

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ  
ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ  
ΛΙΘΙΟΥ ΣΤΟ ΔΕΡΜΑ**

ΚΟΥΝΑΔΗ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ  
ΦΥΣΙΚΟΣ

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 1994**



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000345693



ΑΠΟ ΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ  
ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ  
ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΓΛΑΡΟΣ

# ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΛΙΘΙΟΥ ΣΤΟ ΔΕΡΜΑ

ΚΟΥΝΑΔΗ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ  
ΦΥΣΙΚΟΣ  
ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 1994



"Η έγκριση της διατριβής από την Ιατρική Σχολή, δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα" (Νόμος 5343/32, άρθρο 200, παρ.2)



Στους γονείς μου  
Έλλη και Παναγή

ΕΠΙΓΡΑΦΗ

Ο έργο αυτό είναι αφιερωμένο στους γονείς μου, Έλλη και Παναγή, οι οποίοι με την αγάπη και την υποστήριξη τους με βοήθησαν να ολοκληρώσω αυτή την προσπάθεια. Η έμπνευσή τους και η πίστη τους σε μένα είναι η κινητήρια δύναμη που με ώθησε να συνεχίσω μέχρι σήμερα. Το έργο αυτό είναι αφιερωμένο και στο σύζυγό μου Γιώργο, ο οποίος με την αγάπη και την υποστήριξη του με βοήθησε να ολοκληρώσω αυτή την προσπάθεια. Η έμπνευσή του και η πίστη του σε μένα είναι η κινητήρια δύναμη που με ώθησε να συνεχίσω μέχρι σήμερα.

Στο σύζυγό μου  
Γιώργο



## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γλάρος Δημήτριος: Καθηγητής Ιατρικής Φυσικής, Παν. Ιωαννίνων.

Τζαφλίδου Μαργαρίτα: Αναπ. Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσικής,  
Παν. Ιωαννίνων.

Λαγός Γεώργιος: Επικ. Καθηγητής Νευρολογίας, Παν. Ιωαννίνων.

## ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γλάρος Δημήτριος: Καθηγητής Ιατρικής Φυσικής, Παν. Ιωαννίνων.

Λιάκος Αρης: Καθηγητής Ψυχιατρικής, Παν. Ιωαννίνων.

Βαλκανά Θεώνη: Καθηγήτρια Φυσιολογίας Ανθρώπου/Ζώων,  
Τμήμα Βιολογίας, Παν. Πατρών.

Μαρσέλος Μάριος: Καθηγητής Φαρμακολογίας, Παν. Ιωαννίνων.

Τζαφλίδου Μαργαρίτα: Αναπ. Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσικής,  
Παν. Ιωαννίνων.

Χατζής Ιωάννης: Αναπ. Καθηγητής Δερματολογίας, Παν. Ιωαννίνων.

Λαγός Γεώργιος: Επικ. Καθηγητής Νευρολογίας, Παν. Ιωαννίνων.



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η διδακτορική αυτή διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιατρικής Φυσικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κατά τη χρονική περίοδο 1990 - 1994, όπου αποτέλεσε τη βασική μου ενασχόληση στο διάστημα αυτό.

Ολοκληρώνοντας την εργασία αυτή αισθάνομαι αυθόρμητα την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν με τον τρόπο τους στην πραγματοποίησή της.

Ευχαριστώ τα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής για την όλη υποστήριξη τους και τις χρήσιμες παρατηρήσεις τους για την ολοκλήρωση της εργασίας αυτής.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Δημήτριο Γλάρο όχι μόνο γιατί μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με τον υπέροχο κόσμο της Ιατρικής Φυσικής, αλλά και για το συνεχές ενδιαφέρον του και τις πολύτιμες συμβουλές του σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής αυτής.

Ευχαριστώ θερμά την Αναπ. Καθηγήτρια κ. Μαργαρίτα Τζαφλίδου για τη συνεχή καθοδήγηση, παρακολούθηση και ενθάρρυνση σε όλη τη διάρκεια διεξαγωγής και συγγραφής της εργασίας αυτής, παρά το πλήθος των υποχρεώσεών της.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επικ. Καθηγητή της Φυσιολογίας κ. Ανδρέα Δόνο για την πάντα πρόθυμη και ουσιαστική βοήθεια που μου προσέφερε σε θέματα σχετικά με τα πειραματόζωα αλλά και για τις πολύτιμες συμβουλές του.

Τις ευχαριστίες μου εκφράζω στο προσωπικό του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομίας και ιδιαίτερα στην Διευθύντριά του Καθηγήτρια κ. Νίκη Αγγάντη για τη συμπαράστασή τους.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη Δ.Ε.Π. του Εργαστηρίου Ιατρικής Φυσικής, Αναπ. Καθηγητή κ. Τ. Καλέφ-Εζρά, Επικ. Καθηγητή



κ. Κ. Ρήγα, Λέκτορα κ. Ι. Λεοντίου, τα μέλη Ε.Δ.Τ.Π. του Εργαστηρίου Ιατρικής Φυσικής, κ. Ε. Κοτρότσου, κ. Ν. Βλάχο, κ. Μ. Καλέφ-Εζρά, κ. Χ. Γούσια και κ. Γ. Μπαλιούσκα για τη βοήθεια και τη συμπαράστασή τους. Επίσης ευχαριστώ τον κ. Θανάση Βέρρο, εργαζόμενο στο εκτροφείο πειραματοζώων, που φρόντιζε για την αναπαραγωγή και τη σωστή διατροφή των πειραματοζώων.

Επίσης θα ήθελα ιδιαίτερα να ευχαριστήσω το σύζυγό μου Γεώργιο Φούντο ο οποίος μου συμπαραστάθηκε και με βοήθησε ουσιαστικά σε όλη την διάρκεια διεξαγωγής της εργασίας αυτής.

Τέλος οφείλω να ευχαριστήσω θερμά το Ίδρυμα Μποδοσάκη και την Μητρόπολη Ιωαννίνων για την οικονομική ενίσχυση που μου προσέφεραν κατά την διάρκεια της εργασίας αυτής χωρίς την οποία θα ήταν για μένα αδύνατη η πραγματοποίησή της. Επίσης ευχαριστώ την Ευρωπαϊκή Οικονομική Κοινότητα που μέσω του προγράμματος SH 33/246 υποστήριξε οικονομικά την αγορά υλικών απαραίτητων για την διεξαγωγή της εργασίας αυτής.





## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελίδα

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

#### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

7

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

#### ΤΟ ΛΙΘΙΟ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ

2.1	Ιστορική αναδρομή της χρήσης του λιθίου στην ιατρική	12
2.2	Χρήση του λιθίου στη σημερινή ιατρική	13
2.3	Παρενέργειες από τη χρήση του λιθίου	15
2.3.1	Παρενέργειες από την τοξικότητα του λιθίου	16
2.3.2	Παρενέργειες που δεν εξαρτώνται από τη δόση	17
2.4	Δερματικές αλλοιώσεις από τη χρήση του λιθίου	18
2.5	Κατανομή του λιθίου στο σώμα	20
2.5.1	In vitro εύρεση της κατανομής του λιθίου στο σώμα	20
2.5.2	In vivo εύρεση της κατανομής του λιθίου στο σώμα	24

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

#### ΚΟΛΛΑΓΟΝΟ

3.1	Εισαγωγή	26
3.2	Μοριακή δομή του κολλαγόνου	27
3.3	Η αλληλουχία των αμινοξέων στο μόριο του κολλαγόνου	29
3.4	Περιοχή της τριπλής έλικας του μορίου κολλαγόνου	31



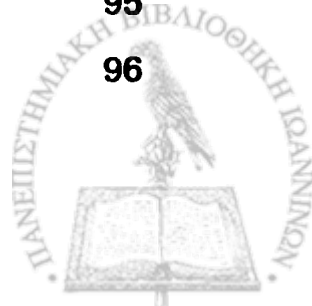
3.5	Μη ελικοειδείς περιοχές στο μόριο του κολλαγόνου	34
3.6	Υδατάνθρακες	36
3.7	Βιοσύνθεση του κολλαγόνου	36
3.8	Προκολλαγόνο	37
3.9	Χιαστοί δεσμοί στο κολλαγόνο	37
3.10	Διάσπαση του μορίου κολλαγόνου	38
3.11	Ανασύνταξη των μορίων κολλαγόνου για το σχηματισμό των ινιδίων	38
3.12	Ινίδια κολλαγόνου	42
3.12.1	Η περιοδικότητα D στα ινίδια κολλαγόνου	42
3.12.2	Η τρισδιάστατη δομή των ινιδίων κολλαγόνου	46
3.13	Εμφάνιση των ινιδίων κολλαγόνου στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο	47
3.14	Θετική χρώση	47
3.14.1	Υπόδειγμα θετικής χρώσης ινιδίων κολλαγόνου	48
3.14.2	Σύγκριση υποδείγματος θετικής χρώσης ινιδίου κολλαγόνου με την κατανομή των φορτίων κατά μήκος του ινιδίου	51
3.14.3	Κολλαγόνο και θετική χρώση με μέταλλα φορτισμένα αρνητικά ή θετικά	56
3.15	Αρνητική χρώση	59
3.15.1	Αρνητική χρώση ινιδίων κολλαγόνου	60
3.16	Σταθεροποίηση	63
3.16.1	Σταθεροποίηση με γλουταραλδεϋδη	64
3.16.2	Αντίδραση της γλουταραλδεϋδης με το κολλαγόνο	65
3.16.3	Σταθεροποίηση με τετροξειδίο του οσμίου	67



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4**

### **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

<b>4.1</b>	<b>Εισαγωγή</b>	<b>68</b>
<b>4.2</b>	<b>Παρασκευή διαλυμάτων LiCl</b>	<b>69</b>
<b>4.3</b>	<b>Πειράματα</b>	<b>70</b>
<b>4.3.1</b>	<b>Πρώτο πείραμα - Καθημερινές ενέσεις για 1- μήνα με δόση 1,5 meq Li/Kg ζώου</b>	<b>70</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Δεύτερο πείραμα - Καθημερινές ενέσεις για 1- μήνα με δόση 6 meq Li/Kg ζώου</b>	<b>74</b>
<b>4.3.3</b>	<b>Τρίτο πείραμα - Καθημερινές ενέσεις για 1- μήνα με δόση 0,7 meq Li/Kg ζώου</b>	<b>77</b>
<b>4.3.4</b>	<b>Τέταρτο πείραμα - Καθημερινές ενέσεις για 1-, ή για 2- εβδομάδες με δόση 1,5 meq Li/Kg ζώου</b>	<b>81</b>
<b>4.3.5</b>	<b>Πέμπτο πείραμα - Καθημερινές ενέσεις για 1- εβδομάδα με δόση 0,7 meq Li/Kg ζώου</b>	<b>83</b>
<b>4.4</b>	<b>Προετοιμασία δειγμάτων δέρματος για ηλεκτρονική μικροσκοπία</b>	<b>85</b>
<b>4.4.1</b>	<b>Σταθεροποίηση των δειγμάτων δέρματος</b>	<b>85</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Αφυδάτωση των δειγμάτων δέρματος</b>	<b>87</b>
<b>4.4.3</b>	<b>Εμποτισμός των δειγμάτων δέρματος</b>	<b>88</b>
<b>4.4.4</b>	<b>Κοπή πολύ λεπτών τομών</b>	<b>90</b>
<b>4.4.5</b>	<b>Χρώση των λεπτών τομών των δειγμάτων δέρματος</b>	<b>91</b>
<b>4.5</b>	<b>Ηλεκτρονική μικροσκοπία</b>	<b>93</b>
<b>4.6</b>	<b>Ανάλυση των ηλεκτρονικών μικρογραφιών</b>	<b>93</b>
<b>4.7</b>	<b>Ανάλυση υποδειγμάτων θετικής χρώσης ινιδίων κολλαγόνου</b>	<b>95</b>
<b>4.7.1</b>	<b>Ψηφιοποίηση στις εικόνες των υποδειγμάτων</b>	<b>96</b>
<b>4.7.2</b>	<b>Εύρεση της καμπύλης κατανομής των φορτίων</b>	



	κατά μήκος των ινιδίων κολλαγόνου	98
4.7.3	Εύρεση της καμπύλης του μέσου όρου της κατανομής των φορτίων	100
4.7.4	Σύγκριση καμπυλών κατανομής φορτίων	107

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΛΙΘΙΟΥ ΣΤΟ ΚΟΛΛΑΓΟΝΟ ΔΕΡΜΑΤΟΣ ΠΟΝΤΙΚΩΝ

#### I. ΜΕΛΕΤΗ ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗΣ ΙΝΙΔΙΩΝ ΚΟΛΛΑΓΟΝΟΥ ΣΕ ΥΠΕΡΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

5.1	Εισαγωγή	108
5.2	Αρχιτεκτονική ινιδίων κολλαγόνου και μορφομετρική ανάλυση στους μάρτυρες	109
5.3	Επιδράσεις λιθίου στο κολλαγόνο δέρματος ποντικών που δέχθηκαν καθημερινή δόση 1,5 meq Li/Kg για 1- μήνα	113
5.4	Επιδράσεις λιθίου στο κολλαγόνο δέρματος ποντικών που δέχθηκαν καθημερινή δόση 6 meq Li/Kg για 1- μήνα	122
5.5	Επιδράσεις λιθίου στο κολλαγόνο δέρματος ποντικών που δέχθηκαν καθημερινή δόση 0,7 meq Li/Kg για 1- μήνα	132
5.6	Επιδράσεις λιθίου στο κολλαγόνο δέρματος ποντικών που δέχθηκαν καθημερινή δόση 1,5 meq Li/Kg για 1- εβδομάδα ή για 2- εβδομάδες	142
5.7	Επιδράσεις λιθίου στο κολλαγόνο δέρματος ποντικών που δέχθηκαν καθημερινή δόση 0,7 meq Li/Kg για 1- εβδομάδα	148



**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6****ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ  
ΥΠΟΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΘΕΤΙΚΗΣ ΧΡΩΣΗΣ ΙΝΙΔΙΩΝ  
ΚΟΛΛΑΓΟΝΟΥ****II. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΤΩΝ ΦΟΡΤΙΩΝ  
ΚΑΤΑ ΜΗΚΟΣ ΤΩΝ ΙΝΙΔΙΩΝ ΚΟΛΛΑΓΟΝΟΥ**

6.1	Εισαγωγή	155
6.2	Οπτική σύγκριση των υποδειγμάτων θετικής χρώσης των ινιδίων των πειραματοζώων που δέχθηκαν λίθιο με αυτά των μαρτύρων	156
6.3	Ανάλυση σε υποδείγματα θετικής χρώσης ινιδίων κολλαγόνου από τους μάρτυρες	159
6.4	Ανάλυση σε υποδείγματα θετικής χρώσης ινιδίων κολλαγόνου από τα πειραματοζώα που δέχθηκαν λίθιο	161

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7****ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

7.1	Συμπεράσματα και συζήτηση από την μελέτη της αρχιτεκτονικής των ινιδίων κολλαγόνου και από μορφομετρική ανάλυση	169
7.2	Συμπεράσματα και συζήτηση από την μελέτη της κατανομής των φορτίων κατά μήκος των ινιδίων κολλαγόνου	174



<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>178</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>180</b>

## **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ**

<b>Παράρτημα 1: Πρόγραμμα "CORRECTION"</b>	<b>183</b>
<b>Παράρτημα 2: Πρόγραμμα "DENSITY"</b>	<b>187</b>
<b>Παράρτημα 3: Πρόγραμμα "SMOOTHING"</b>	<b>198</b>
<b>Παράρτημα 4: Πίνακες μορφομετρικής ανάλυσης</b>	<b>202</b>

<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>204</b>
---------------------	------------



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Πολλοί άνθρωποι σε ολόκληρο τον κόσμο και στην Ελλάδα υποφέρουν από μανιακές ή καταθλιπτικές διαταραχές, οι οποίες επαναλαμβάνονται σε διάφορα χρονικά διαστήματα. Σημαντικός αριθμός δαπανών από τη δημόσια Υγεία απαιτείται για τους ασθενείς που πάσχουν από τις παραπάνω ασθένειες. Η αντιμετώπιση των παθήσεων αυτών περιλαμβάνει τη σωστή θεραπευτική αγωγή κατά την εμφάνιση των επεισοδίων αλλά και την προφύλαξη από τις παθήσεις αυτές, δηλαδή την πρόληψη των μανιακών και καταθλιπτικών επεισοδίων.

Διάφορα φάρμακα χρησιμοποιούνται σήμερα για τη θεραπεία και την πρόληψη των μανιακών και καταθλιπτικών διαταραχών. Το λίθιο είναι ένα στοιχείο της φύσης που χρησιμοποιείται εκτεταμένα για το σκοπό αυτό τα τελευταία χρόνια (Schou, 1986; Souza and Goodwin, 1991). Οι θεραπευτικές του ιδιότητες στις μανιακές και καταθλιπτικές διαταραχές είναι σήμερα γνωστές (Foster, 1992). Η χρήση του όμως προκαλεί και δυσάρεστες συνέπειες σε πολλούς ασθενείς μια και συχνά παρατηρούνται αλλοιώσεις σε διάφορα όργανα του ανθρώπινου οργανισμού (Deandrea *et al.*, 1982; Lydiard and Gelenberg, 1982).

Το λίθιο είναι ένα πολύ μικρό και ελαφρύ στοιχείο, κινείται εύκολα και έχει την ικανότητα να διαπερνά πολλούς ιστούς. Είναι ένα στοιχείο που δύσκολα ανιχνεύεται γιατί είναι πολύ ελαφρύ και διαφεύγει εύκολα, και γιατί δεν έχει, όπως συμβαίνει με άλλα στοιχεία, κάποιο ισότοπο το οποίο να εκπέμπει ακτινοβολία μέσω της οποίας θα μπορούσε να ανιχνευτεί (Wissocq *et al.*, 1979). Εξαιτίας της δύσκολης ανίχνευσης του λιθίου ο τρόπος δράσης του δεν είναι ακόμη γνωστός.



Στην προσπάθεια εύρεσης του μηχανισμού δράσης του λιθίου έχουν γίνει διάφορες μελέτες για την ανίχνευση του στα διάφορα όργανα. Η φλογοφωτομετρία και η ατομική απορρόφηση χρησιμοποιείται για τον *in vitro* προσδιορισμό της μέσης τιμής του λιθίου στα διάφορα όργανα (Bond *et al.*, 1975). Με τον τρόπο αυτό παίρνουμε μια γενική εικόνα για το αν το λίθιο συσσωρεύεται ή όχι σε κάποια όργανα ή ιστούς. Μια καλύτερη εικόνα για την κατανομή του λιθίου μέσα στους ιστούς παίρνουμε βομβαρδίζοντας πολύ λεπτές τομές με θερμικά νετρόνια και ανιχνεύοντας τα προϊόντα της πυρηνικής αντίδρασης του λιθίου με τα νετρόνια (Thellier *et al.*, 1976; Nelson *et al.*, 1972). Και αυτή η μέθοδος ανιχνεύει το λίθιο *in vitro*. Μάλιστα η μέθοδος αυτή είναι πολύ πολύπλοκη και δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε ανθρώπους μια και απαιτούνται πολύ λεπτές τομές από τα διάφορα τμήματα του σώματος. Τέλος κάποιοι άλλοι ερευνητές (Glaros *et al.*, 1986; Vartsky *et al.*, 1985) επιχειρούν την *in vivo* ανίχνευση του λιθίου στα διάφορα όργανα χρησιμοποιώντας και αυτοί την πυρηνική αντίδραση με θερμικά νετρόνια. Η προσπάθεια αυτή είναι πολύ σημαντική γιατί ανιχνεύει *in vivo* το λίθιο και μπορεί να εφαρμοστεί και σε ανθρώπους. Παρόλα αυτά δεν παρέχει πληροφορίες για την κατανομή του λιθίου μέσα στα διάφορα τμήματα των οργάνων και των ιστών. Έτσι τα δεδομένα και τα στοιχεία από όλες τις παραπάνω μελέτες δεν επαρκούν για την εύρεση και την ερμηνεία του τρόπου δράσης του λιθίου.

Η παρούσα μελέτη επιδιώκει να βοηθήσει και να προσφέρει πληροφορίες χρήσιμες για την κατανόηση του μηχανισμού δράσης του λιθίου. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε η επίδραση του λιθίου στο κολλαγόνο. Επιλέχθηκε το κολλαγόνο γιατί είναι βασικό συστατικό των ιστών και των οργάνων του σώματος και γιατί υπάρχει σε όλους τους ιστούς και στα όργανα. Ο ρόλος του είναι πολύ σημαντικός μια και σκοπός του είναι να δώσει αντοχή και να διατηρήσει την ακεραιότητα της δομής των οργάνων του σώματος αλλά και του συνδετικού ιστού. Πιθανή λοιπόν βλάβη στο κολλαγόνο μπορεί να δημιουργήσει σημαντικά προβλήματα στα διάφορα όργανα του ανθρώπινου οργανισμού αλλά και στο συνδετικό ιστό που είναι πολύ σημαντικός για την τροφοδοσία και την ακεραιότητα των διαφόρων οργάνων.

Η μελέτη της επίδρασης του λιθίου στο κολλαγόνο έγινε χορηγώντας λίθιο με διάφορα δοσολογικά σχήματα σε πειραματόζωα (Swiss Albino mice) και μελετώντας σε διάφορους χρόνους μετά το τέλος





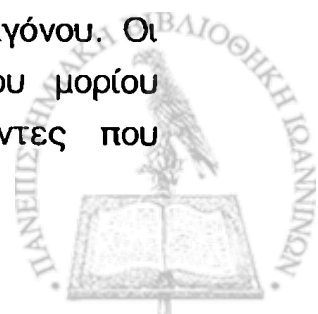
της αγωγής βιοψίες δέρματος από τα πειραματόζωα στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατή η ανίχνευση σε υπερμικροσκοπικό επίπεδο των πιθανών δομικών αλλοιώσεων στο κολλαγόνο που προκαλούνται από το λίθιο, η ερμηνεία και η αξιολόγηση των οποίων προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για τη δράση του λιθίου.

