvanim jedrom.

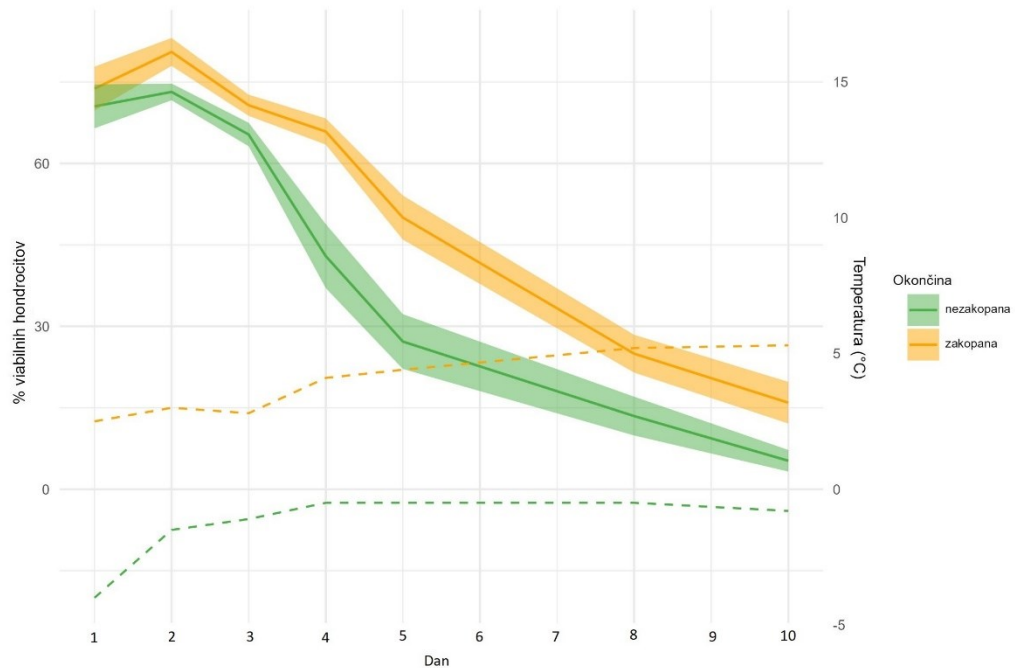
Figure 29: An example of the decrease in the proportion of viable chondrocytes in summer observed via confocal laser scanning microscopy method; unburied hind legs (A), buried hind legs (B). Viable chondrocytes with the cytoplasm stained green; nonviable chondrocytes with the nucleus stained red.

11.2 PRILOGA 2



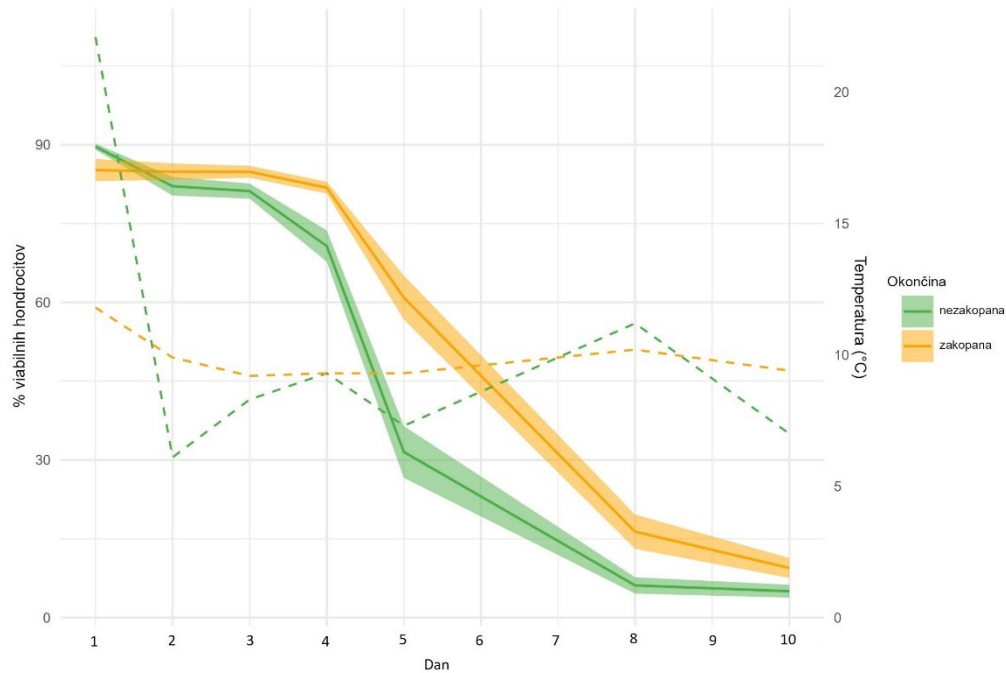
Slika 30: Krivulje prikazujejo povprečje in standardno napako v deležu viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih zadnjih okončin jeseni z uporabo metode s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom. Črtkane črte prikazujejo povprečno temperaturo na površini groba (zelena) in v globini groba (rumena).