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζεται επίσης η ανάπτυξη μεθόδου για την εύρεση της κατανομής των φορτισμένων αμινοξέων κατά μήκος του άξονα των ινιδίων κολλαγόνου καθώς και για τη στατιστική σύγκριση δύο τέτοιων κατανομών από πειραματικά δεδομένα προερχόμενα από φυσιολογικό και μη φυσιολογικό κολλαγόνο, όπως επίσης και για τη σύγκριση πειραματικών και θεωρητικών αποτελεσμάτων. Η αξία της μεθόδου αυτής είναι ότι δεν μας παρέχει απλά στατιστικά αποτελέσματα αλλά μας δίνει τη δυνατότητα να εντοπίσουμε στο κολλαγόνο δομικές αλλοιώσεις σε υπερμικροσκοπικό επίπεδο προερχόμενες από διάφορους παράγοντες. Εφαρμογή της μεθόδου αυτής γίνεται στα πειραματόζωα στα οποία χορηγήθηκε λίθιο. Η τεχνική αυτή μπορεί να εφαρμοστεί σε κάθε ινώδη πρωτεΐνη και για κάθε είδος θεραπευτικής αγωγής. Στη συγκεκριμένη περίπτωση μπορούμε να εντοπίσουμε σε ποιο ακριβώς σημείο του ινιδίου ή ακόμα και του μορίου κολλαγόνου έχουμε ανωμαλίες προερχόμενες από το λίθιο. Οι πολύ σημαντικές αυτές πληροφορίες μπορεί να βοηθήσουν στην κατανόηση του μηχανισμού δράσης του λιθίου.

Η δομή της διατριβής αυτής διαμορφώνεται ως εξής:

Στο δεύτερο κεφάλαιο γίνεται μια ιστορική αναδρομή της χρήσης του λιθίου στην Ιατρική και αναφέρονται αναλυτικά οι θετικές και οι αρνητικές επιδράσεις του. Επίσης περιγράφονται οι προσπάθειες προηγούμενων ερευνητών για την εύρεση πληροφοριών που θα συνεισφέρουν στην κατανόηση του μηχανισμού δράσης του λιθίου. Οι προσπάθειες αυτές αφορούν μελέτες για την εύρεση της κατανομής του λιθίου στα διάφορα όργανα με διαφορετικές μεθόδους.

Στο τρίτο κεφάλαιο αναφέρονται χρήσιμες και απαραίτητες πληροφορίες για το μόριο κολλαγόνου και για τα ινίδια κολλαγόνου. Οι πληροφορίες αυτές αφορούν τη δομή και τη σύνθεση του μορίου κολλαγόνου καθώς και των ινιδίων του, τους παράγοντες που



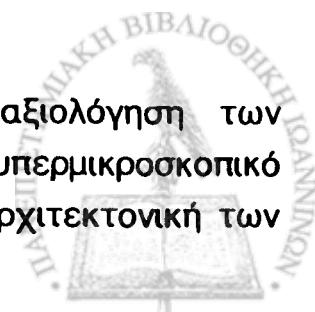
επηρεάζουν τη βιοσύνθεση του κολλαγόνου και το σχηματισμό των ινιδίων. Επίσης στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται η εικόνα εμφάνισης των ινιδίων κολλαγόνου στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, οι παράγοντες που επηρεάζουν την εικόνα αυτή, οι πληροφορίες που παίρνουμε από αυτήν κ.ά.

Στο τέταρτο κεφάλαιο περιγράφονται αναλυτικά τα πειράματα που έγιναν και ο τρόπος προετοιμασίας των δειγμάτων για την εξέτασή τους στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται επίσης ο τρόπος αξιολόγησης των ηλεκτρονικών μικρογραφιών για τη διεξαγωγή πληροφοριών χρήσιμων για τη μελέτη της δομής και της αρχιτεκτονικής των ινιδίων κολλαγόνου. Ακόμα αναφέρεται λεπτομερειακά η μορφομετρική ανάλυση που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις της διαμέτρου των ινιδίων. Τέλος περιγράφεται αναλυτικά η τεχνική που αναπτύχθηκε για την εύρεση της κατανομής των φορτισμένων αμινοξέων κατά μήκος του άξονα των ινιδίων κολλαγόνου καθώς και για τη στατιστική σύγκριση δύο τέτοιων κατανομών από πειραματικά δεδομένα προερχόμενα από φυσιολογικό και μη φυσιολογικό κολλαγόνο καθώς και για τη σύγκριση θεωρητικών και πειραματικών αποτελεσμάτων.

Στο πέμπτο κεφάλαιο περιγράφονται αναλυτικά οι επιδράσεις του λιθίου στο κολλαγόνο δέρματος των πειραματοζώων, όπως διαπιστώθηκαν κατά την εξέταση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο δειγμάτων από τα πειραματόζωα. Οι παρατηρήσεις που έγιναν σε υπερμικροσκοπικό επίπεδο αφορούν την δομή και την αρχιτεκτονική των ινιδίων κολλαγόνου. Επίσης στο κεφάλαιο αυτό αναφέρονται και τα αποτελέσματα από τη μορφομετρική ανάλυση που έγινε για κάθε ένα από τα πειράματα ξεχωριστά.

Στο έκτο κεφάλαιο περιγράφονται τα αποτελέσματα από την εφαρμογή της τεχνικής με την οποία βρίσκουμε και συγκρίνουμε την κατανομή των φορτισμένων αμινοξέων ή των φορτίων κατά μήκος του άξονα των ινιδίων κολλαγόνου από τα πειραματόζωα που δέχθηκαν λίθιο καθώς και από τους μάρτυρες.

Στο έβδομο κεφάλαιο γίνεται ανάλυση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την μελέτη σε υπερμικροσκοπικό επίπεδο της επίδρασης του λιθίου στη δομή και στην αρχιτεκτονική των



ινιδίων κολλαγόνου. Επίσης αναλύονται και αξιολογούνται τα αποτελέσματα από τη εφαρμογή της τεχνικής για την εύρεση και τη σύγκριση κατανομών φορτισμένων αμινοξέων κατά μήκος του άξονα των ινιδίων κολλαγόνου. Τέλος στο κεφάλαιο αυτό γίνεται συζήτηση και αναφέρονται διάφορες σκέψεις και απόψεις για την περαιτέρω συνέχιση της μελέτης αυτής.

Στη συνέχεια ακολουθεί η σχετική Βιβλιογραφία και οι Αναφορές.

Τέλος δίνονται αναλυτικά τα προγράμματα που αναπτύχθηκαν ειδικά για την πραγματοποίηση της εργασίας αυτής και αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της. Όλοι οι αλγόριθμοι που προτείνονται στην παρούσα εργασία έχουν κωδικοποιηθεί σε γλώσσα προγραμματισμού Pascal, που είναι μια πολύ διαδεδομένη γλώσσα προγραμματισμού στους μικροϋπολογιστές. Για την ανάπτυξη της τεχνικής εύρεσης της κατανομής των φορτισμένων αμινοξέων στα ινίδια χρησιμοποιήθηκε ένας 486 συμβατός υπολογιστής (PC) με μνήμη 4Mb και σκληρό δίσκο 100 Mb.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### ΤΟ ΛΙΘΙΟ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ

#### 2.1 Ιστορική αναδρομή της χρήσης του λιθίου στην ιατρική

Για πρώτη φορά αναφέρεται η ηρεμιστική επίδραση του λιθίου στον άνθρωπο από τον Έλληνα γιατρό Σεράνου Εφέσιο στη Ρωμαϊκή εποχή. Παρόλα αυτά, μόνο τα τελευταία χρόνια τα άλατα του λιθίου χρησιμοποιούνται στην ιατρική. Σήμερα το λίθιο χρησιμοποιείται κυρίως για την θεραπεία και την προφύλαξη διαφόρων ψυχικών ασθενειών, όπως των μανιακών και καταθλιπτικών διαταραχών.

Κατά τη διάρκεια του 18<sup>ου</sup> αιώνα το λίθιο χρησιμοποιείται σαν υπνωτικό, ενώ προς το τέλος του αιώνα χορηγείται και σε επιληπτικά άτομα. Μετά από πολλά χρόνια το 1949, για πρώτη φορά αναφέρεται ότι το λίθιο θεραπεύει τις μανιακές διαταραχές από τον Αυστραλό John Cade (Cade, 1949). Την ίδια εποχή στην Αμερική χρησιμοποιείται σαν υποκατάστατο άλατος και λαμβάνεται σε μεγάλες ποσότητες. Αποτέλεσμα της λήψης υπερβολικά μεγάλων δόσεων λιθίου είναι η εμφάνιση δυσμενών επιδράσεων, ακόμα και θάνατοι. Μετά από αυτό η χρήση του λιθίου περιορίζεται πάρα πολύ και όταν χρησιμοποιείται γίνονται συχνά έλεγχοι για το επίπεδο λιθίου στον ορό.

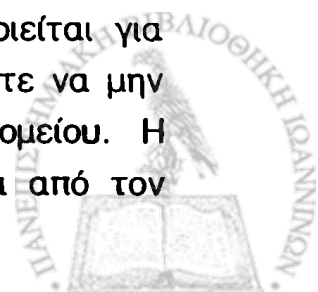
Παρά τον περιορισμό της χρήσης του λιθίου οι έρευνες για τη δράση του συνεχίζονται και τελικά αποδεικνύεται ότι το λίθιο θεραπεύει τις μανιακές διαταραχές. Έτσι το 1970 εγκρίνεται επίσημα πλέον από την "Food and Drug Administration" η χρήση του για τη θεραπεία και την προφύλαξη των μανιακών διαταραχών (Lydiard *et al.*, 1982). Υπολογίζεται ότι από την χρήση του λιθίου για τη θεραπεία και την προφύλαξη των μανιακών διαταραχών μειώθηκαν σημαντικά οι δαπάνες για την περίθαλψη των ασθενών αυτών, αφού συχνά αποφεύγεται η νοσοκομειακή περίθαλψή τους (Reifman *et al.*, 1980).

## 2.2 Χρήση του λιθίου στη σημερινή Ιατρική

Το λίθιο χορηγείται εκτεταμένα για τη θεραπεία των μανιακών διαταραχών (Cade, 1949; Schou, 1954; Maggs, 1963; Wharton and Fieve, 1966; Bunney, 1968; Noyes, 1969; Davis and Farm, 1971; Lewis and Winokur, 1982; Schou, 1986;). Αν και υπάρχουν και μερικά άλλα φάρμακα με θετικά αποτελέσματα στη θεραπεία των μανιακών διαταραχών (haloperidol, chlorpromazine) το λίθιο είναι ειδικά αντιμανιακό. Με άλλα λόγια, το λίθιο θεραπεύει άμεσα τις μανιακές διαταραχές σε αντίθεση με άλλα φάρμακα που χρησιμοποιούνται για παράδειγμα τα νευροληπτικά (neuroleptics), τα οποία δρουν απλά σαν ηρεμιστικά. Η ανάρρωση με το λίθιο είναι γρήγορη και οι ασθενείς το δέχονται εύκολα. Με τη χρήση του εμφανίζεται μια βελτίωση στον ασθενή σε τρεις με πέντε μέρες. Σε μερικές περιπτώσεις όπου υπάρχει ανάγκη να ελεγχούν άμεσα τα επεισόδια των μανιακών διαταραχών, χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τα νευροληπτικά (neuroleptics) στην αρχή της θεραπείας.

Εκτός όμως από τη θεραπεία των μανιακών διαταραχών το λίθιο εδώ και μερικά χρόνια χρησιμοποιείται και σαν αντικαταθλιπτικό. Βέβαια παλαιότερες μελέτες δεν μπορούν να αποδείξουν μια αντικαταθλιπτική επίδραση του λιθίου (Fieve *et al.*, 1968; Stokes *et al.*, 1971). Υπάρχουν όμως πολλές νεότερες μελέτες που δείχνουν ότι το λίθιο ασκεί θεραπευτική δράση στα καταθλιπτικά επεισόδια (Goodwin *et al.*, 1972; Mendels *et al.*, 1972; Noyers *et al.*, 1974; Johnson, 1974; Baron *et al.*, 1975; Mendels *et al.*, 1979; Worrall *et al.*, 1979; Khan, 1981). Συχνά το λίθιο χρησιμοποιείται μαζί με άλλα αντικαταθλιπτικά φάρμακα. Σε περιπτώσεις μάλιστα όπου με χρήση άλλων αντικαταθλιπτικών φαρμάκων η κατάθλιψη παραμένει ανίατη, όταν στη θεραπεία προστίθεται λίθιο παρουσιάζεται γρήγορα βελτίωση. Μερικοί ερευνητές υποστηρίζουν ότι το λίθιο ανταποκρίνεται καλύτερα στη διπολική μανιοκατάθλιψη από ότι στη μονοπολική κατάθλιψη (Schou, 1986).

Εκτός από τη θεραπεία το λίθιο χρησιμοποιείται και στην προφύλαξη από τις παραπάνω ασθένειες, δηλαδή χρησιμοποιείται για την πρόληψη των μανιακών και καταθλιπτικών επεισοδίων, ώστε να μην απαιτείται η θεραπεία του ασθενή εντός ή εκτός νοσοκομείου. Η προφυλακτική χρήση του λιθίου αναφέρεται για πρώτη φορά από τον



Hartigan το 1963 (Hartigan, 1963). Διατήρηση των δόσεων λιθίου βρέθηκε ότι προλαμβάνει την επανεμφάνιση των επεισοδίων στις μανιακές και καταθλιπτικές καταστάσεις. Πολλοί ευρευνητές έχουν επιβεβαιώσει αυτό το αποτέλεσμα (Schou and Baastrup, 1967; Zis and Goodwin, 1979; Prien *et al.*, 1973, 1984; Souza and Goodwin, 1991) και υποστηρίζουν ότι η χρήση του λιθίου έχει σαν αποτέλεσμα σε πολλούς ασθενείς τη μείωση της συχνότητας εμφάνισης των επεισοδίων, ενώ σε άλλους τη μείωση της έντασης και της διάρκειας των επεισοδίων. Επίσης σε πολλές περιπτώσεις αναφέρεται και μείωση στη συχνότητα εμφάνισης των επεισοδίων καθώς και μείωση στην ένταση και στη διάρκειά τους.

Τέλος το λίθιο χρησιμοποιείται και σε άλλες παθολογικές καταστάσεις, όπως καταστάσεις που έχουν σχέση με την ψυχική διάθεση ή καταστάσεις με επεισόδια που εμφανίζονται περιοδικά. Σε αυτές περιλαμβάνονται η σχιζοφρένεια (Sautteur *et al.*, 1992; Schou, 1986), ο αλκοολισμός (Kresyun *et al.*, 1991; Daisley and Hutchinson, 1992) και άλλες. Επίσης θεραπευτικές ιδιότητες έχουν εντοπισθεί και σε άτομα που παρουσιάζουν χαρακτηριστικά βιαιότητας και επιθετικότητας (Turin, 1973).



### 2.3 Παρενέργειες από τη χρήση του λιθίου

Το λίθιο εκτός από τις θετικές του επιδράσεις προκαλεί και παρενέργειες σε διάφορα όργανα του ανθρώπινου οργανισμού.

Οι παρενέργειες που εμφανίζονται σε σύντομο χρονικό διάστημα εντοπίζονται:

Στο γαστρεντερικό σύστημα: ναυτία, εμετός,

διάρροια, κοιλιακός πόνος (Muniz *et al.*, 1978; Lydiard *et al.*, 1982, Paragas, 1984; Vestergaard *et al.*, 1988)

Στο νευρομυϊκό σύστημα: τρόμος χεριών,

μυϊκή αδυναμία (Kropf *et al.*, 1979; Karnoil *et al.*, 1978;

Jarrett *et al.*, 1975; Vestergaard *et al.*, 1988).

Στο κεντρικό νευρικό σύστημα: πονοκέφαλος,

νωθρότητα (Lydiard *et al.*, 1982).

Στα νεφρά: πολυδιψία, πολουρία (Corpen *et al.*, 1980;

Neu *et al.*, 1979; Bakris *et al.*, 1981; Ottosen *et al.*, 1984;

Singer *et al.*, 1981)

Στο θυροειδή (Jefferson *et al.*, 1979; Birnbaum *et al.*,

1988; Lydiard *et al.*, 1982)

Στο καρδιαγγειακό σύστημα (Lydiard *et al.*, 1982; Paragas, 1984)

Μερικές παρενέργειες μπορεί να εμφανιστούν σε σύντομο χρονικό διάστημα από την αρχή της θεραπείας αλλά μπορεί να εμφανιστούν και αρκετά αργότερα, όπως:

Δερματικές αλλοιώσεις (Lydiard, *et al.*, 1982; Paragas, 1984;

Deandrea *et al.*, 1982)

Αύξηση του βάρους του ασθενή (Vestergaard *et al.*, 1988;

Mellerup and Plenge, 1990)

Πολουρία και πολυδιψία (Mellerup and Plenge, 1990)

Τρόμος χεριών (Vestergaard *et al.*, 1988;

Mellerup and Plenge, 1990).

Οστεοπόρωση (Glaros *et al.*, 1986)

Οι βραχυπρόθεσμες επιπλοκές του λιθίου συνήθως δεν εξαρτώνται από τη δόση. Η έντασή τους όμως εξαρτάται από τη δόση.



Αξιοσημείωτο είναι ότι στους περισσότερους από τους ασθενείς που λαμβάνουν λίθιο εμφανίζονται παρενέργειες. Συνήθως δεν είναι αρκετά σοβαρές ώστε να απαιτείται διακοπή του λιθίου. Επίσης οι παρενέργειες τις περισσότερες φορές είναι αναστρέψιμες όταν σταματήσει η χορήγηση του λιθίου. Οι πιο σοβαρές παρενέργειες συμβαίνουν κατά την διάρκεια των δύο πρώτων εβδομάδων.

### 2.3.1 Παρενέργειες από την τοξικότητα του λιθίου

Όταν η δόση του λιθίου γίνει πολύ μεγάλη εμφανίζονται παρενέργειες που οφείλονται στην τοξικότητά του. Αρχικά εμφανίζονται έντονες οι προαναφερόμενες παρενέργειες όπως: ναυτία, εμετός, διάρροια, σύγχυση, αστάθεια στο βάδισμα, τρεμούλα στα χέρια. Το λίθιο ερεθίζει βασικά το κεντρικό νευρικό σύστημα και αλλοιώνει το ηλεκτροεγκεφαλογράφημα. Επίσης επιδρά στους μυς (Tilkian *et al.*, 1976; Lydiard *et al.*, 1982). Ο ασθενής στη συνέχεια εμφανίζει σπαστικούς παροξυσμούς, επέρχεται σε σύγχυση, τότε παραληρεί, πέφτει σε λήθαργο και τελικά σε κώμα.

Όπως φαίνεται οι παρενέργειες αυτές εξαρτώνται από τη δόση και δεν εμφανίζονται αμέσως. Συνήθως συμβαίνουν 4 με 5 μέρες μετά την πρώτη δόση. Δεν υπάρχει κάποια συγκεκριμένη θεραπεία γι' αυτές. Το βασικότερο είναι η αποβολή των ιόντων λιθίου από το σώμα. Ο χρόνος ημιζωής του λιθίου είναι 24 ώρες, το οποίο σημαίνει ότι το μισό από το λίθιο του σώματος θα έχει αποβληθεί σε περίπου 24 ώρες.





### 2.3.2 Παρενέργειες που δεν εξαρτώνται από τη δόση

Οι περισσότεροι από τους ασθενείς που παίρνουν λίθιο εμφανίζουν παρενέργειες που δεν εξαρτώνται από τη δόση. Τέτοιες είναι: υποθυροειδισμός, πολυουρία, πολυδιψία, νευροτοξικές αλλοιώσεις, λευκοκύττωση και δερματικές αλλοιώσεις. Πολλές από τις αλλοιώσεις αυτές είναι αναστρέψιμες όταν ο ασθενής σταματήσει να παίρνει λίθιο όπως η πολυουρία, η πολυδιψία, η λευκοκύττωση και οι νευροτοξικές αλλοιώσεις.

Από πειράματα που έγιναν σε διάφορα ζώα διαπιστώθηκε ότι το λίθιο επιδρά επίσης στη γονιμότητα, στην κύηση και στη ανάπτυξη του εμβρύου (Weinstein *et al.*, 1971; Schou *et al.*, 1973a; Schou *et al.*, 1973b; Lydiard *et al.*, 1982).



## 2.4 Δερματικές αλλοιώσεις από τη χρήση του λιθίου

Από τη χρήση του λιθίου εμφανίζονται όπως έχει ήδη αναφερθεί αλλοιώσεις στο δέρμα. Τέτοιες αλλοιώσεις είναι: κηλιδοβλατιδώδη εξανθήματα, εξανθήματα με μορφή ακμής, θυλακιώδη εξανθήματα, ψωρίαση και άλλες εκδηλώσεις (Deandrea *et al.*, 1982; Sarantidis and Waters, 1983).

Τα κηλιδοβλατιδώδη εξανθήματα μπορεί να εμφανιστούν σε μερικές μέρες ή και σε μερικές εβδομάδες από την αρχή της θεραπείας με λίθιο. Συνήθως είναι γενικευμένα, δηλαδή παρουσιάζονται σε ολόκληρο το σώμα, και συχνά συνοδεύονται από φαγούρα. Τα εξανθήματα αυτά υποχωρούν μετά την μείωση της δόσης ή μετά την διακοπή της θεραπείας με λίθιο (Callaway *et al.*, 1968; O'Connell, 1971; Posey, 1972; Meinhold *et al.*, 1980).

Τα εξανθήματα με μορφή ακμής μπορεί να εμφανιστούν σε μερικές μέρες ή και σε μερικούς μήνες από την πρώτη δόση με λίθιο. Αυτά τα εξανθήματα μπορεί να βρίσκονται είτε σε ολόκληρο το σώμα είτε να είναι εντοπισμένα σε ορισμένες περιοχές του σώματος. Είναι επίμονα και μπορεί να παραμείνουν αρκετό χρόνο ακόμα και 2 χρόνια, μετά την διακοπή της θεραπείας. Η εμφάνισή τους δημιουργεί έντονο πρόβλημα και συχνά οδηγεί στην διακοπή της θεραπείας με λίθιο (Hitch, 1967; Kusumi, 1971; Ruiz-Maldonado *et al.*, 1973; Yoder, 1975; Okrasinski, 1977; Reiffers and Dick 1977; Aldoroty and Le Vine 1980).

Τα θυλακιώδη εξανθήματα παρουσιάζονται συνήθως μετά από μερικούς μήνες λήψης του λιθίου. Λόγω της μορφής των συμπτωμάτων αυτών καθώς και της περιορισμένης κατανομής τους η ύπαρξή τους συνήθως δεν οδηγεί σε διακοπή της θεραπευτικής αγωγής (Rifkin *et al.*, 1973; Kurtin, 1973).

Σε άτομα που έχουν μια προΐστορία στη ψωρίαση το λίθιο προκαλεί επιδείνωση της ασθένειας αυτής. Η επιδείνωση εκδηλώνεται από μερικές μέρες μέχρι και μερικούς μήνες μετά την αρχική χορήγηση του λιθίου. Συχνά έχουν αναφερθεί περιπτώσεις εμφάνισης ψωρίασης σε ασθενείς που δεν έχουν καμία προΐστορία σ'αυτήν. Στις περιπτώσεις αυτές η ψωρίαση εκδηλώνεται από μερικούς μήνες μέχρι και μερικά χρόνια μετά

την αρχή της θεραπείας. Η εκδήλωση ψωρίασης δημιουργεί σοβαρό πρόβλημα με αποτέλεσμα να είναι αναγκαία η διακοπή της χορήγησης λιθίου. Όμως σε μερικές περιπτώσεις η ψωρίαση παραμένει ακόμα και μετά την διακοπή του λιθίου (Carter 1972; Skott *et al.*, 1977; Lowe and Rigway, 1978; Skoven and Thormann, 1979; Lazarus and Gilgor, 1979; Gupta *et al.*, 1987; Skerritt, 1987; Sasaki *et al.*, 1989).

Το λίθιο προκαλεί και άλλες δερματολογικές αλλοιώσεις όπως γενικευμένο κνησμό (Kuhley and Granoff, 1979; Reiffers and Dick, 1977), ιώδες αποχρωματισμό του δέρματος (Kuhley and Granoff, 1979), αποφολιδωτική δερματίτιδα (Kuhley and Granoff, 1979), ερύθημα (Reiffers and Dick, 1977; Balldin *et al.*, 1991), γυροειδή αλωπεκία (Vesregaard *et al.*, 1980; Silvestri *et al.*, 1988) και σκληρότητα του δέρματος (Hoxtell and Dahl, 1975). Οι παρενέργειες αυτές εκδηλώνονται σε μερικές μέρες ή και σε μερικούς μήνες από την αρχή της θεραπείας και συνήθως δεν είναι τόσο έντονες ώστε να απαιτείται διακοπή του λιθίου .



## 2.5 Κατανομή του λιθίου στο σώμα

Αν και το λίθιο χρησιμοποιείται από χρόνια στην ψυχιατρική και είναι γνωστές οι θεραπευτικές του ιδιότητες στην μανία και στην κατάθλιψη, ο ακριβής μηχανισμός της δράσης του δεν είναι ακόμα γνωστός. Αυτό συμβαίνει γιατί το λίθιο είναι πολύ δύσκολο να ανιχνευτεί αφού είναι ένα πολύ ελαφρύ στοιχείο και δεν έχει χαρακτηριστικό ραδιονουκλεΐδιο.

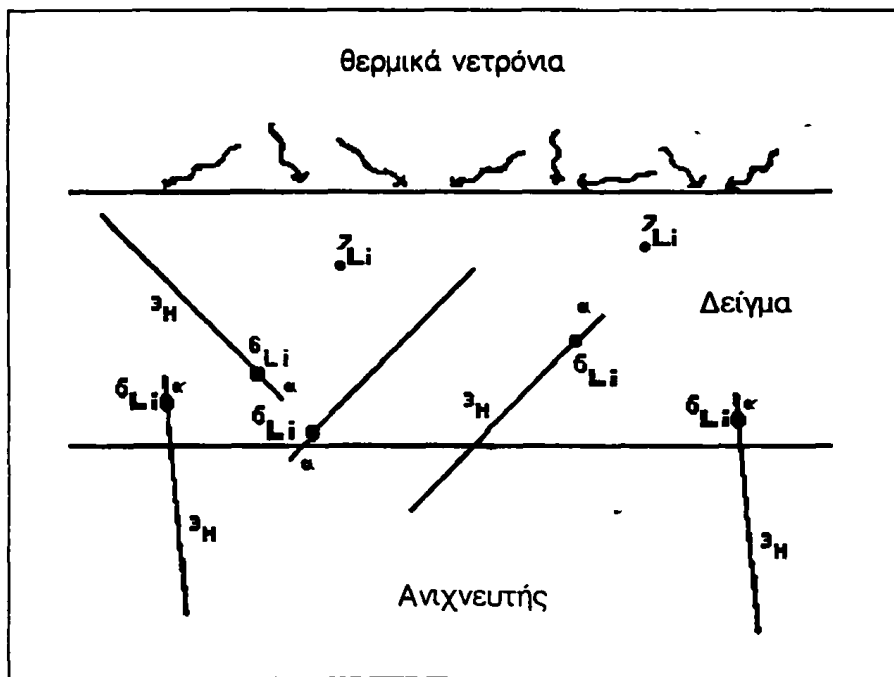
Πολλοί ευρευνητές προσπάθησαν να ανιχνεύσουν το λίθιο *in vitro* χρησιμοποιώντας διάφορες μεθόδους όπως φλογοφωτομετρία, ατομική απορρόφηση ή πυρηνική αντίδραση με θερμικά νετρόνια. Άλλοι ερευνητές προσπάθησαν να το ανιχνεύσουν *in vivo* χρησιμοποιώντας την πυρηνική αντίδραση με θερμικά νετρόνια.

### 2.5.1 *In vitro* εύρεση της κατανομής του λιθίου στο σώμα

Στην προσπάθεια εύρεσης του μηχανισμού δράσης του λιθίου έγιναν διάφορες μελέτες όσον αφορά την κατανομή του λιθίου σε διάφορα όργανα χρησιμοποιώντας ατομική απορρόφηση ή φλογοφωτομετρία (flame spectrophotometry) (Schou, 1958; Frazer *et al.*, 1972; Birch *et al.*, 1972; Davis *et al.*, 1971; Ebadi *et al.*, 1974; Groth *et al.*, 1974; Neu *et al.*, 1975; Bond *et al.*, 1975; Edelfors, 1975; Sims *et al.*, 1978; Man, 1979; Pickett and Hawkins, 1981; Lippmann *et al.*, 1981). Ωστόσο δεν δίνουν την ακριβή θέση των ιόντων λιθίου μέσα στους ιστούς.

Το 1972 οι Nelson *et al.* και το 1976 οι Thellier *et al.* προτείνουν μια διαφορετική μέθοδο ανίχνευσης του λιθίου *in vitro*. Η μέθοδος στηρίζεται στην πυρηνική αντίδραση του  ${}^6\text{Li}$  με θερμικά νετρόνια. Το λίθιο στη φύση βρίσκεται σε δύο ισότοπα, το  ${}^6\text{Li}$  και  ${}^7\text{Li}$ , με σχετική αναλογία 7.4% για το ισότοπο 6 και 92.6% για το ισότοπο 7 (Thellier *et al.* 1976). Η πιθανότητα το  ${}^7\text{Li}$  να αντιδράσει με θερμικά νετρόνια είναι αμελητέα, ενώ το  ${}^6\text{Li}$  έχει μεγάλη πιθανότητα ( $\sigma = 945$  barn). Η πυρηνική αυτή αντίδραση είναι η  ${}^6\text{Li}(n,\alpha)$  T και δίνει ένα άτομο ηλίου (ή σωματίδιο  $\alpha$ ) και ένα άτομο τριτίου.

Μια πολύ λεπτή τομή από πειραματόζωο που δέχθηκε θεραπεία με λίθιο ακτινοβολείται με θερμικά νετρόνια, όπως φαίνεται στο σχήμα 2.1. Τα νετρόνια αντιδρούν με το  ${}^6\text{Li}$  της τομής. Τα προϊόντα της αντίδρασης αυτής, το σωματίδιο α και το τρίτιο, αλληλεπιδρούν με ειδικό



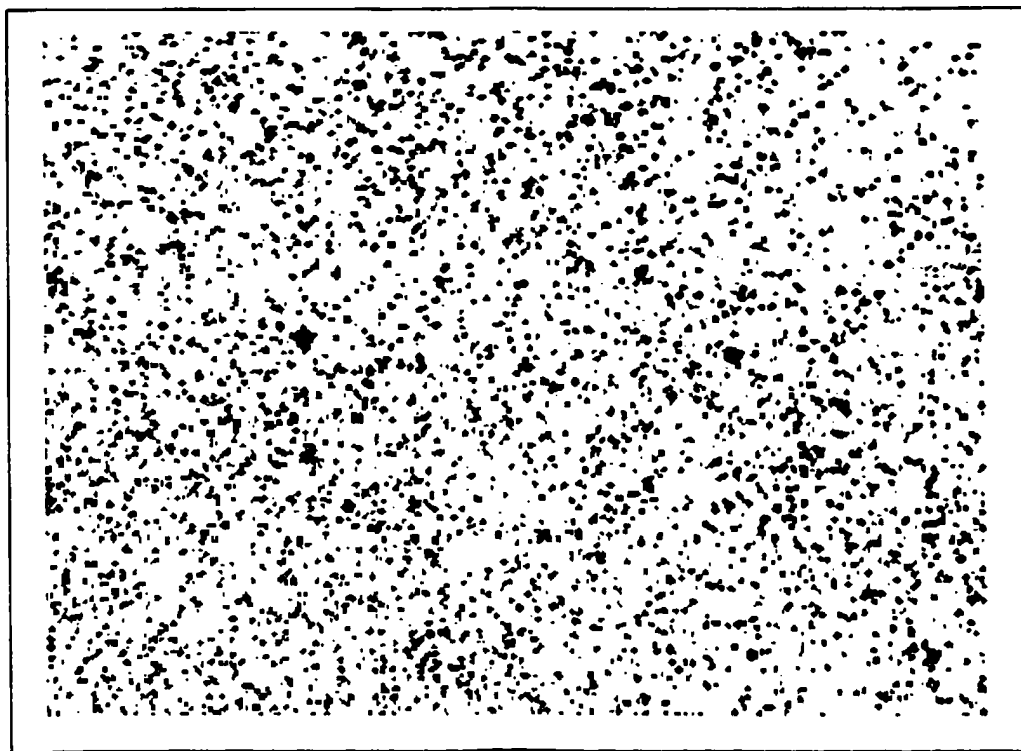
Σχήμα 2.1: Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου για την εύρεση της κατανομής του λιθίου σε τομές.

ανιχνευτή (cellulose nitrate detector) που βρίσκεται σε καλή επαφή με το δείγμα και δημιουργούν ίχνη (tracks) πάνω του. Μετά την εμφάνιση του ανιχνευτή σε NaOH στη θέση των ιχνών δημιουργούνται οπές, όπως φαίνεται στο σχήμα 2.2, η καταμέτρηση των οποίων δίνει πληροφορίες για την ποσότητα  ${}^6\text{Li}$  στην ακτινοβολούμενη τομή. Με την μέθοδο αυτή σε αντίθεση με τις προηγούμενες μεθόδους είναι δυνατή η εύρεση της κατανομής του λιθίου μέσα στους διάφορους ιστούς και όργανα.

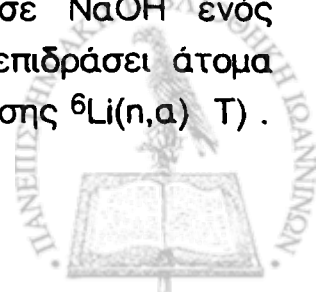


Με τον τρόπο αυτό οι Thellier *et al.* (1976) παρατηρούν σε τομές πειραματοζώων (επίμους) που είχαν δεχθεί λίθιο μεγαλύτερη συγκέντρωση λιθίου στην υπόφυση, στους σιελογόνους αδένες, στην κύστη, στα νεφρά, στο έντερο και σε μερικά σημεία στον εγκέφαλο. Στο σκώτι ωστόσο η συγκέντρωση του λιθίου είναι χαμηλή.

Αργότερα οι Wissocq *et al.* (1979) χρησιμοποιώντας την ίδια μέθοδο ερευνούν την κατανομή του λιθίου σε τομές εγκεφάλου από επίμους (mice). Οι Nelson *et al.*, το 1979, Thellier *et al.*, το 1980a και Thellier *et al.*, το 1980b βελτιώνουν την μέθοδο και εξετάζουν την κατανομή του λιθίου στον εγκέφαλο πειραματοζώων που είχαν δεχθεί αγωγή με λίθιο. Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρείται μια ανομοιογένεια στην κατανομή του λιθίου στον εγκέφαλο.



Σχήμα 2.2: Μικροφωτογραφία μετά από εμφάνιση σε NaOH ενός ανιχνευτή cellulose nitrate με τον οποίο έχουν αλληλεπιδράσει άτομα τριτίου και σωματίδια α (προϊόντα της πυρηνικής αντίδρασης  ${}^6\text{Li}(n,\alpha)\text{T}$ ).



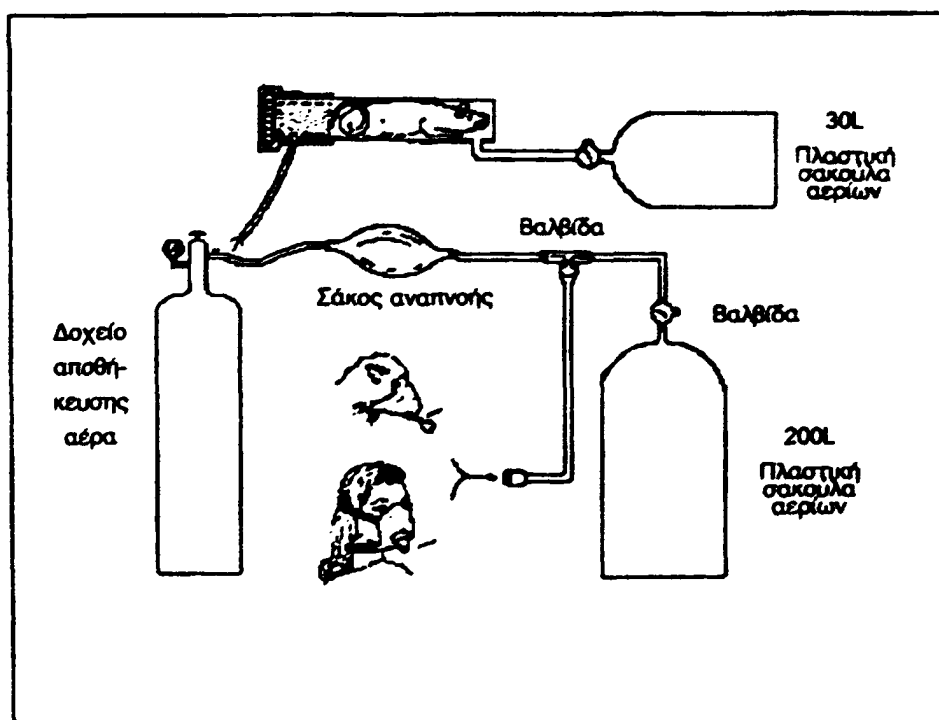
Το 1985 οι *Wissocq et al.*, προσπαθώντας να ερμηνεύσουν την προκαλούμενη από το λίθιο τερατογένεση, εξετάζουν την κατανομή του λιθίου σε έμβρυα ποντικών (*mice*) όταν γίνεται χορήγηση του στοιχείου αυτού στη μητέρα τους. Παρατηρούν μεγάλη συγκέντρωση λιθίου στους εξωμεσοδερμικούς ιστούς και μικρότερη συγκέντρωση στους ενδοδερμικούς. Επίσης στον εγκέφαλο των εμβρύων παρατηρείται ομοιόμορφη κατανομή λιθίου σε αντίθεση με την κατανομή του λιθίου στον εγκέφαλο της μητέρας τους όπου παρατηρείται ανομοιογένεια.

Τέλος το 1986 οι *Heurteaux et al.* βρίσκουν την κατανομή του λιθίου στον εγκέφαλο ειδικά μεταλλαγμένων ποντικών ("Quaking" *dysmyelinating mutants*) στα οποία χορηγείται λίθιο και τη συγκρίνουν με αυτή από φυσιολογικά ποντίκια που δέχθηκαν αντίστοιχες ποσότητες λιθίου. Παρατηρήθηκε υψηλή συγκέντρωση λιθίου στον εγκέφαλο των μεταλλαγμένων ποντικών με σχεδόν ομοιόμορφη κατανομή σε αντίθεση με τα φυσιολογικά ποντίκια όπου υπήρχαν περιοχές με μεγάλη συγκέντρωση λιθίου και περιοχές με μικρή συγκέντρωση.



## 2.5.2 In vivo εύρεση της κατανομής του λιθίου στο σώμα

Οι Vartsky *et al.* το 1985 και Glaros *et al.* 1986 προτείνουν μια μέθοδο για τον in vivo προσδιορισμό του λιθίου. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην πυρηνική αντίδραση του  ${}^6\text{Li}$  με θερμικά νετρόνια. Αν το σώμα ή μέρος του σώματος ακτινοβοληθεί με θερμικά νετρόνια παράγεται τρίτιο (T) διαμέσου της αντίδρασης  ${}^6\text{Li}(n,\alpha)\text{T}$ . Το προϊόν αυτό είναι ραδιενεργό και εκπέμπει β ακτινοβολία με μέγιστη ενέργεια 18,6 KeV και χρόνο υποδιπλασιασμού 12,33 έτη. Ένα μέρος του παραγόμενου τριτίου εκπνέεται από τους πνεύμονες με τη μορφή HT, συλλέγεται και διαχωρίζεται από τα άλλα αέρια που βρίσκονται στον

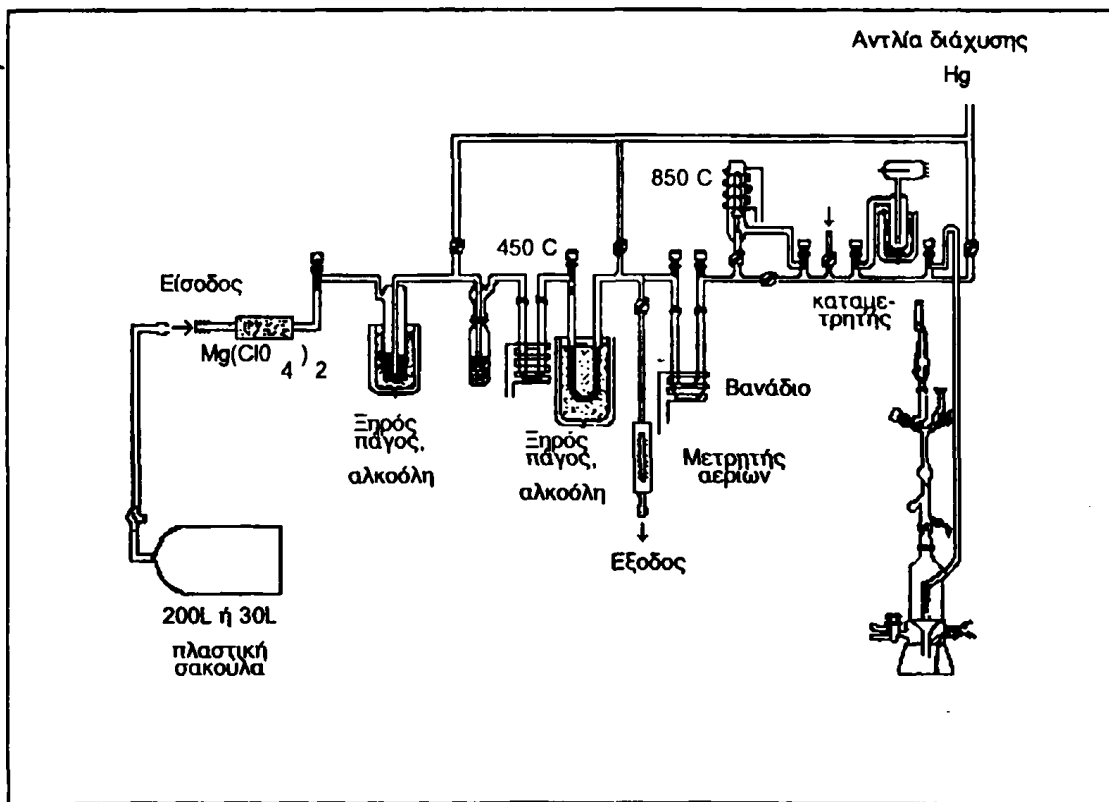


Σχήμα 2.3: Σύστημα συλλογής του εκπνεόμενου αέρα κατά την in vivo ανίχνευση του λιθίου στο σώμα ανθρώπων, προβάτων ή ποντικών (Glaros *et al.*, 1985).





εκπνεόμενο αέρα (βλέπε σχήματα 2.3 και 2.4 για τον τρόπο συλλογής και διαχωρισμού του εκπνεόμενου αερίου). Η ραδιενέργεια του συλλεγμένου αερίου ΗΤ μετράται με έναν μετρητή β ακτινοβολίας μεγάλης ευαισθησίας. Ακτινοβολώντας λοιπόν ένα τμήμα του σώματος με θερμικά νετρόνια και μετρώντας στη συνέχεια την ραδιενέργεια του αερίου ΗΤ που βρίσκεται στον εκπνεόμενο αέρα υπολογίζεται η ποσότητα λιθίου στο τμήμα αυτό του σώματος.



Σχήμα 2.4: Σύστημα διαχωρισμού του αερίου ΗΤ από τα υπόλοιπα αέρια του εκπνεόμενου αέρα κατά την *in vivo* μέτρηση του λιθίου στο σώμα (Glaros *et al.*, 1985).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### ΚΟΛΛΑΓΟΝΟ

#### 3.1 Εισαγωγή

Ο μηχανισμός δράσης του λιθίου στο δέρμα και στα διάφορα όργανα του σώματος είναι ακόμη σκοτεινός. Στην προσπάθεια να δοθούν κάποιες απαντήσεις σε ορισμένα ερωτήματα που αφορούν τη δράση του λιθίου μελετήθηκε το κολλαγόνο επειδή είναι βασικό συστατικό των ιστών και των οργάνων του σώματος.

Το κολλαγόνο είναι ένα βασικό δομικό μακρομόριο διαφόρων ιστών και οργάνων του σώματος. Μερικά όργανα όπως το συκώτι περιέχουν λίγο κολλαγόνο ενώ σε άλλα το κολλαγόνο υπάρχει σε μεγάλες ποσότητες. Για παράδειγμα στο δέρμα, στον κερατοειδή χιτώνα και στους τένοντες το κολλαγόνο αποτελεί την κύρια συνιστώσα. Το κολλαγόνο υπάρχει σε όλα τα σπονδυλωτά και γενικά σε όλα τα πολυκύτταρα ζώα. Στον άνθρωπο αποτελεί το 25% του βάρους των πρωτεϊνών.

Ο κύριος ρόλος του είναι να δώσει αντοχή και να διατηρήσει την ακεραιότητα της δομής του συνδετικού ιστού και των οργάνων του σώματος. Στο συνδετικό ιστό βρίσκεται όχι σαν ένα απομονωμένο μόριο αλλά σαν ένα συστατικό του πολύπλοκου συστήματος του ιστού που περιλαμβάνει και διάφορα άλλα μακρομόρια όπως ελαστίνη, γλυκοπρωτεΐνες και γλυκολιπίδια.