Figure 30: The curves show the mean value and standard error of the proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of buried and unburied hind legs in the fall via confocal laser scanning microscopy method. The dashed lines represent the average temperature at the surface of the grave (green) and at the depth of the grave (yellow).



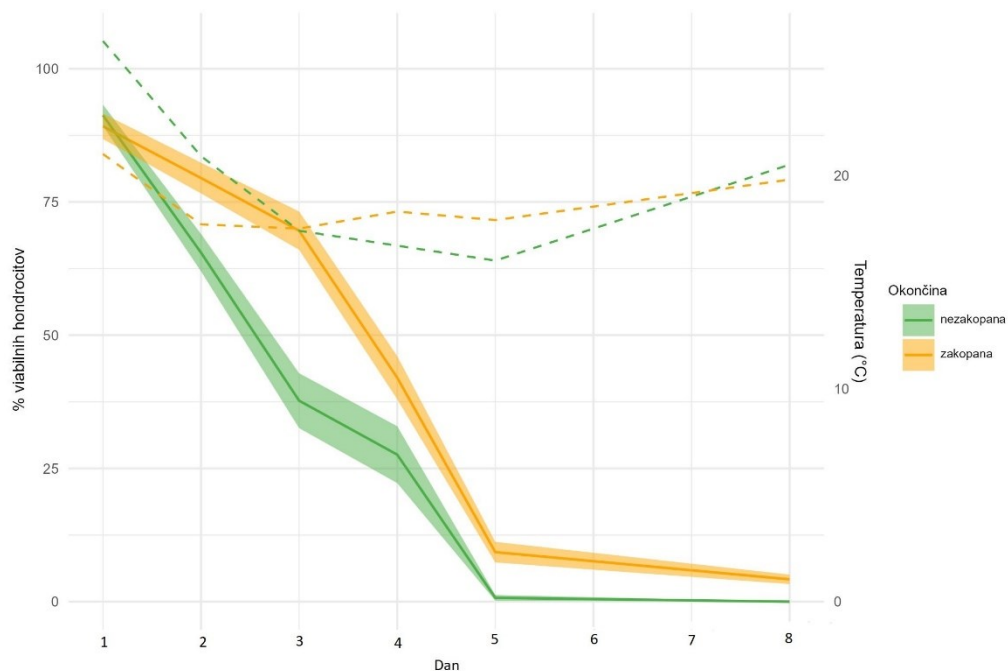
Slika 31: Krivulje prikazujejo povprečje in standardno napako v deležu viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih zadnjih okončin pozimi z uporabo metode s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom. Črtkane črte prikazujejo povprečno temperaturo na površini groba (zeleno) in v globini groba (rumeno).

Figure 31: The curves show the mean value and standard error of the proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of buried and unburied hind legs in winter via confocal laser scanning microscopy method. The dashed lines represent the average temperature at the surface of the grave (green) and at the depth of the grave (yellow).



Slika 32: Krivulje prikazujejo povprečje in standardno napako v deležu viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih zadnjih okončin spomladi z uporabo metode s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom. Črtkane črte prikazujejo povprečno temperaturo na površini groba (zeleno) in v globini groba (rumeno).