### 3.2 Μοριακή δομή του κολλαγόνου

Το μόριο του κολλαγόνου αποτελείται από τρεις παράλληλες πολυπεπτιδικές αλυσίδες (α αλυσίδες) που εκτείνονται σε όλο το μήκος του μορίου και έχουν τα αμινοτελικά τους άκρα στην ίδια πλευρά (σχήμα 3.1) (Piez, 1967). Οι τρεις αλυσίδες ελίσσονται μεταξύ τους με τη μορφή τριπλής έλικας. Έτσι σχηματίζεται ένα μόριο που μοιάζει με ράβδο. Στους ιστούς και στα όργανα υπάρχει κολλαγόνο το οποίο κατατάσσεται

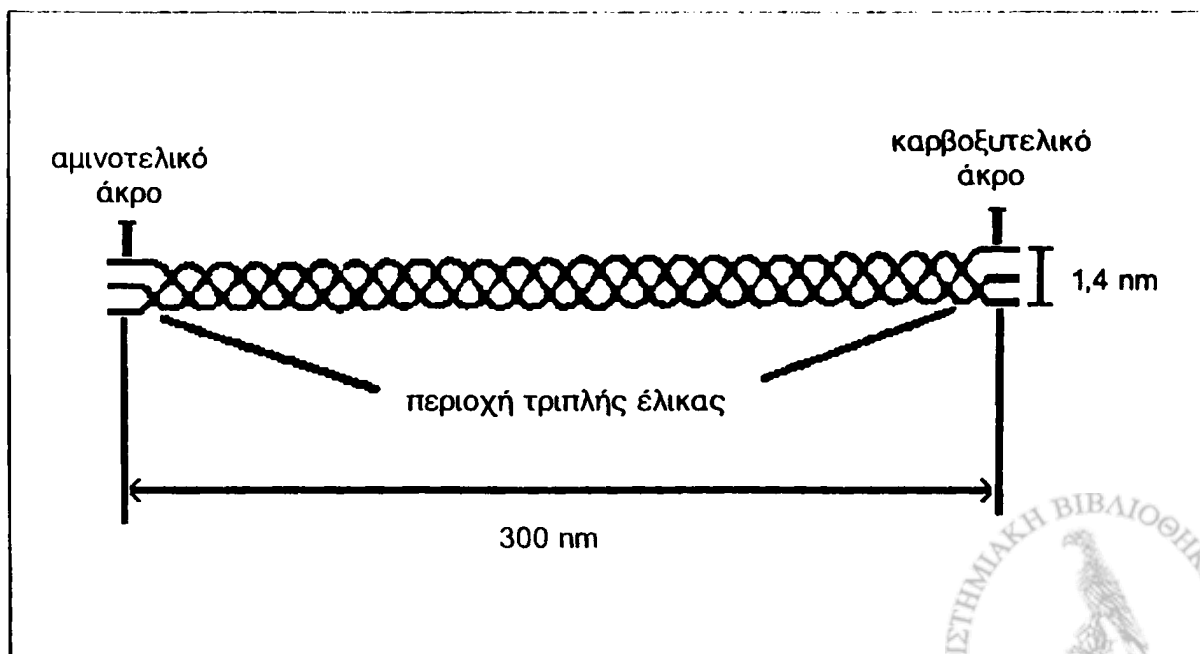
Πίνακας 3.1: Η ποσοστιαία (%) αναλογία των πέντε πιο συνηθισμένων τύπων κολλαγόνου σε διάφορους ιστούς (Hukins, 1984).

Ιστός	I	II	III	IV	V
Δέρμα	80 - 85		10 - 15		
Τένοντες	100				
Οστά	100				
Πνεύμονες	60		30	5	5
Συκώτι	30 - 35		30 - 40		7 - 10
Νεύρα	81		19		1
Αορτή	67		33		
Βασική μεμβράνη οφθαλμού				100	
Κερατοειδής χιτώνας οφθαλμού	91		2		
Χόνδροι		85			
Ινωση	40	60			



σε διάφορους τύπους από τους οποίους οι πιο συνηθισμένοι είναι πέντε: ο τύπος I, II, III, IV και ο τύπος V. Η κατανομή των τύπων αυτών στο σώμα καθώς και η ποσοστιαία αναλογία τους στους διάφορους ιστούς φαίνεται στον πίνακα 3.1. Ο τύπος που έχει μελετηθεί περισσότερο είναι ο τύπος I που είναι και το κύριο συστατικό του δέρματος, των τενόντων και των οστών.

Μόρια κολλαγόνου τύπου I έχουν μήκος λίγο μικρότερο από 300 nm και διάμετρο περίπου 1,4 nm. Οι τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες που σχηματίζουν τη ράβδο αποτελούνται περίπου από 1000 αμινοξέα. Λεπτομέρειες για την τρισδιάστατη μορφή του μορίου παίρνουμε από την μελέτη της περίθλασης ακτίνων -X (Ramachandran and Ramakrishnam, 1976). Από τη μελέτη αυτή βρέθηκε ότι η μέση αξονική απόσταση μεταξύ δυο διαδοχικών αμινοξέων σε κάθε αλυσίδα είναι 0,29nm (Ramachandran and Ramakrishnam, 1976). Η εικόνα περίθλασης ακτίνων -X δεν είναι εντελώς καθαρή αλλά εμφανίζει διάχυση. Αυτό δηλώνει ότι το διάστημα μεταξύ δυο διαδοχικών αμινοξέων δεν είναι σταθερό και μπορεί να μεταβάλλεται λίγο κατά μήκος του άξονα του μορίου. Είναι επίσης γνωστό ότι σε κάθε περίοδο D ( $D=67\text{nm}$  σε τένοντες από την ουρά ποντικού) υπάρχουν 234 αμινοξέα (Hofmann *et al.*, 1978; Meek *et al.*, 1979). Άρα η μέση τιμή της απόστασης μεταξύ δυο διαδοχικών αμινοξέων υπολογίζεται σε 0,286nm.



Σχήμα 3.1: Διαγραμματική παράσταση του μορίου κολλαγόνου.

### 3.3 Η αλληλουχία των αμινοξέων στο μόριο του κολλαγόνου

Στο κολλαγόνο τύπου I οι τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες που σχηματίζουν το μόριο δεν είναι όμοιες. Υπάρχουν δύο απaráλλακτες αλυσίδες οι α1(I) και μία α2(I) αλυσίδα που έχει διαφορετική αλληλουχία αμινοξέων (Traub and Piez, 1971). Στους άλλους τύπους κολλαγόνου το μόριο περιλαμβάνει συνήθως τρεις απόλυτα ίδιες α-αλυσίδες που είναι χαρακτηριστικές για τον κάθε τύπο. Όμως ο τύπος V μπορεί να περιέχει και δυο διαφορετικές αλυσίδες (Bornstein and Byers, 1980). Η μοριακή δομή των πέντε πιο συνηθισμένων τύπων κολλαγόνου φαίνεται στον πίνακα 3.2.

Η αλληλουχία των αμινοξέων του κολλαγόνου μελετάται εκτεταμένα τα τελευταία χρόνια. Στις αλυσίδες α1(I) και α2(I) γνωρίζουμε καλά την αλληλουχία των αμινοξέων (Fietzek and Kühn, 1976). Η αλυσίδα α1(I) από κολλαγόνο δέρματος μόσχου περιέχει 1055 αμινοξέα. Στην περιοχή της τριπλής έλικας υπάρχουν 1014 αμινοξέα που επαναλαμβάνονται με τη μορφή Gly-X-Y. Στο αμινοτελικό άκρο υπάρχουν 16 αμινοξέα και στο καρβοξυτελικό 25. Στην α2(I) όμως αλυσίδα τα αμινοξέα τόσο στο αμινοτελικό όσο και στο καρβοξυτελικό της άκρο είναι λιγότερα. Η αλυσίδα αυτή περιέχει συνολικά 1029 αμινοξέα.

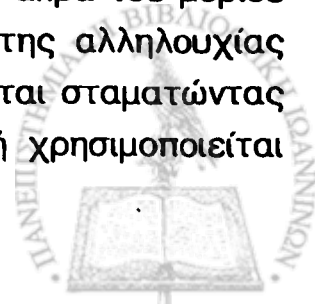
Ο προσδιορισμός της σειράς των αμινοξέων στο κολλαγόνο είναι δύσκολος και κουραστικός εξαιτίας του μεγάλου μήκους των α-αλυσίδων. Οι α-αλυσίδες έχουν μήκος διπλάσιο ή τριπλάσιο από το συνηθισμένο μήκος των άλλων πρωτεϊνών. Ο προσδιορισμός των αμινοξέων γίνεται πιο εύκολα διαχωρίζοντας τις τρεις αλυσίδες του μορίου. Στη συνέχεια στις απομονωμένες α-αλυσίδες γίνεται ο προσδιορισμός της σειράς των αμινοξέων. Στον προσδιορισμό της αλληλουχίας των αμινοξέων οι πιο εποικοδομητικές μελέτες ήταν εκείνες που χρησιμοποίησαν βρωμιούχο κυάνιο (Gross and Witkop, 1961), ή υδροξυλαμίνη (Bornstein 1970) ή ορισμένα ένζυμα όπως πεψίνη (Wendt *et al.* 1972) για να διασπάσουν τις αλυσίδες σε τεμάχια.



Πίνακας 3.2: Μοριακή δομή των πέντε πιο συνηθισμένων τύπων κολλαγόνου.

Τύπος κολλαγόνου	Μοριακή δομή
I	$[α1(I)]_2 α2(I)$
II	$[α1(II)]_3$
III	$[α1(III)]_3$
IV	$[α1(IV)]_3$
V	$[αB]_3$ $[αB]_2 αA$

Ο διαχωρισμός των αλυσίδων με βρωμιούχο κυάνιο χρησιμοποιήθηκε πρώτα στο κολλαγόνο από τους Bornstein και Piez (Bornstein and Piez, 1966). Το βρωμιούχο κυάνιο σπάει τους δεμούς στα μεθιομένα αμινοξέα. Η υδροξυλαμίνη χωρίζει, σε αλκαλικό pH, το δεσμό μεταξύ του ασπαραγινικού (asparagine) αμινοξέος και της γλυκίνης (glycine) (Bornstein, 1969; Butler, 1969; Bornstein and Balian, 1970). Ο διαχωρισμός του μορίου του κολλαγόνου χρησιμοποιώντας διάφορα ένζυμα, για παράδειγμα πεψίνη, συνήθως αρχίζει από τα άκρα του μορίου και προχωράει προς το κέντρο. Για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των αμινοξέων χρησιμοποιούνται τμήματα που λαμβάνονται σταματώντας την ενζυματική πέψη του κολλαγόνου. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται



συνήθως στις αλυσίδες α1(I) και α2(I) του κολλαγόνου δέρματος μόσχου (Von der Mark *et al.*, 1970; Wendt *et al.*, 1972; Rexrodt *et al.*, 1973).

Η σειρά των αμινοξέων για τις α-αλυσίδες κολλαγόνου τύπου I είναι σχεδόν τελείως καθορισμένη. Τα περισσότερα από τα δεδομένα για τις αλυσίδες αυτές προέρχονται από τη μελέτη κολλαγόνου δέρματος μόσχου. Μερικά κενά που υπήρχαν στην αλληλουχία των αμινοξέων συμπληρώθηκαν χρησιμοποιώντας ομόλογες σειρές αμινοξέων από δέρμα κοτόπουλου. Πηγές για την αλληλουχία των αμινοξέων αυτών των αλυσίδων αναφέρονται στην εργασία των Charman *et al.*, (1981) και των Weiss και Jayson (Weiss and Jayson, 1982). Στις αλυσίδες α1(II) και α1(III) η σειρά των αμινοξέων είναι και αυτή σχεδόν τελείως καθορισμένη.

### 3.4 Περιοχή της τριπλής έλικας του μορίου κολλαγόνου

Κάθε τρίτο αμινοξύ κατά μήκος της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, εκτός από μερικές περιοχές στα άκρα των αλυσίδων (τα τελοπεπτιδία), είναι η γλυκίνη (Gly). Η γλυκίνη είναι ένα αμινοξύ με την μικρότερη πλάγια αλυσίδα ( $R=H$ ) και έτσι μπορεί να είναι τοποθετημένη στο κέντρο της τριπλής έλικας (Ramachandran and Kartha, 1955; Rich and Crick, 1955). Έτσι η αλυσίδα του κολλαγόνου μπορεί να θεωρηθεί σαν μια πολυμερής ουσία που αποτελείται από τριπεπτιδικά τμήματα του γενικού τύπου Gly-X-Y (Grant and Prockop, 1972; Fietzek and Kuhn, 1976). Το αμινοξύ στη θέση "X" αμέσως μετά τη γλυκίνη είναι συχνά η προλίνη και στη θέση "Y" η υδροξυπρολίνη. Ομως στις θέσεις αυτές μπορεί να βρίσκονται και άλλα αμινοξέα. Η προλίνη και η υδροξυπρολίνη αποτελούν το 20% έως 25% του ολικού αριθμού των αμινοξέων της αλυσίδας α1(I). Στον πίνακα 3.3 φαίνεται η σύσταση σε αμινοξέα της α1(I) αλυσίδας κολλαγόνου ανθρώπου (Gay and Miller, 1978). Η υδροξυπρολίνη που υπάρχει μόνο στο κολλαγόνο και σε μερικές άλλες πρωτεΐνες, αυξάνει σημαντικά τη σταθερότητα της τριπλής έλικας με το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου (Bornstein and Byers, 1980).







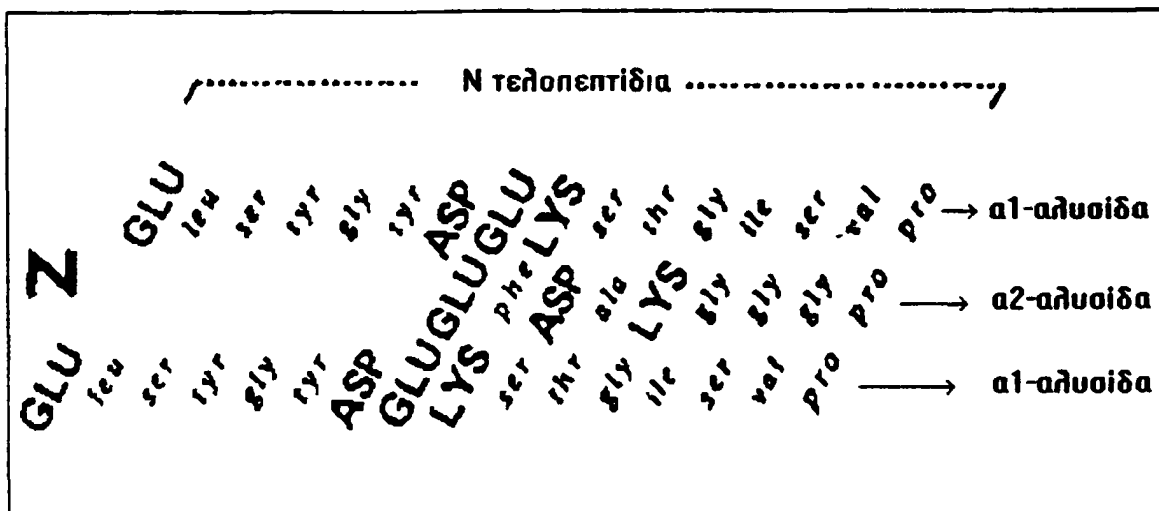
Πίνακας 3.3: Σύσταση σε αμινοξέα της α1(I) αλυσίδας κολλαγόνου ανθρώπου (Gay and Miller; 1978).

Αμινοξέα	Διεθνής ονομασία	Αριθμός αμινοξέων/1000 αμινοξέα της α1(I)
Υδροξυπρολίνη	Hyp	91
Ασπαραγινικό οξύ	Asp	42
Θρεονίνη	Thr	17
Σερίνη	Ser	37
Γλουταμινικό οξύ	Glu	77
Προλίνη	Pro	135
Γλυκίνη	Gly	330
Αλανίνη	Ala	115
Βαλίνη	Val	21
Μεθιονίνη	Met	7
Ισολευκίνη	Ile	7
Λευκίνη	Leu	20
Τυροσίνη	Tyr	2
Φαινυλανίνη	Phe	12
Υδροξυλυσίνη	Hyl	5
Λυσίνη	Lys	30
Ιστιδίνη	His	2
Αργινίνη	Arg	50



### 3.5 Μη ελικοειδείς περιοχές στο μόριο κολλαγόνου

Τα τελοπεπτιδία που είναι μικρές περιοχές και στα δύο άκρα των α-αλυσίδων αποτελούν το 4% περίπου ολόκληρου του μορίου κολλαγόνου. Στις περιοχές αυτές η γλυκίνη δεν εμφανίζεται σε κάθε τρίτη θέση και άρα οι περιοχές αυτές δεν ανήκουν στην τριπλή ελικοειδή μορφή. Ένα



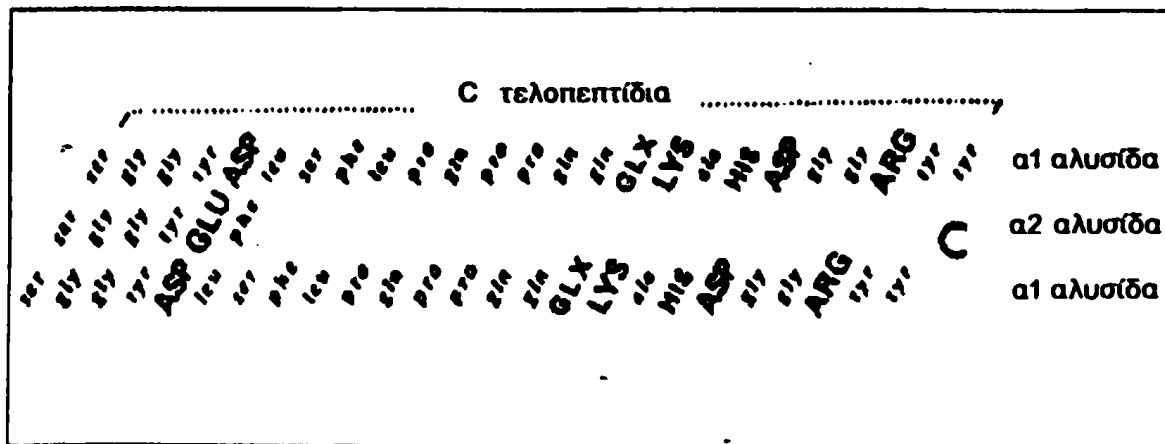
Σχήμα 3.3: Η αλληλουχία των αμινοξέων στα αμινοτελικά άκρα των τριών α-αλυσίδων του μορίου κολλαγόνου δέρματος μόσχου.

κοινό χαρακτηριστικό των τελοπεπτιδίων είναι η παρουσία μιας λυσίνης που όταν οξειδωθεί από το ένζυμο οξειδάση της λυσίνης μπορεί να δράσει σαν χαρακτηριστική ομάδα στο σχηματισμό χιαστών δεσμών (cross-links) μέσα και ανάμεσα στα μόρια (Gallor *et al.*, 1973).

Το αμινοτελικό άκρο της α1(I) αλυσίδας περιέχει 16 αμινοξέα ενώ της α2(I) αλυσίδας περιέχει 9 ή 11 αμινοξέα. Στο σχήμα 3.3 φαίνονται τα αμινοτελικά άκρα των τριών α-αλυσίδων του μορίου κολλαγόνου δέρματος μόσχου. Το καρβοξυτελικό άκρο της α1(I) αλυσίδας περιλαμβάνει 25 αμινοξέα και άρα είναι μακρύτερο από το αμινοτελικό άκρο. Το καρβοξυτελικό άκρο της α2(I) αλυσίδας περιλαμβάνει 6 αμινοξέα και είναι

μικρότερο από το αμινοτελικό. Στο σχήμα 3.4 φαίνονται τα καρβοξυτελικά άκρα των τριών α-αλυσίδων του μορίου κολλαγόνου.

Ενα άλλο κοινό χαρακτηριστικό όλων των μη ελικοειδών περιοχών του μορίου κολλαγόνου είναι ότι είναι ευαίσθητες στα πρωτεολυτικά ένζυμα, όπως είναι η πεψίνη (Leibovich and Weiss, 1970). Οι περιοχές αυτές μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στη μοριακή δομή του κολλαγόνου.



Σχήμα 3.4: Η αλληλουχία των αμινοξέων στα καρβοξυτελικά άκρα των τριών α-αλυσίδων του μορίου κολλαγόνου δέρματος μόσχου.

### 3.6 Υδατάνθρακες

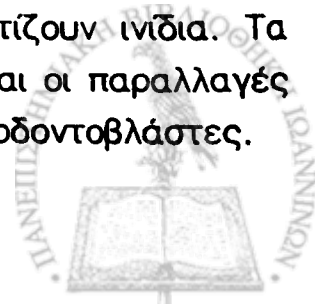
Στο μόριο του κολλαγόνου στη θέση "Υ", υπάρχει ένα μικρό ποσό υδροξυλυσίνης. Το αμινοξύ αυτό έχει αποδειχθεί ότι παίρνει μέρος στους χιαστούς δεσμούς μέσα και ανάμεσα στα μόρια (Barnes *et al.*, 1974). Η υδροξυλυσίνη είναι επίσης το σημείο προσάρτησης των υδατανθράκων του κολλαγόνου. Οι υδατάνθρακες είναι ο μονοσακχαρίτης γαλακτόζη και ο δισακχαρίτης γλυκόζη-γαλακτόζη.

Στην α1(I) αλυσίδα η υδροξυλυσίνη στη θέση 87 συνδέεται πάντα με δισακχαρίτη (Aguilar *et al.*, 1973, Fietzek and Kuhn, 1976). Η υδροξυλυσίνη της ίδιας αλυσίδας στη θέση 684 συνδέεται συνήθως με μονοσακχαρίτη (Fietzek and Kuhn, 1976). Στην α2(I) αλυσίδα η υδροξυλυσίνη στη θέση 87 και η υδροξυλυσίνη στη θέση 174 συνδέονται συνήθως με μονοσακχαρίτες (Aguilar *et al.*, 1973, Fietzek and Kuhn, 1976).

### 3.7 Βιοσύνθεση του κολλαγόνου

Το κολλαγόνο δημιουργείται μετά από μια σειρά αντιδράσεων (Bornstein, 1974; Fessler and Fessler, 1978). Πρώτα σχηματίζονται οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες, στη συνέχεια γίνεται υδροξυλίωση ορισμένων αμινοξέων προλίνης και λυσίνης, γλυκοσυλίωση μερικών αμινοξέων υδροξυλυσίνης και ύστερα σχηματίζεται η τριπλή έλικα. Το προϊόν της σύνθεσης αυτής λέγεται "προκολλαγόνο". Η σύνθεση του προκολλαγόνου γίνεται ενδοκυτταρικά. Η ενδοκυτταρική αυτή λειτουργία συμβαίνει στα ριβοσωμάτια.