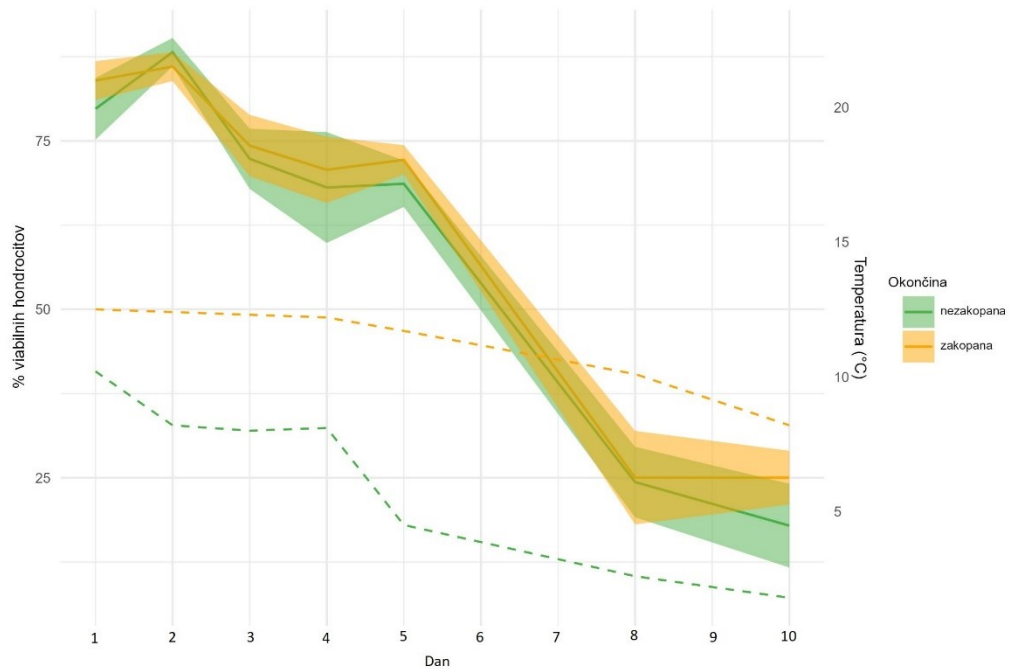
Figure 32: The curves show the mean value and standard error of the proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of the knee joints of buried and unburied hind legs in spring via confocal laser scanning microscopy method. The dashed lines represent the average temperature at the surface of the grave (green) and at the depth of the grave (yellow).



Slika 33: Krivulje prikazujejo povprečje in standardno napako v deležu viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih zadnjih okončin poleti z uporabo metode s konfokalnim laserskim skenirnim mikroskopom. Črtkane črte prikazujejo povprečno temperaturo na površini groba (zelena) in v globini groba (rumena).

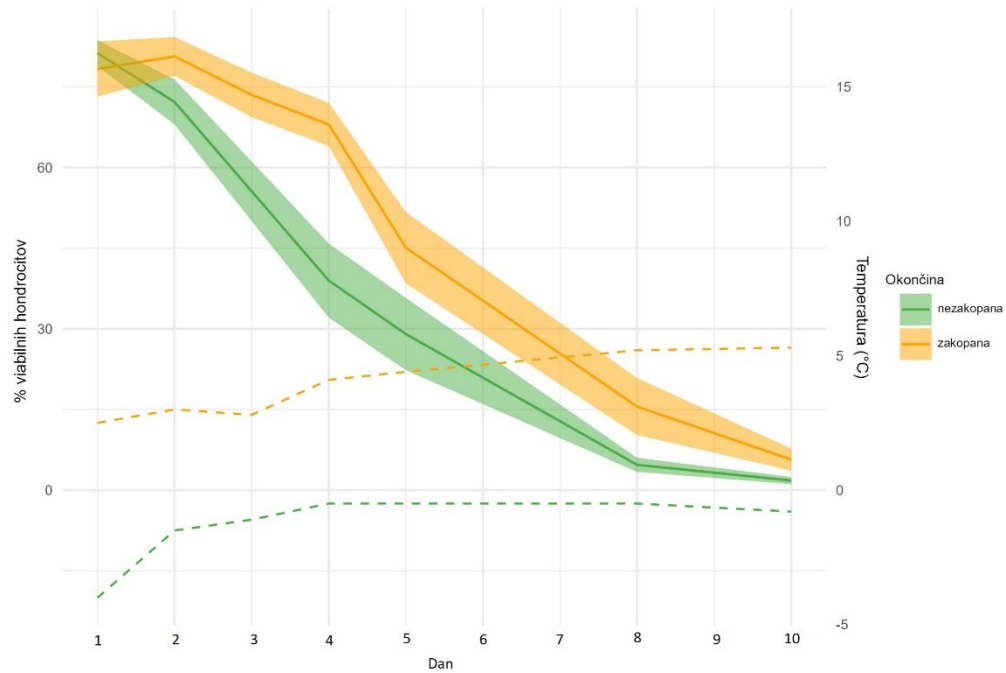
Figure 33: The curves show the mean value and standard error of the proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of the knee joints of buried and unburied hind legs in summer via confocal laser scanning microscopy method. The dashed lines represent the average temperature at the surface of the grave (green) and at the depth of the grave (yellow).