Το σχηματιζόμενο προκολλαγόνο εκκρίνεται στη συνέχεια στον εξωκυτταρικό χώρο όπου οι πρωτεάσες κόβουν τα μη ελικοειδή άκρα που είναι χαρακτηριστικά για το προκολλαγόνο. Έτσι τελικά σχηματίζονται τα μόρια του κολλαγόνου που συναθροίζονται και σχηματίζουν ινίδια. Τα κύτταρα που παράγουν κολλαγόνο είναι οι ινοβλάστες και οι παραλλαγές τους, δηλαδή οι οστεοβλάστες, οι χονδροβλάστες και οι οδοντοβλάστες.



### 3.8 Προκολλαγόνο

Οι τρεις αλυσίδες του προκολλαγόνου (pro α-αλυσίδες) περιέχουν επιπλέον πεπτιδία στα αμινοτελικά τους άκρα από τις αντίστοιχες αλυσίδες του μορίου κολλαγόνου. Αρα οι αλυσίδες του προκολλαγόνου είναι μακρύτερες από τις α-αλυσίδες του κολλαγόνου. Επίσης η αλληλουχία των αμινοξέων των αλυσίδων του προκολλαγόνου είναι διαφορετική από αυτή των α-αλυσίδων του μορίου κολλαγόνου. Για παράδειγμα αν και στο προκολλαγόνο τύπου I υπάρχει η κυστεΐνη στα δυο μη ελικοειδή άκρα του, στο μόριο του ίδιου τύπου δεν υπάρχει η κυστεΐνη (βλέπε πίνακα 3.3).

Στο προκολλαγόνο τύπου I υπάρχουν δισουλφιδικοί δεσμοί ανάμεσα στις αλυσίδες του. Οι δεσμοί αυτοί βρίσκονται στα αμινοτελικά και κυρίως στα καρβοξυτελικά άκρα του προκολλαγόνου (Byers *et al.*, 1975; Fessler *et al.*, 1975).

### 3.9 Χιαστοί δεσμοί στο κολλαγόνο

Ανάμεσα στις αλυσίδες του μορίου κολλαγόνου υπάρχουν χιαστοί δεσμοί (cross links). Τέτοιοι δεσμοί υπάρχουν και ανάμεσα στα μόρια του κολλαγόνου. Έτσι οι αλυσίδες μέσα στο ίδιο μόριο καθώς και στα γειτονικά μόρια κολλαγόνου συνδέονται μεταξύ τους. Το πλέγμα που σχηματίζεται αυξάνει την αντοχή και τη χημική αντίσταση του κολλαγόνου. Η θέση των χιαστών δεσμών είναι γνωστή.

Το πρώτο βήμα στο χιαστό δεσμό κολλαγόνου είναι η ενζυμική σύνθεση αλδεϋδών που γίνεται με αφαίρεση της ε-αμινομάδας αρκετών λυσινών ή υδρολυσινών (Bornstein, 1970b; Balley *et al.*, 1970). Οι αλδεϋδες που δημιουργούνται σχηματίζουν χιαστούς δεσμούς με δύο τρόπους. Στον



ένα τρόπο γίνεται σχηματισμός βάσης κατά Schiff από τη συμπύκνωση μιας αλδεύδης με μια αμινομάδα λυσίνης ή υδροξυλυσίνης που βρίσκεται σε μια άλλη α-αλυσίδα. Στον άλλο τρόπο γίνεται συμπύκνωση μεταξύ δύο αλδευδών που βρίσκονται σε δυο γειτονικές α-αλυσίδες. Επίσης έχει βρεθεί ένας νέος χιαστός δεσμός με το αμινοξύ ιστιδίνη (Fairweather *et al.*, 1972; Housley *et al.*, 1975).

### 3.10 Διάσπαση του μορίου κολλαγόνου

Η διάσπαση του κολλαγόνου αρχίζει με την επίδραση μιας ειδικής κολλαγενάσης. Η κολλαγενάση αυτή διασπά την τριπλή έλικα του μορίου κολλαγόνου σε μια περιοχή που βρίσκεται στα τρία τέταρτα της απόστασης ανάμεσα στο αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο του μορίου (Prockop, 1980). Στη συνέχεια η τριπλή έλικα αποδιοργανώνεται και η πρωτεΐνη προσβάλλεται από μια σειρά λιγότερο ειδικών πρωτεασών.

### 3.11 Ανασύνταξη των μορίων κολλαγόνου για το σχηματισμό των ινιδίων

Τα μόρια κολλαγόνου ανασυντάσσονται και σχηματίζουν τα ινίδια κολλαγόνου. Ο τρόπος της μοριακής ανασύνταξης εξαρτάται από διάφορους παράγοντες. Οι παράγοντες αυτοί μπορεί να προέρχονται είτε από τα ίδια τα μόρια, είτε από το περιβάλλον του κολλαγόνου.

Η ανασυγκρότηση των μορίων γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε να έχουμε σχεδόν απεριόριστη ανάπτυξη κατά την διεύθυνση του άξονα του ινιδίου και περιορισμένη κατά την πλάγια διεύθυνση. Κατά την συναρμολόγηση των ινιδίων κολλαγόνου από τα μακρυνά μόρια κολλαγόνου,

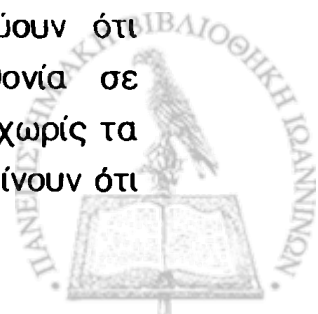
εσωτερικοί και εξωτερικοί παράγοντες επηρεάζουν τον περιορισμό της ανάπτυξης κατά την πλάγια διεύθυνση. Η ανάπτυξη κατά την πλάγια διεύθυνση καθορίζει τη διάμετρο των ινιδίων κολλαγόνου.

*In vitro* το κολλαγόνο που εξάγεται από τους ιστούς ανασυντάσσεται σε ινίδια μέσα σε διάφορα διαλύματα. Η ανασύνταξη αυτή είναι παρόμοια με αυτήν που γίνεται μέσα στους ιστούς. Η διάμετρος όμως των ινιδίων που αναπτύσσονται *in vitro* είναι διαφορετική από αυτή των αντίστοιχων ινιδίων που αναπτύσσονται μέσα στους ιστούς. Αυτό δηλώνει ότι και κάποιοι εσωτερικοί παράγοντες επηρεάζουν τον περιορισμό της πλάγιας ανάπτυξης των ινιδίων (Bard and Charman, 1973; Holmes and Charman, 1979).

Στις ηλεκτρονικές μικρογραφίες διαφόρων κολλαγονούχων ιστών, όπως του τένοντα και του κερατοειδή χιτώνα, τα ινίδια του κολλαγόνου εμφανίζονται διάμετρο που κυμαίνεται σε συγκεκριμένη περιοχή τιμών. Αυτό δείχνει ότι κάποιοι παράγοντες ελέγχουν με αυστηρό τρόπο την *in vivo* ανασύνταξη των μορίων κολλαγόνου.

Αρκετές εξωκυτταρικές συνιστώσες, κολλαγονούχες και μη έχουν προταθεί σαν πιθανοί καθοριστικοί παράγοντες της ανάπτυξης των ινιδίων. Οι Parry *et al.* (1982) υποστηρίζουν ότι οι γλυκοζοαμινογλυκάνες (glycosaminoglycan) παίζουν ρόλο στον καθορισμό της διαμέτρου των ινιδίων κολλαγόνου, ενώ άλλοι ερευνητές υποστηρίζουν την παρουσία πρωτεογλυκανών (proteoglycans) σαν καθοριστικό παράγοντα (Mathews and Decker, 1968; Toole and Lowther, 1968). Οι πρωτεογλυκάνες μάλιστα φαίνεται να έχουν μια ειδική συσχέτιση με συγκεκριμένες περιοχές των ινιδίων κολλαγόνου (Scott and Orford, 1981; Scott and Haigh, 1985a,b; Scott, 1980).

Αλλα δεδομένα αναφέρονται σε κολλαγονούχες συνιστώσες που επιδρούν στον καθορισμό της διαμέτρου των ινιδίων κολλαγόνου. Πολλές μελέτες υποστηρίζουν ότι η διάμετρος των ινιδίων επηρεάζεται από την παρουσία των αμινοτελικών προπεπτιδίων (N-propeptides) (τα αμινοτελικά άκρα του προκολλαγόνου). Οι Lapiere και Nusges (1974) υποδεικνύουν ότι η διάμετρος τείνει να γίνει μικρότερη όταν υπάρχει αφθονία σε προκολλαγόνο που έχει άθικτα τα αμινοτελικά προπεπτίδια και χωρίς τα καρβοξυτελικά προπεπτίδια. Οι Veis *et al.* (Veis *et al.*, 1979) προτείνουν ότι



το παραπάνω προκολλαγόνο μπορεί να ενσωματώνεται μέσα στα ινίδια και να έχει ένα ειδικό ρόλο στο σχηματισμό των ινιδίων.

In vitro, ινίδια μπορεί να αναπαράγονται από μόρια προκολλαγόνου στα οποία έχει γίνει ενζυματική αποκοπή του ενός ή και των δύο άκρων τους. Με τον τρόπο αυτό το προκολλαγόνο τύπου I με άθικτα τα αμινοτελικά του άκρα συναθροίζεται σε λεπτά ινίδια, που παρουσιάζουν περιοδικότητα D. Αρα η παρουσία των αμινοτελικών προπεπτιδίων δεν επιδρά στην αξονική ανάπτυξη των μορίων. Επίσης δεν πρέπει να επιδρά στα αρχικά στάδια της μοριακής συνάθροισης, αλλά εμποδίζει τη συνάθροιση στα τελικά στάδια, αν κρίνουμε από το γεγονός ότι τα ινίδια που δημιουργούνται in vitro με τον παραπάνω τρόπο έχουν μικρότερη διάμετρο.

Ινίδια επίσης μπορεί να δημιουργηθούν in vitro από μόρια προκολλαγόνου που αρχικά έχουν άθικτα τα καρβοξυτελικά τους άκρα, και στη συνέχεια τους αφαιρούνται και τα δυο τους άκρα. Τα ινίδια αυτά έχουν μεγάλη διάμετρο (Miyahara *et al.*, 1984). Η σειρά με την οποία τα δύο άκρα αποκόβονται πρέπει να επηρεάζει τη διάμετρο των ινιδίων κολλαγόνου. Η σειρά αυτή δεν είναι η ίδια σε όλους του ιστούς και σε μερικές περιπτώσεις τα αμινοτελικά άκρα αποκόπτονται πριν από τα καρβοξυτελικά (Leung *et al.*, 1979).

Άλλοι ερευνητές αποδεικνύουν ότι τα αμινοτελικά προπεπτιδία, κατά την in vivo δημιουργία ινιδίων, τακτοποιούνται στις περιόδους D πάνω στη επιφάνεια των ινιδίων (Fleischmajer *et al.*, 1981). Οι μελέτες έγιναν σε ινίδια με διάμετρο μέχρι 35 nm από ανθρώπινο δέρμα ενήλικα και εμβρύου. Αυτό δείχνει ότι τα μόρια του προκολλαγόνου με άθικτα τα αμινοτελικά τους άκρα ενσωματώνονται προσωρινά μέσα στα μικρά αναπτυσσόμενα ινίδια και στη συνέχεια τα αμινοτελικά τους άκρα διαχωρίζονται από τα ινίδια. Έτσι, τα αμινοτελικά προπεπτιδία πρέπει να παίζουν ρόλο στον καθορισμό της διαμέτρου των ινιδίων. Ο ρόλος των αμινοτελικών προπεπτιδίων στον καθορισμό της διαμέτρου στα μεγάλα ινίδια είναι ακόμα άγνωστος. Ο Scott (1984) με χημική ανάλυση που έκανε σε ινίδια κολλαγόνου από τένοντα εμβρύου μόσχου με διάμετρο (35 - 70)nm, βρήκε πολύ μικρή συγκέντρωση αμινοτελικών προπεπτιδίων.





Στον τύπο I συμμετέχουν και άλλοι τύποι κολλαγόνου και καθορίζουν τη διάμετρο των ινιδίων. Το κολλαγόνο τύπου III, όπου συχνά βρίσκεται στους ιστούς μαζί με το κολλαγόνο τύπου I, είναι η αιτία για στενότερα ινίδια σε ιστούς ενηλίκων (Fleischmajer *et al.*, 1981). Είναι γνωστό ότι τα αμινοτελικά προπεπτίδια του κολλαγόνου τύπου III απομακρύνονται πιο αργά από τα αντίστοιχα προπεπτίδια του τύπου I (Fessler *et al.*, 1981).

Πολλές μελέτες υποστηρίζουν ότι τύποι κολλαγόνου, που βρίσκονται σε μικρή συγκέντρωση και συνυπάρχουν με άλλους τύπους μέσα στους ιστούς, μπορεί να παίζουν ρόλο στον καθορισμό της διαμέτρου των ινιδίων κολλαγόνου. Ο τύπος V, που βρίσκεται σε μικρό ποσοστό στον κερατοειδή χιτώνα και σε άλλα στρώματα συνδετικών ιστών, είναι στενά συνδεδεμένος με τον τύπο I και μπορεί να παίζει ρόλο στον καθορισμό της διαμέτρου (Linsenmayer *et al.*, 1983; Poschl and von der Mark, 1980). Επίσης η σχετική αναλογία μεταξύ των διαφόρων τύπων κολλαγόνου που συνυπάρχουν σε έναν ιστό, είναι καθοριστικός παράγοντας στην διάμετρο των ινιδίων.

Υπάρχουν επίσης και άλλοι παράγοντες που επιδρούν στη ανασύνταξη των μορίων κολλαγόνου σε ινίδια. Από μελέτες που έχουν γίνει *in vitro* έχει βρεθεί ότι το pH, η ιοντική ισχύ, και η θερμοκρασία επηρεάζουν την ανασύνταξη των μορίων κολλαγόνου (Wood and Keech, 1960; Cassel, 1966; Bianchi *et al.*, 1966; Cooper, 1970). Άλλες μελέτες αναφέρουν ότι η παρουσία μικρών οργανικών ή ανόργανων ενώσεων επιδρά στο σχηματισμό των ινιδίων κολλαγόνου (Bard and Charman, 1968; Bowden and Charman, 1972).

Επίσης οι ηλεκτροστατικές και οι υδρόφοβες δυνάμεις, που εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες, έχουν σημαντική επίδραση στην ανασύνταξη των μορίων σε ινίδια κολλαγόνου (Bornstein and Traub, 1979).

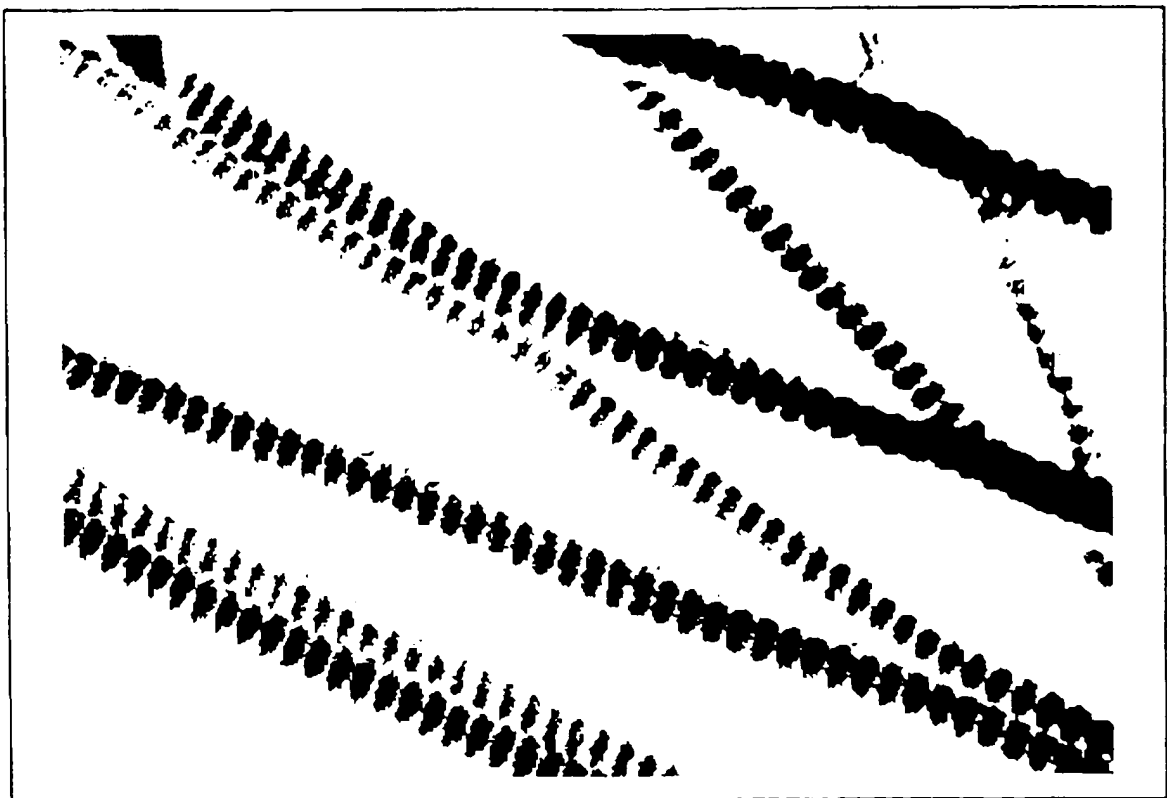


### 3.12 Ινίδια κολλαγόνου

#### 3.12.1 Η περιοδικότητα D στα ινίδια κολλαγόνου

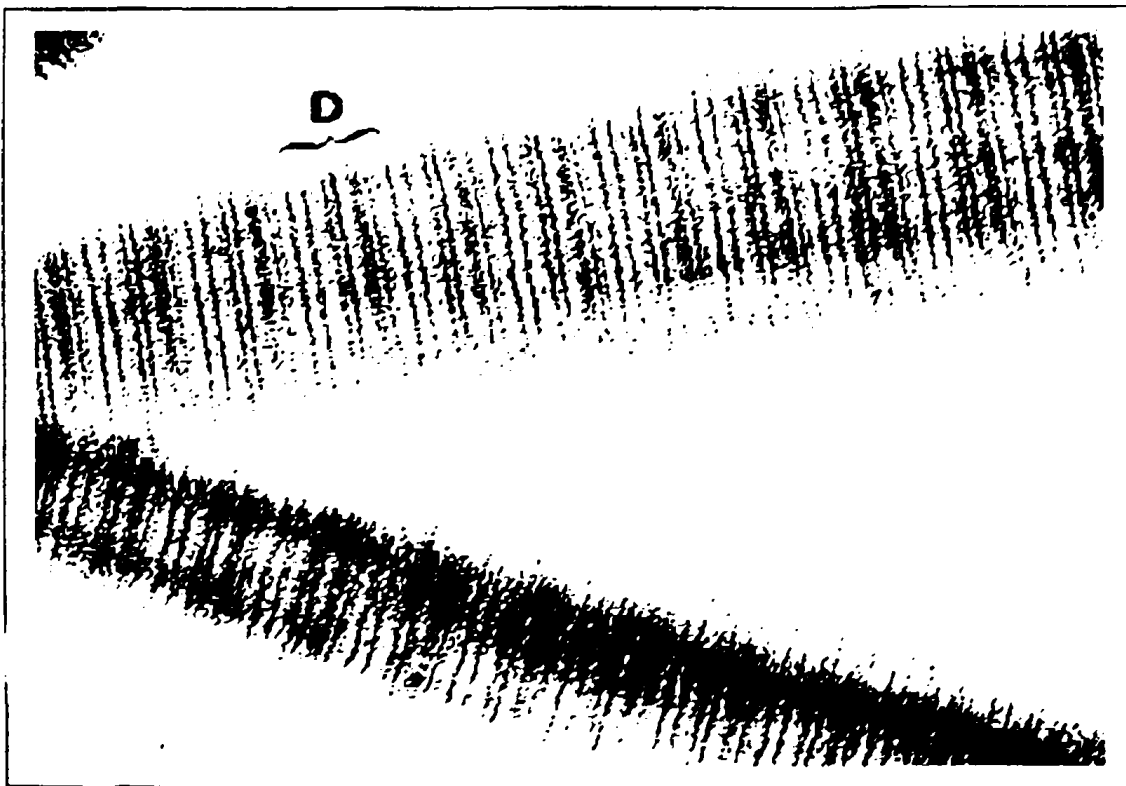
In vitro τα μόρια κολλαγόνου ανασυντάσσονται και σχηματίζουν ινίδια είτε με εξουδετέρωση όξινων διαλυμάτων κολλαγόνου με ουδέτερα ρυθμιστικά διαλύματα είτε με θέρμανση μέχρι 37 °C ουδέτερων ρυθμιστικών διαλυμάτων. Σήμερα δεχόμαστε ότι η ανασύνταξη των μορίων κολλαγόνου είναι μια αυτόνομη συνάθροιση (self-assembly).

Από πολύ παλιά είναι γνωστό ότι τα ινίδια κολλαγόνου εμφανίζουν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο χαρακτηριστικές ταινίες. Οι ταινίες αυτές επαναλαμβάνονται κατά τη διεύθυνση του άξονα του ινιδίου με μια περιοδικότητα D, όπου D είναι περίπου 64 nm. Η περιοδικότητα D κατά μήκος του άξονα του ινιδίου φαίνεται στα σχήματα 3.4 και 3.5.



Σχήμα 3.4: Ινίδια κολλαγόνου από ανθρώπινο Αχίλλειο τένοντα. Τα ινίδια εμφανίζουν περιοδικότητα κατά μήκος του άξονά τους. Τα ινίδια έχουν χρωματιστεί με χρυσό-παλλάδιο. Ο τρόπος αυτός χρώσης δίνει χαμηλή διακριτική ικανότητα, όπως φαίνεται και στο σχήμα. (Chapman *et al.*, 1990).

Οι μετρήσεις του  $D$  γίνονται με ηλεκτρονική μικροσκοπία ή με σκέδαση ακτίνων- $X$ . Οι πιο αξιόπιστες μετρήσεις του  $D$  δίνονται από τις μελέτες σκέδασης ακτίνων  $X$  πάνω σε ινίδια κολλαγόνου που δεν έχουν υποστεί αφυδάτωση. Από τέτοιες μελέτες σε διάφορα ινίδια, όπως σε τένοντα από ουρά ποντικού, βρέθηκε για το  $D$  τιμή ίση με 67 nm (Miller and Parry, 1973; Miller, 1982). Άλλοι ερευνητές έχουν υπολογίσει διαφορετικές τιμές για το  $D$ . Αυτό δείχνει ότι το  $D$  μεταβάλλεται λίγο μέσα στους διάφορους ιστούς. Στα ινίδια που προετοιμάζονται για το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο γίνεται συρρίκνωση κατά τη διάρκεια της αφυδάτωσης, με αποτέλεσμα να παίρνουμε μικρότερες τιμές για το  $D$ . Έτσι οι τιμές του  $D$  κυμαίνονται συνήθως από 55-65 nm, ανάλογα με το βαθμό της αφυδάτωσης.



Σχήμα 3.5: Ινίδια κολλαγόνου τύπου I από δέρμα μόσχου. Το κολλαγόνο διαλύθηκε σε διάλυμα νιτρικού οξέος και στη συνέχεια ανασυγκροτήθηκε σε ινίδια όπως περιγράφεται από τον Charman (Charman, 1974). Τα ινίδια εμφανίζουν περιοδικότητα κατά μήκος του άξονά τους. Τα ινίδια αυτά έχουν χρωματιστεί θετικά με φωσφοροβολφραμικό οξύ και με οξικό ουρανίλιο. (Charman *et al.*, 1990).

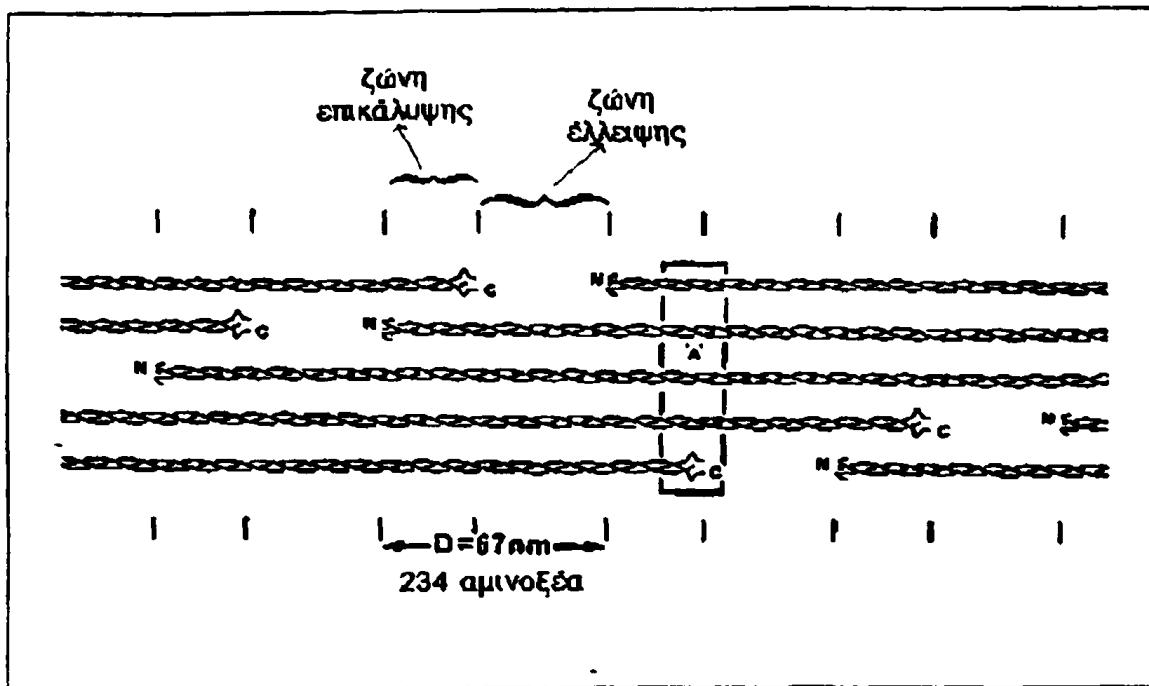


Η συρρίκνωση που προκαλείται στα ινίδια κολλαγόνου κατά την αφυδάτωσή τους, όταν αυτά προετοιμάζονται για το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, δεν δημιουργεί πρόβλημα στις μελέτες που περιγράφονται εδώ. Αυτό συμβαίνει γιατί μας ενδιαφέρει μόνο η σχετική θέση των δομικών χαρακτηριστικών μέσα σε κάθε περίοδο D. Έτσι η προαναφερθείσα συρρίκνωση μπορεί να αγνοηθεί. Βέβαια έχουμε υποθέσει ότι η συρρίκνωση γίνεται ομοιόμορφα σε όλο το μήκος της περιόδου D.

Η περιοδικότητα D των ταινιών δεν εμφανίζεται σε όλους τους τύπους κολλαγόνου. Τουλάχιστον 13 χημικά διαφορετικοί τύποι κολλαγόνου είναι γνωστοί, και μόνο σε μερικούς από αυτούς εμφανίζονται οι περιοδικά επαναλαμβανόμενες ταινίες. Στα μεγαλύτερα σπονδυλωτά ο τύπος I υπάρχει σε αφθονία και βρίσκεται στο δέρμα, στους τένοντες, στα οστά, στα τοιχώματα των αγγείων και σε άλλα όργανα. Στον τύπο αυτό εμφανίζονται ταινίες που επαναλαμβάνονται περιοδικά. Τα ινίδια στα σχήματα 3.4 και 3.5 είναι κολλαγόνο τύπου I. Στον τύπο II, που βρίσκεται κυρίως στους χόνδρους, εμφανίζεται και εκεί η περιοδικότητα D. Επίσης ο τύπος III, που συνήθως συνυπάρχει με τον τύπο I, εμφανίζει και αυτός την περιοδικότητα D. Αντίθετα ο τύπος IV, που βρίσκεται κυρίως στη βασική μεμβράνη, δεν εμφανίζει περιοδικότητα αλλά σχηματίζει ένα δίκτυο από λεπτά νήματα χωρίς ταινίες. Σε ένα ινίδιο μπορεί να υπάρχουν περισσότεροι από ένας τύποι κολλαγόνου. Έτσι οι τύποι III και V συχνά συνυπάρχουν με άλλους τύπους και συνήθως βρίσκονται σε μικρά ποσοστά (Charman *et al.*, 1990).

Όπως αναφέρθηκε η ανασύνταξη των μορίων κολλαγόνου για το σχηματισμό των ινιδίων είναι μια αυτοσυγκρότηση. Για να γίνει αυτή η αυτοσυγκρότηση απαιτείται αύξηση της αταξίας του συστήματος. Η αύξηση αυτή προέρχεται από τον αποκλεισμό μορίων νερού από τη δομή του κολλαγόνου καθώς αυξάνονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υδρόφοβων τμημάτων. Αυτές γίνονται μέγιστες όταν τα μόρια είναι παράλληλα με τον άξονα του ινιδίου. Η ακριβής θέση των μορίων καθορίζεται από τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις των ηλεκτρικά φορτισμένων αμινοξέων που γίνονται μέγιστες όταν τα μόρια είναι μετατοπισμένα μεταξύ τους κατά ακέραιο πολλαπλάσιο του D (=67nm)

(Hulmes *et al.*, 1973). Τα μόρια μέσα στο ινίδιο έχουν όλα την ίδια διεύθυνση και φορά.



Σχήμα 3.6: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης των μορίων μέσα σε ένα ινίδιο κολλαγόνου κατά μήκος του άξονα του ινιδίου. Η διάταξη αυτή έχει προταθεί από τους Hodge και Petruska (1963) και δείχνει σε δύο διαστάσεις τη θέση των μορίων μέσα στο ινίδιο κατά μήκος του άξονα του ινιδίου.

Το μήκος ( $L$ ) των μορίων του κολλαγόνου είναι περίπου 300 nm. Έτσι ο λόγος  $L/D$  είναι περίπου 4,5 αν θεωρήσουμε ότι  $D=67\text{nm}$ . Η μη ακέραια τιμή του λόγου  $L/D$  έχει σαν αποτέλεσμα σε κάθε τμήμα  $D$  να υπάρχουν δύο ζώνες, όπου στις εγκάρσιες τομές η μία περιέχει περισσότερα μόρια από την άλλη. Η ζώνη με τα περισσότερα μόρια λέγεται ζώνη επικάλυψης (overlap zone) και η ζώνη με τα λιγότερα μόρια



λέγεται ζώνη έλλειψης (gap zone) (σχήμα 3.6). Σε μια περίοδο υπάρχουν πέντε μόρια στην ζώνη επικάλυψης, ενώ η ζώνη έλλειψης έχει τέσσερα μόρια. Η πρώτη ζώνη έχει μήκος λίγο μικρότερο από  $0,5D$  και η δεύτερη λίγο μεγαλύτερο από  $0,5D$ .

Στο σχήμα 3.6 φαίνεται η αξονική διάταξη των μορίων του κολλαγόνου μέσα σε ένα ινίδιο. Η σχηματική αυτή αναπαράσταση έχει προταθεί από τους Hodge και Petruska το 1963, και δείχνει σε δύο διαστάσεις τη θέση των μορίων μέσα στο ινίδιο κατά μήκος του άξονα του ινιδίου.

### 3.12.2 Η τρισδιάστατη δομή των ινιδίων κολλαγόνου

Η τρισδιάστατη δομή των ινιδίων κολλαγόνου δεν είναι ακόμα πλήρως προσδιορισμένη. Έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα από πολλούς ερευνητές. Μερικά από τα μοντέλα αυτά περιλαμβάνουν μια τακτική διάταξη μικροϊνιδίων (Veis *et al.*, 1967). Υπάρχουν διάφορες απόψεις για τον αριθμό των μορίων κολλαγόνου που υπάρχουν στα μικροϊνίδια. Οι Woodhead-Galloway *et al.* (1975) υποστηρίζουν ότι τα μικροϊνίδια αποτελούνται από δύο μόρια. Οι Veis *et al.* (1967) μιλούν για μικροϊνίδια με τέσσερα μόρια. Ο Smith (1968) υποστηρίζει ότι τα μικροϊνίδια αποτελούνται από πέντε μόρια, ενώ οι Hosemann *et al.*, (1974) από οκτώ μόρια.

Οι Bruns *et al.* (1973) υπέδειξαν ότι το κολλαγόνο των χόνδρων μπορεί να αποτελείται από λεπτά υποϊνίδια που είναι κολλημένα το ένα με το άλλο με μια μικρή αξονική μετατόπιση, περίπου 8,9 nm. Οι Doyle *et al.* (1974) βρήκαν παρόμοια υποϊνίδια με διάμετρο 3,7-4,0 nm. Οι ίδιοι ερευνητές υποστήριξαν ότι η δομή αυτή μπορεί να είναι η περίπτωση του μικροϊνιδίου που αποτελείται από πέντε μόρια όπως περιγράφεται από τον Smith (1968).



### 3.13 Εμφάνιση των ινιδίων κολλαγόνου στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Η ατομική σύσταση των περισσοτέρων βιολογικών υλικών είναι τέτοια ώστε η σκέδαση των ηλεκτρονίων να μη διαφέρει πολύ από ένα μέρος του δείγματος σε ένα άλλο. Οι εικόνες, λοιπόν, των βιολογικών δειγμάτων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έχουν πολύ μικρή αντίθεση.

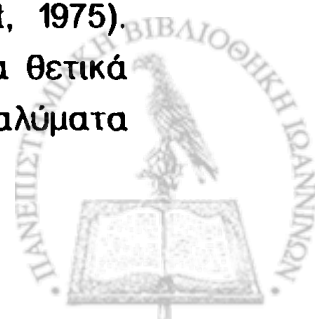
Εχουν βρεθεί διάφοροι τρόποι με τους οποίους βαριά μεταλλικά άτομα ενσωματώνονται μέσα στο βιολογικό δείγμα. Τα βαριά αυτά μεταλλικά άτομα σκεδάζουν έντονα τη δέση των ηλεκτρονίων με αποτέλεσμα την αύξηση της αντίθεσης στις βιολογικές εικόνες.

Μερικές από αυτές τις μεθόδους αύξησης της αντίθεσης έχουν χρησιμοποιηθεί και για την παρατήρηση των ινιδίων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Όταν χρησιμοποιούνται πολύ λεπτές τομές βιολογικών δειγμάτων, για την παρατήρηση των ινιδίων κολλαγόνου στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, η πιο κοινή μέθοδος αύξησης της αντίθεσης είναι η χρώση με διαλύματα βαρέων μετάλλων, όπως για παράδειγμα το φωσφοροβολφραμικό οξύ, το οξικό ουρανύλιο, ο νιτρικός μόλυβδος, άλατα λιθίου κ.α.

### 3.14 Θετική χρώση

Με τον όρο θετική χρώση (positive staining) εννοούμε τη διαδικασία εκείνη κατά την οποία το βιολογικό δείγμα αρχικά αντιδρά με ένα διάλυμα βαρέος μετάλλου, και στη συνέχεια το δείγμα ξεπλένεται. Με τον τρόπο αυτό το διάλυμα της χρώσης που δεν έχει αλληλεπιδράσει και ενσωματωθεί με το δείγμα απομακρύνεται από αυτό.

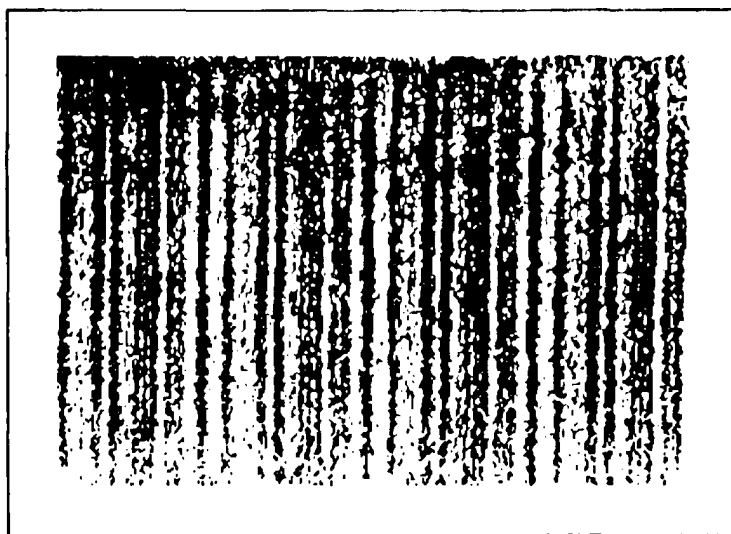
Η τεχνική αυτή είναι μια τυπική μέθοδος που χρησιμοποιείται για την αύξηση της αντίθεσης των βιολογικών δειγμάτων (Hayat, 1975). Συνήθως χρησιμοποιούνται διαλύματα αλάτων με βαρέα μέταλλα θετικά φορτισμένα (π.χ. άλατα ουρανίου, άλατα μολύβδου), και διαλύματα αλάτων με βαρέα μέταλλα αρνητικά φορτισμένα (π.χ. βολφράμιο).



### 3.14.1 Υπόδειγμα θετικής χρώσης ινιδίων κολλαγόνου

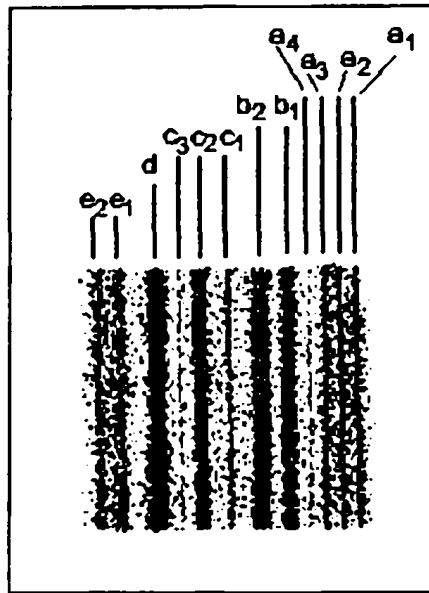
Όταν ινίδια κολλαγόνου χρωματιστούν με θετική χρώση και τα παρατηρήσουμε στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο παίρνουμε μια χαρακτηριστική εικόνα που την ονομάζουμε υπόδειγμα θετικής χρώσης ινιδίου κολλαγόνου. Το σχήμα 3.7 είναι ένα τέτοιο υπόδειγμα. Το ινίδιο έχει δημιουργηθεί *in vitro* από διάλυμα κολλαγόνου δέρματος μόσχου. Στη συνέχεια χρωματίστηκε θετικά με δύο διαλύματα, αρχικά με φωσφοροβολφραμικό οξύ (phosphotungstic acid, PTA) και στη συνέχεια με οξικό ουρανύλιο (uranyl acetate, UA).

Σε κάθε περίοδο D εμφανίζονται μέχρι 12 σκούρες ταινίες. Σε κάθε μία από τις ταινίες αυτές έχει δοθεί μια χαρακτηριστική ονομασία. Στο σχήμα 3.8 φαίνονται οι 12 σκούρες ταινίες σε μια περίοδο D και οι αντίστοιχες χαρακτηριστικές τους ονομασίες σύμφωνα με τους Hodge και Schmitt (1960). Οι τέσσερις α ταινίες, που είναι πολύ κοντά η μία στην άλλη, έχουν ένα μέσο διάστημα μεταξύ των κέντρων τους 3,4 nm. Το διάστημα αυτό είναι μια χρήσιμη ένδειξη για την διακριτική ικανότητα του υποδείγματος.



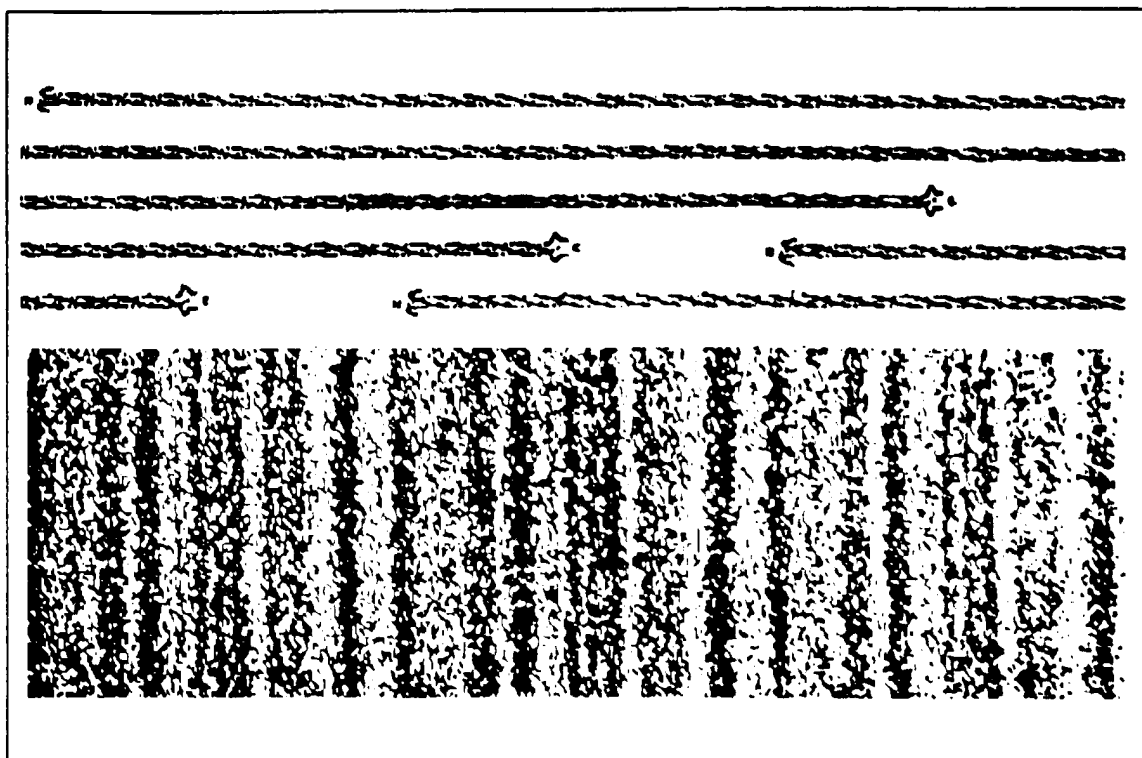
Σχήμα 3.7: Υπόδειγμα θετικής χρώσης ινιδίου κολλαγόνου. Το ινίδιο δημιουργήθηκε *in vitro* από διάλυμα κολλαγόνου δέρματος μόσχου και χρωματίστηκε αρχικά με φωσφοροβολφραμικό οξύ (PTA) και στη συνέχεια με οξικό ουρανύλιο (UA).





Σχήμα 3.8: Σε κάθε περίοδο D στο υπόδειγμα θετικής χρώσης ινιδίου κολλαγόνου εμφανίζονται 12 σκούρες ταινίες. Σε κάθε μία από τις ταινίες αυτές δόθηκε μια χαρακτηριστική ονομασία σύμφωνα με τους Hodge και Schmitt (1960).

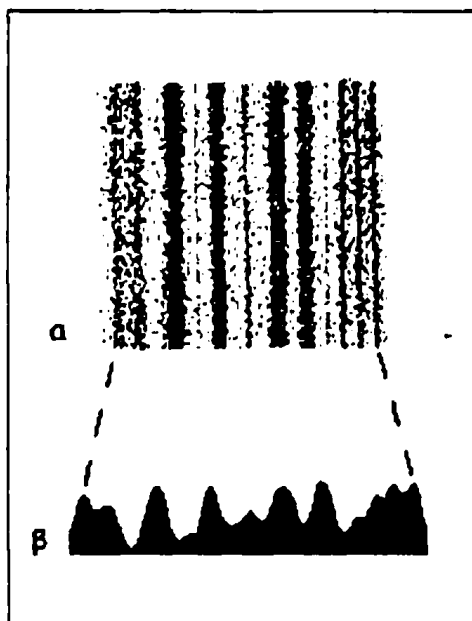
Στο σχήμα 3.9 το υπόδειγμα θετικής χρώσης ινιδίου κολλαγόνου συγκρίνεται με την διάταξη των μορίων κολλαγόνου κατά μήκος του άξονα του ινιδίου, όπως έχει προταθεί από τους Hodge και Petruska (1963). Από το σχήμα φαίνεται ότι το αμινοτελικό άκρο των μορίων βρίσκεται γύρω από την ταινία  $c_2$  και το καρβοξυτελικό κοντά στην περιοχή της ταινίας  $a_3$ . Πρέπει επίσης να υποθεί ότι το υπόδειγμα συνήθως δίνεται έτσι ώστε τα αμινοτελικά άκρα των μορίων να βρίσκονται αριστερά.