11.3 PRILOGA 3



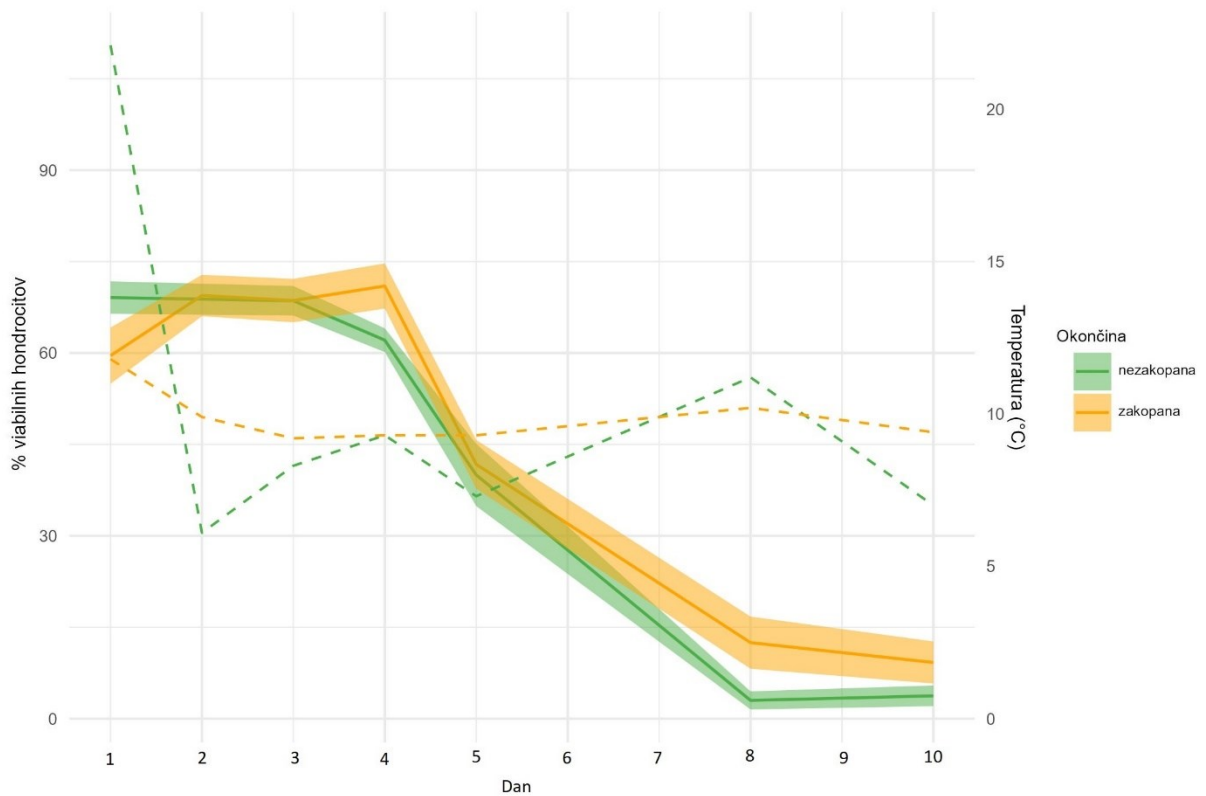
Slika 34: Krivulje prikazujejo povprečje in standardno napako v deležu viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih zadnjih okončin jeseni z uporabo metode s tripanskim modrilom. Črtkane črte prikazujejo povprečno temperaturo na površini groba (zeleno) in v globini groba (rumeno).