Σχήμα 3.9: Σύγκριση του υποδείγματος θετικής χρώσης ινδίου κολλαγόνου με την αξονική διάταξη των μορίων μέσα στο ινδίο. Το αμινοτελικό άκρο των μορίων βρίσκεται στην περιοχή  $c_2$  και το καρβολυτελικό στην περιοχή  $a_3$ .

### 3.14.2 Σύγκριση υποδείγματος θετικής χρώσης ινιδίου κολλαγόνου με την κατανομή των φορτίων κατά μήκος του ινιδίου

Είναι από παλιά γνωστό ότι οι 12 σκούρες ταινίες που εμφανίζονται στο υπόδειγμα θετικής χρώσης ινιδίου κολλαγόνου οφείλονται στις αλληλεπιδράσεις των μεταλλικών ιόντων της χρώσης με τα φορτισμένα αμινοξέα των μορίων κολλαγόνου (Hodge and Schmitt, 1960; Kuhn and Zimmer, 1961). Αυτό έχει επίσης αποδειχθεί συγκρίνοντας την κατανομή της πυκνότητας (αμαύρωσης) - πρόσληψη χρώσης (staining uptake) κατά μήκος του άξονα του υποδείγματος με την κατανομή των φορτίων κατά μήκος του άξονα του ινιδίου (Charman *et al.*, 1990).



Σχήμα 3.10: Μια περίοδος D από ένα υπόδειγμα θετικής χρώσης ινιδίου κολλαγόνου (α) και η αντίστοιχη κατανομή της πυκνότητας (staining uptake) κατά μήκος του άξονα του ινιδίου (β).

Στο σχήμα 3.10α φαίνεται μια περίοδος D από ένα υπόδειγμα θετικής χρώσης ινιδίου κολλαγόνου και στο σχήμα 3.10β η αντίστοιχη κατανομή της πυκνότητας κατά μήκος του άξονα του υποδείγματος.



Η αξονική αλληλουχία των αμινοξέων μέσα σε μια απλή περίοδο D φαίνονται στο σχήμα 3.11 που εκτείνεται σε τέσσερις σελίδες. Το ινίδιο είναι κολλαγόνο τύπου I. Σε κάθε περίοδο υπάρχουν 234 αμινοξέα. Σε κάθε μόριο κολλαγόνου οι τρεις α-αλυσίδες βρίσκονται με την εξής ακολουθία: α1-α2-α1. Τα δεδομένα για την αλληλουχία των αμινοξέων στις τρεις α-αλυσίδες είναι από δέρμα μόσχου και μερικά κενά συμπληρώθηκαν από δέρμα ποντικού ή από δέρμα κοτόπουλου (Charman *et al.*, 1981).

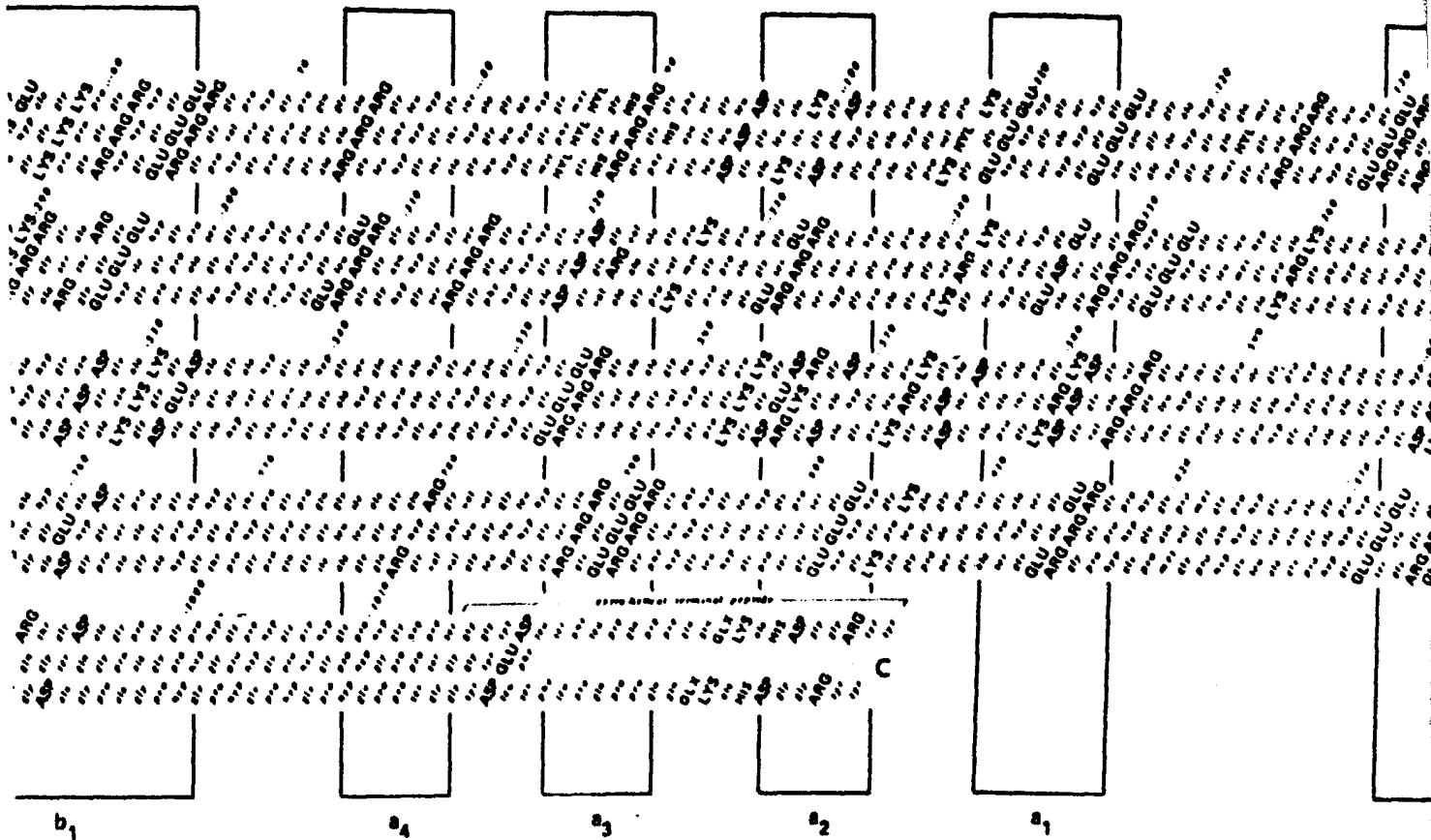
Στο σχήμα 3.11 τα φορτισμένα αμινοξέα φαίνονται με κεφαλαία γράμματα. Τα αμινοξέα αυτά δεν είναι ομοιόμορφα κατανομημένα κατά μήκος του άξονα του ινιδίου. Οι περιοχές μέσα σε μια περίοδο D με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις φορτισμένων αμινοξέων κλείνονται μέσα σε ορθογώνια. Κάθε ένα από αυτά τα ορθογώνια αντιστοιχεί σε μία από τις δώδεκα χαρακτηριστικές ταινίες που εμφανίζονται στο υπόδειγμα θετικής χρώσης. Οι ταινίες αναγνωρίζονται από τα γράμματα στο κάτω μέρος των ορθογωνίων.

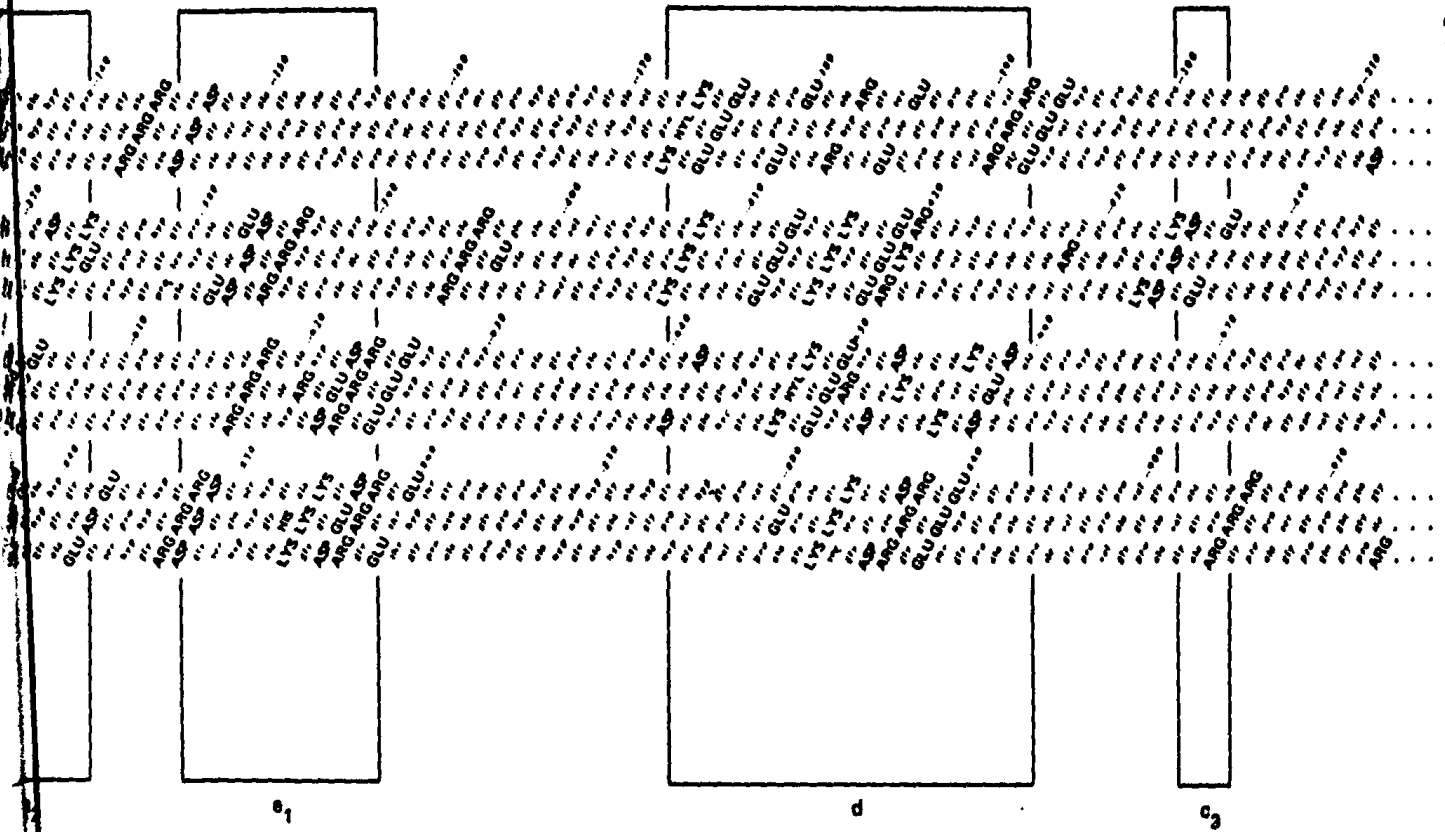
Η παραπάνω αντιστοιχία μπορεί να αποδειχθεί πιο πειστικά από άμεση ορατή σύγκριση. Στο σχήμα 3.12 φαίνεται ο τρόπος με τον οποίο πολλά αντίγραφα του σχήματος 3.11 μπορούν να τοποθετηθούν μαζί και να δώσουν μια εκτεταμένη παράταξη, αναπαριστώντας το πακετάρισμα των μορίων όπως έχει προταθεί από τους Hodge και Petruska (Hodge and Petruska, 1963). Στο σχήμα αυτό φαίνονται μόνο τα φορτισμένα αμινοξέα.

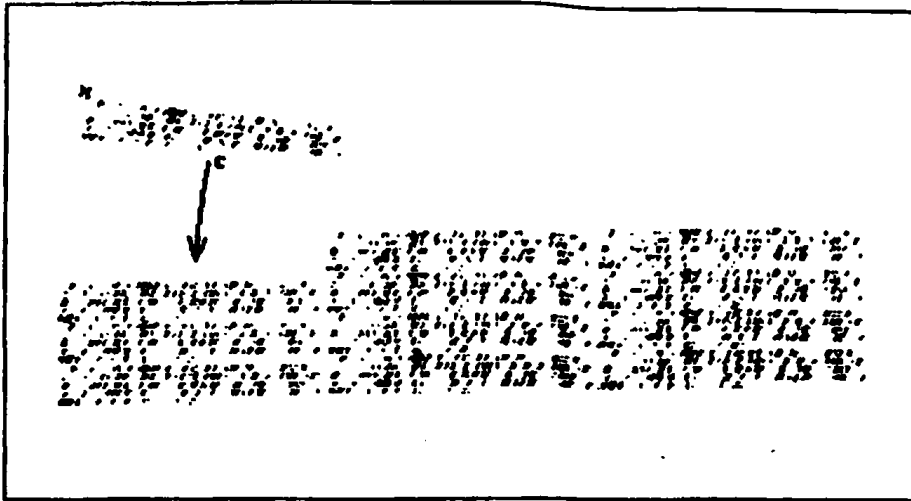
Στο σχήμα 3.13 η εκτεταμένη παράταξη των μορίων ευθυγραμμίζεται με το υπόδειγμα θετικής χρώσης ινιδίου κολλαγόνου. Το ινίδιο έχει χρωματιστεί θετικά με φωσφοροβολφραμικό οξύ και με οξικό ουρανύλιο. Από το σχήμα φαίνεται καθαρά ότι οι χαρακτηριστικές ταινίες, που εμφανίζονται στο υπόδειγμα, αντιστοιχούν σε περιοχές που είναι πλούσιες σε φορτισμένα αμινοξέα.





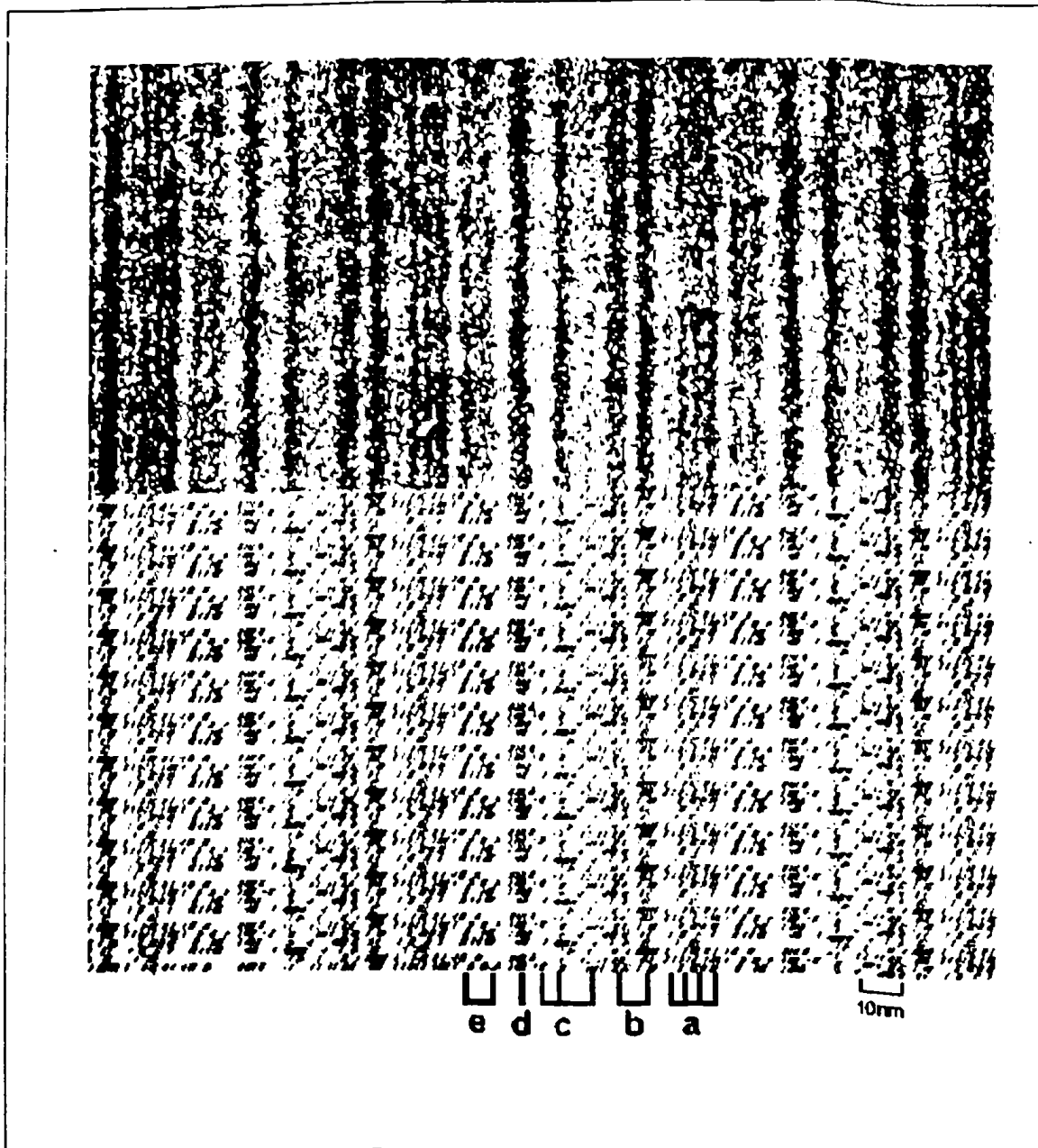






Σχήμα 3.12: Αναπαράσταση του πακεταρίσματος των μορίων μέσα σε ένα ινίδιο όπως έχει προταθεί από τους Hodge και Petruska (1963). Στο σχήμα φαίνονται μόνο τα φορτισμένα αμινοξέα.





Σχήμα 3.13: Η εκτεταμένη παράταξη των μορίων κολλαγόνου μέσα σε ένα ινίδιο ευθυγραμμίζεται με το υπόδειγμα θετικής χρώσης ινιδίου κολλαγόνου. Στην εκτεταμένη παράταξη των μορίων φαίνονται μόνο τα φορτισμένα αμινοξέα. Το ινίδιο έχει χρωματιστεί θετικά με φωσφοροβολφραμικό οξύ και με οξικό ουρανύλιο. Από το σχήμα είναι φανερό ότι οι χαρακτηριστικές ταινίες που εμφανίζονται στο υπόδειγμα, αντιστοιχούν σε περιοχές που είναι πλούσιες σε φορτισμένα αμινοξέα.



### 3.14.3 Κολλαγόνο και θετική χρώση με μέταλλα φορτισμένα αρνητικά ή θετικά

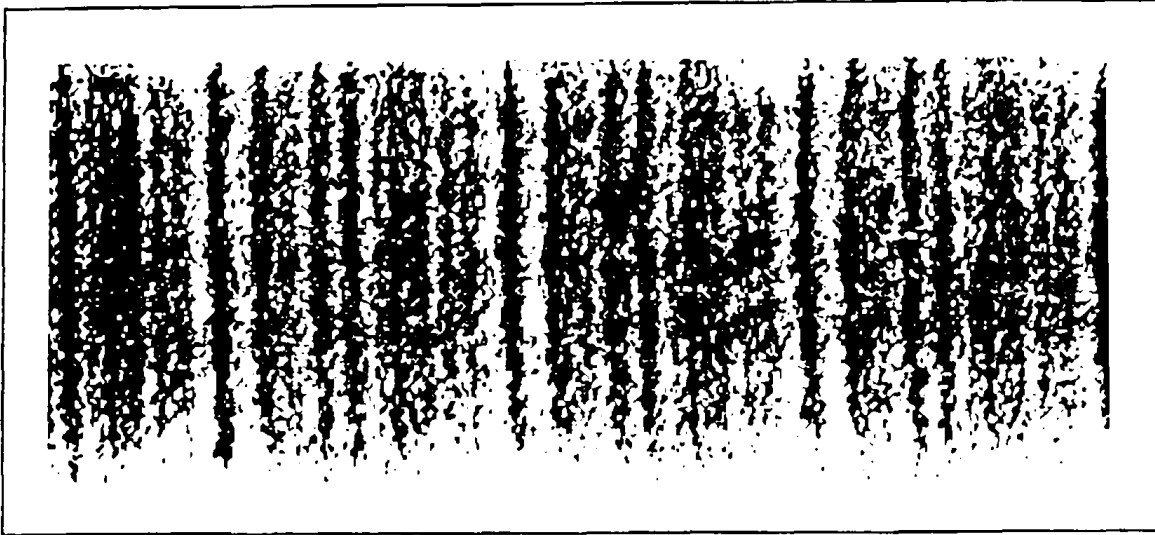
Όπως αναφέρθηκε, οι χαρακτηριστικές ταινίες στο υπόδειγμα θετικής χρώσης ινιδίου κολλαγόνου αναπαριστούν την κατανομή των φορτισμένων αμινοξέων κατά μήκος του άξονα του ινιδίου. Αυτό δείχνει ότι οι αλληλεπιδράσεις των μεταλλικών ιόντων της χρώσης με τα φορτισμένα αμινοξέα του κολλαγόνου είναι κυρίως ηλεκτροστατικές.

Στο σχήμα 3.13 η σύγκριση γίνεται με ινίδιο που έχει χρωματιστεί διπλά, αρχικά με φωσφοροβολφραμικό οξύ και στη συνέχεια με οξικό ουρανύλιο. Στην περίπτωση αυτή μπορούμε να υποθέσουμε ότι όλα τα φορτισμένα αμινοξέα, θετικά και αρνητικά, έχουν αντιδράσει με μεταλλικά ιόντα του ενός ή του άλλου διαλύματος.

Όταν το κολλαγόνο χρωματίζεται με ένα διάλυμα, για παράδειγμα με διάλυμα άλατος μετάλλου, όπου το βαρύ μέταλλο είναι αρνητικά φορτισμένο (π.χ. φωσφοροβολφραμικό οξύ), θα περιμέναμε οι χαρακτηριστικές ταινίες στο υπόδειγμα να αντιστοιχούν στην κατανομή των θετικά φορτισμένων αμινοξέων κατά μήκος του άξονα του ινιδίου. Για παράδειγμα, στην περίπτωση του φωσφοροβολφραμικού οξέος τα φωσφοροβολφραμικά ιόντα θα έπρεπε να συνδέονται με τα θετικά φορτισμένα αμινοξέα, δηλαδή με την αργινίνη (Arg), τη λυσίνη (Lys), την υδροξυλυσίνη (Hyl) και ίσως με μερικά αμινοξέα ιστοιδίνης (His) (Hodge and Schmitt, 1960; Kuhn and Zimmer, 1961).