Figure 34: The curves show the mean value and standard error of the proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of the knee joints of buried and unburied hind legs in fall via trypan blue dye method. The dashed lines represent the average temperature at the surface (green) and at the depth of the grave (yellow).



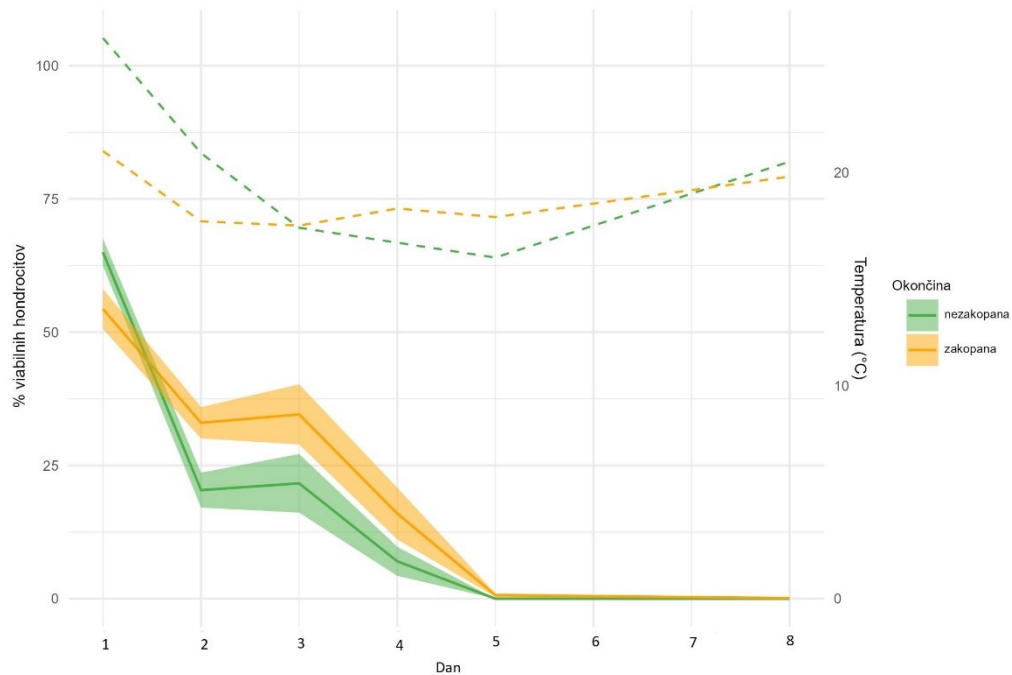
Slika 35: Krivulje prikazujejo povprečje in standardno napako v deležu viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih zadnjih okončin pozimi z uporabo metode s tripanskim modrilom. Črtkane črte prikazujejo povprečno temperaturo na površini groba (zeleno) in v globini groba (rumeno).

Figure 35: The curves show the mean value and standard error of the proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of buried and unburied hind legs in winter via trypan blue dye method. The dashed lines represent the average temperature at the surface of the grave (green) and at the depth of the grave (yellow).



Slika 36: Krivulje prikazujejo povprečje in standardno napako v deležu viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustancih kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih okončin spomladi z uporabo metode s tripanskim modrilom. Črtkane črte prikazujejo povprečno temperaturo na površini groba (zeleno) in v globini groba (rumeno).

Figure 36: The curves show the mean value and standard error of the proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of buried and unburied hind legs in spring via trypan blue dye method. The dashed lines represent the average temperature at the surface of the grave (green) and at the depth of the grave (yellow).



Slika 37: Krivulje prikazujejo povprečje in standardno napako v deležu viabilnih hondrocitov v sklepnih hrustančih kolenskih sklepov zakopanih in nezakopanih okončin poleti z uporabo metode s tripanskim modrilom. Črtkane črte prikazujejo temperaturo na površini groba (zeleno) in v globini groba (rumeno).

Figure 37: The curves show the mean value and standard error of the proportion of viable chondrocytes in the articular cartilages of the knee joints of buried and unburied hind legs in summer via trypan blue dye method. The dashed lines represent the temperature at the surface of the grave (green) and at the depth of the grave (yellow).