Έχει αποδειχθεί ότι πράγματι η κατανομή της πυκνότητας στο υπόδειγμα ινιδίων κολλαγόνου που χρωματίστηκαν με φωσφοροβολφραμικό οξύ, σχετίζεται άμεσα με την κατανομή των παραπάνω θετικών αμινοξέων κατά μήκος του άξονα του ινιδίου (Tzaphlidou *et al.*, 1982a). Στο σχήμα 3.14 φαίνεται το υπόδειγμα ινιδίου κολλαγόνου που χρωματίστηκε θετικά με φωσφοροβολφραμικό οξύ. Οι χαρακτηριστικές ταινίες σε αυτό το υπόδειγμα δίνουν την κατανομή των αμινοξέων λυσίνης, υδροξυλυσίνης, αργινίνης και ιστοιδίνης (Tzaphlidou *et al.*, 1982a).



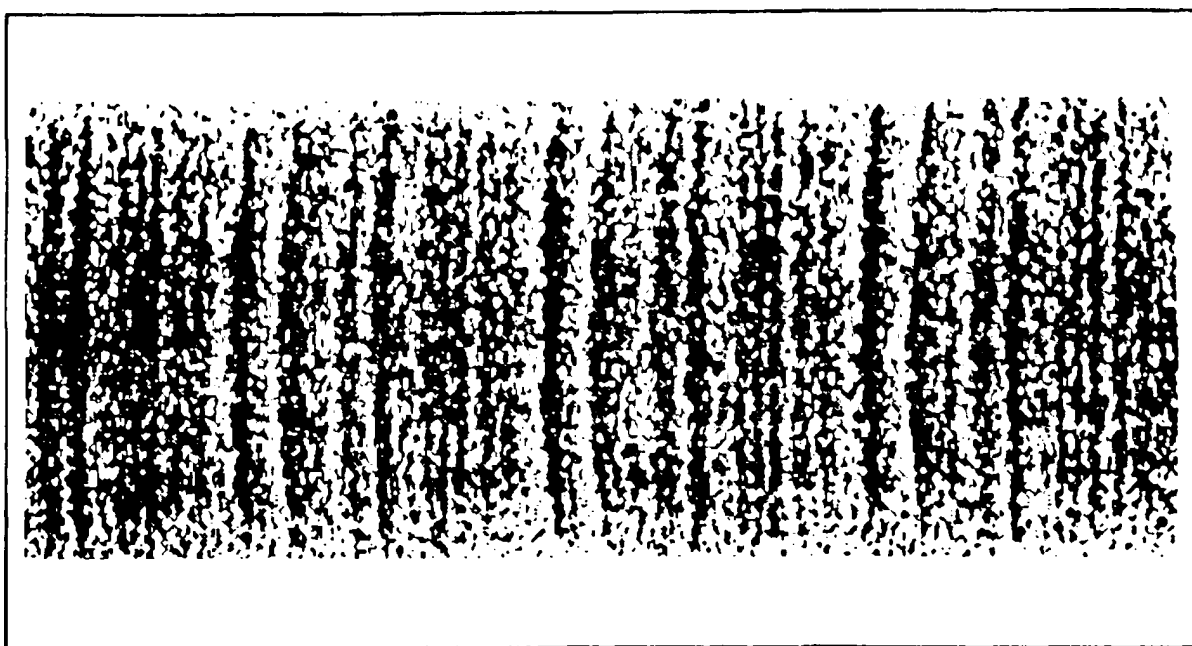


Σχήμα 3.14: Ινίδιο κολλαγόνου που ανασυγκροτήθηκε *in vitro* από διάλυμα κολλαγόνου δέρματος μόσχου. Το ινίδιο χρωματίστηκε θετικά με διάλυμα 1% φωσφοροβολφραμικού οξέος σε pH 3,2.

Όταν το διάλυμα της χρώσης περιλαμβάνει βαρέα μέταλλα θετικά φορτισμένα, όπως το οξικό ουρανύλιο, θα περιμέναμε οι χαρακτηριστικές ταινίες του υποδείγματος να αντιστοιχούν στην κατανομή των αρνητικά φορτισμένων αμινοξέων κατά μήκος του άξονα του ινιδίου. Ετσι τα θετικά ιόντα ουρανίου θα έπρεπε να συνδέονται με τα αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα: ασπαραγινικό οξύ (Asp) και γλουταμινικό οξύ (Glu) (Hodge and Schmitt, 1960; Kuhn and Zimmer, 1961). Στην πραγματικότητα όμως τα άλατα ουρανίου έχουν μια πολύπλοκη συμπεριφορά στη χρώση (Tzaphlidou *et al.*, 1982b). Στο σχήμα 3.15 φαίνεται το υπόδειγμα ινιδίου κολλαγόνου όπου χρωματίστηκε θετικά με οξικό ουρανύλιο. Το υπόδειγμα αυτό δεν σχετίζεται με την κατανομή των αρνητικά φορτισμένων αμινοξέων κατά μήκος του άξονα του ινιδίου αλλά σχετίζεται τόσο με τα θετικά όσο και με τα αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα (Tzaphlidou *et al.*, 1982b). Ο τρόπος με τον οποίο τα ιόντα της χρωστικής ουσίας αντιδρούν

με τα θετικά και αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα εξαρτάται από τη συγκέντρωση και από το pH του διαλύματος της χρώσης.

Συνήθως τα ινίδια κολλαγόνου χρωματίζονται θετικά διπλά, δηλαδή και με φωσφοροβολφραμικό οξύ και με οξικό ουρανύλιο με σκοπό την καλύτερη αντίθεση.



**Σχήμα 3.15:** Ινίδιο κολλαγόνου που ανασυγκροτήθηκε *in vitro* από διάλυμα κολλαγόνου δέρματος μόσχου. Το ινίδιο χρωματίστηκε θετικά με διάλυμα οξικού ουρανυλίου ( $c=10^{-5}$  M) σε pH 4,4.

### 3.15 Αρνητική χρώση

Με τον όρο αρνητική χρώση εννοούμε τη διαδικασία εκείνη κατά την οποία το βιολογικό δείγμα αρχικά χρωματίζεται με ένα διάλυμα, συνήθως βαρέων μεταλλικών αλάτων και μετά τη χρώση δεν ξεπλένεται. Έτσι το διάλυμα της χρώσης που δεν έχει αλληλεπιδράσει και ενσωματωθεί με το δείγμα δεν απομακρύνεται από αυτό. Με τον τρόπο αυτό ένα λεπτό στρώμα στεγνής χρώσης παραμένει μέσα και γύρω από το δείγμα, σκιαγραφώντας το και γεμίζοντας τα εσωτερικά κενά του με υλικό που σκεδάζει έντονα τα ηλεκτρόνια.

Η τεχνική αυτή είναι μια ακόμα τυπική μέθοδος που χρησιμοποιείται στην Ηλεκτρονική Μικροσκοπία για την αύξηση της αντίθεσης των βιολογικών δειγμάτων. Η τεχνική αναπτύχθηκε από τους Brenner και Horne το 1959 και από τους Huxley και Zubay το 1960 για την μελέτη μικρών μορίων. Αργότερα όμως χρησιμοποιήθηκε και για την μελέτη μεγάλων μακρομορίων (Horne and Whittaker, 1962; Haschemeyer and Myers; 1972).

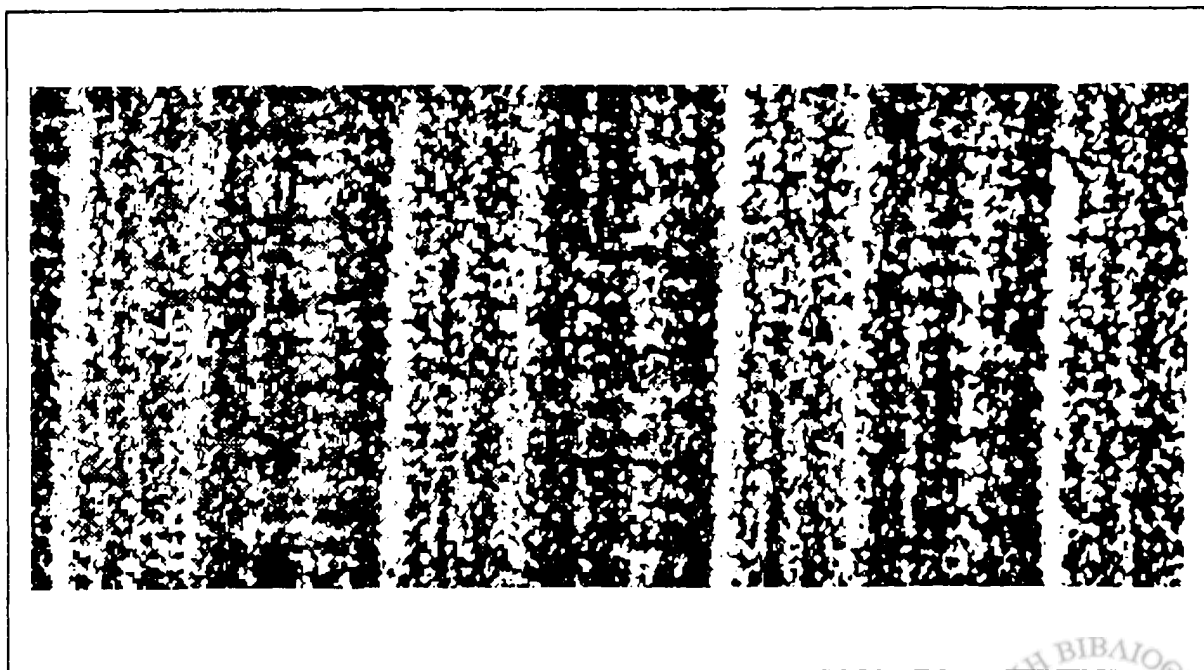
Συχνά στην αρνητική χρώση χρησιμοποιούνται διαλύματα αλάτων με βαρέα μέταλλα θετικά φορτισμένα (π.χ. άλατα ουρανίου, άλατα μολύβδου) και διαλύματα αλάτων με βαρέα μέταλλα αρνητικά φορτισμένα (π.χ. φωσφοροβολφαιμικό). Γενικά ένα καλό διάλυμα αρνητικής χρώσης είναι αυτό που δεν αντιδρά με το βιολογικό δείγμα, έχει υψηλή διαλυτότητα και σκεδάζει έντονα τα ηλεκτρόνια.



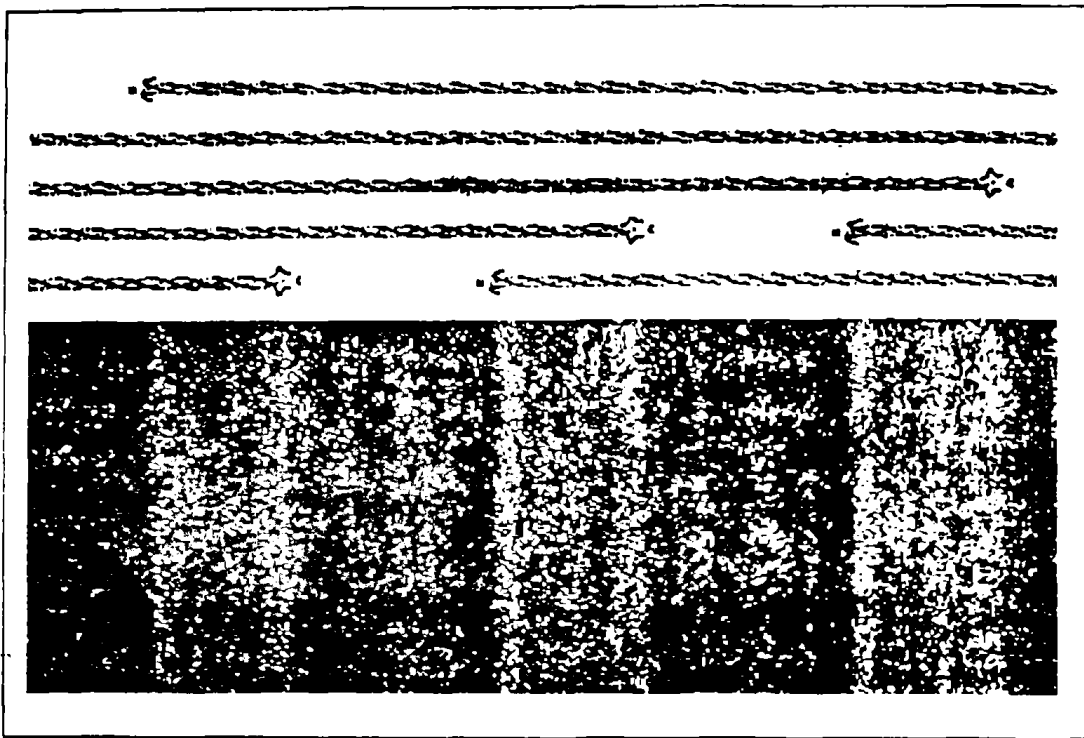
### 3.15.1 Αρνητική χρώση ινιδίων κολλαγόνου

Όταν ινίδια κολλαγόνου χρωματιστούν με αρνητική χρώση και τα παρατηρήσουμε στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο παίρνουμε μια χαρακτηριστική εικόνα που την ονομάζουμε υπόδειγμα αρνητικής χρώσης ινιδίου κολλαγόνου. Στο σχήμα 3.16 φαίνεται ένα τέτοιο υπόδειγμα.

Στο υπόδειγμα αυτό σε κάθε περίοδο  $D$  εμφανίζεται μία σκοτεινή και μία φωτεινή περιοχή. Η εμφάνιση των εναλλασσόμενων φωτεινών και σκοτεινών αυτών περιοχών οφείλεται στην ύπαρξη της ζώνης επικάλυψης και της ζώνης έλλειψης σε κάθε περίοδο (Hodge and Petruska, 1963; Cox *et al.*, 1967; Charman, 1974). Στο σχήμα 3.17 συγκρίνεται ένα υπόδειγμα αρνητικής χρώσης ινιδίου κολλαγόνου με τη διάταξη των μορίων κολλαγόνου κατά μήκος του άξονα του ινιδίου. Όπως φαίνεται και στο σχήμα οι φωτεινές περιοχές στο υπόδειγμα αντιστοιχούν στις ζώνες επικάλυψης, ενώ οι σκοτεινές περιοχές στο υπόδειγμα αντιστοιχούν στις ζώνες έλλειψης. Οι σκοτεινές περιοχές έχουν μήκος μεγαλύτερο από  $0,5 D$  ενώ οι φωτεινές περιοχές έχουν μήκος μικρότερο από  $0,5 D$ .



Σχήμα 3.16: Υπόδειγμα αρνητικής χρώσης ινιδίου κολλαγόνου. Το κολλαγόνο είναι από δέρμα μόσχου.



Σχήμα 3.17: Σύγκριση της αξονικής διάταξης μέσα σε ένα ινίδιο κολλαγόνου με το υπόδειγμα αρνητικής χρώσης του ινιδίου. Οι φωτεινές περιοχές στο υπόδειγμα αντιστοιχούν στις ζώνες επικάλυψης ενώ οι σκοτεινές περιοχές στις ζώνες έλλειψης.

Εκτός από τις φωτεινές και σκοτεινές περιοχές στο υπόδειγμα αρνητικής χρώσης ινιδίων κολλαγόνου εμφανίζονται και τοπικές μεταβολές στην αμαύρωση που εκτείνονται τόσο στις φωτεινές όσο και στις σκοτεινές περιοχές (βλέπε σχήμα 3.17). Οι μεταβολές αυτές, οι οποίες εξαρτώνται από τις συνθήκες της χρώσης, πιθανώς να οφείλονται στο μικρό ποσοστό της θετικής χρώσης που περιέχεται στην αρνητική χρώση (Tzaphlidou and Chapman, 1986).

Αν συγκρίνουμε ένα υπόδειγμα αρνητικής και ένα υπόδειγμα θετικής χρώσης ινιδίου κολλαγόνου κατάλληλα ευθυγραμμισμένα, θα διαπιστώσουμε ότι τα τοπικά μέγιστα αμαύρωσης στην αρνητική χρώση



αντιστοιχούν με τις 12 σκούρες ταινίες που εμφανίζονται σε κάθε περίοδο D στη θετική χρώση (Charman *et al.*, 1974). Η σχετική ένταση όμως των αμαυρώσεων ανάμεσα στα δύο υποδείγματα είναι διαφορετική.

Η διακριτική ικανότητα στις φωτογραφίες από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο είναι της τάξης των 2 nm. Μια διακριτική ικανότητα αυτής της τάξης μπορούμε να πάρουμε τόσο στα υποδείγματα θετικής χρώσης ινιδίων κολλαγόνου όσο και στα υποδείγματα αρνητικής χρώσης. Παρόλα αυτά τα υποδείγματα αρνητικής χρώσης έχουν ερμηνευτεί λιγότερο γιατί ένα πλήθος παραγόντων μπορεί να επηρεάσουν την τοπική εναπόθεση της χρώσης. Τέτοιοι παράγοντες μπορεί να είναι: α) ο υδρόφοβος χαρακτήρας των μη πολικών τμημάτων των αλυσίδων, β) η διατομή (cross-sectional area) των πλευρικών αλυσίδων όλων των αμινοξέων και γ) ο χώρος που καταλαμβάνει η πλευρική αλυσίδα κάθε αμινοξέος (bulkiness). Από τους παράγοντες αυτούς ο επικρατέστερος χαρακτήρας είναι ο τελευταίος (Tzaphlidou and Charman, 1986; Tzaphlidou, 1986)





### 3.16 Σταθεροποίηση

Η σταθεροποίηση (fixation) είναι το πρώτο βήμα κατά τη συνηθισμένη προετοιμασία των ιστών και των κυττάρων για την εξέτασή τους στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Στη συνέχεια ακολουθούν τα άλλα στάδια, της αφυδάτωσης, της μονιμοποίησης (ή στερέωσης) και της κοπής του δείγματος σε πολύ λεπτές τομές.

Οι σκοποί της σταθεροποίησης είναι α) να σταματήσουν οι βιολογικές αλλοιώσεις που γίνονται μετά το θάνατο και β) να διατηρηθούν οι ιστοί σε μια τέτοια κατάσταση που να μοιάζει όσο το δυνατόν περισσότερο με εκείνη των ζωντανών ιστών (Weakley, 1972; Hayat, 1981). Για τη διατήρηση των ιστών μπορεί να χρησιμοποιηθούν και άλλοι φυσικοί μέθοδοι. Η ευκολία όμως με την οποία πραγματοποιείται η χημική σταθεροποίηση την έχει κάνει επικρατέστερη μέθοδο για τη διατήρηση των βιολογικών δειγμάτων.

Η σταθεροποίηση όμως επιδρά μέχρι ενός βαθμού και στη δομή των δειγμάτων. Αυτό δημιουργεί ένα αναπόφευκτο πρόβλημα, όταν θέλουμε να μελετήσουμε την πραγματική δομή των δειγμάτων μας (Glauert, 1974). Είναι λοιπόν σημαντικό να γνωρίζουμε με ποιον τρόπο γίνεται η διατήρηση των δειγμάτων και πως η σταθεροποίηση τροποποιεί την πραγματική δομή τους.

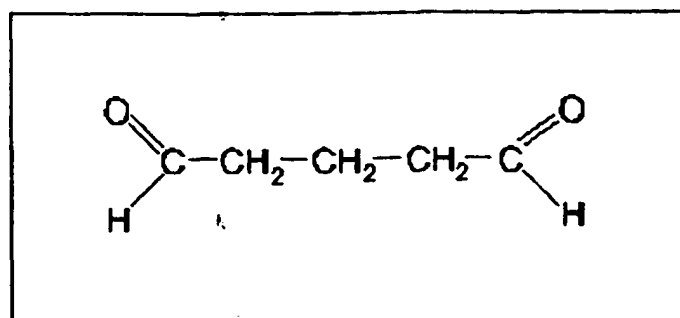
Στην απλή και ηλεκτρονική μικροσκοπία συνήθως χρησιμοποιούνται για σταθεροποίηση οι αλδεΐδες, φορμαλδεΐδη και γλουταραλδεΐδη, οι διϊμιδοεστέρες καθώς και το τετροξειδίο του οσμίου. Όλες οι παραπάνω ενώσεις σταθεροποιούν τις πρωτεΐνες σχηματίζοντας χιαστούς δεσμούς. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι οι αλδεΐδες και το όσμιο προκαλούν αλλαγές στην μοριακή δομή των πρωτεϊνών (Hayat, 1981; Hopwood, 1972).



### 3.16.1 Σταθεροποίηση με γλουταραλδεΐδη

Ο χημικός τύπος της γλουταραλδεΐδης φαίνεται στο σχήμα 3.18. Οι Sabatini *et al.*, το 1963 βρήκαν ότι η γλουταραλδεΐδη σε αυτήν την απλή της μορφή είναι ένα αντιδραστήριο όπου δημιουργώντας χημικούς δεσμούς προφυλάσσει τη λεπτή κυτταρική δομή. Από τότε δεν έχει βρεθεί κανένα άλλο αντιδραστήριο, το οποίο να έχει καλύτερη ικανότητα από ότι η γλουταραλδεΐδη στην ικανότητα να σταθεροποιεί τις πρωτεΐνες σχηματίζοντας χιαστούς δεσμούς. Γι' αυτό και η γλουταραλδεΐδη είναι το πιο διαδεδομένο αντιδραστήριο για την σταθεροποίηση των βιολογικών δειγμάτων κατά την προετοιμασία τους για το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Hayat, 1981; Bullock, 1984).

Ο μηχανισμός της αντίδρασης που λαμβάνει χώρα όταν οι πρωτεΐνες εκτεθούν σε γλουταραλδεΐδη, δεν είναι εντελώς γνωστός. Για το κολλαγόνο (και πιθανώς και για όλες τις πρωτεΐνες γενικά) ο βασικός στόχος φαίνεται να είναι οι ε-αμινομάδες των αμινοξέων λυσίνης και υδροξυλυσίνης. (Bowes and Cater, 1968). Πολλοί ερευνητές προτείνουν ότι μπορεί να γίνονται αντιδράσεις και με άλλα αμινοξέα, όπως με την ιστιδίνη, την τυροσίνη και με τις α-αμινομάδες στα αμινοτελικά άκρα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων (Habeer and Hiramato, 1968; Horwood, 1972).



Σχήμα 3.18: Ο χημικός τύπος της γλουταραλδεΐδης.



Οι επιδράσεις της γλουταραλδεΐδης και οι διαμορφώσεις που προκαλεί πάνω στα πεπτιδια και στις πρωτεΐνες δεν είναι ακόμα γνωστές με βεβαιότητα. Σε μακροσκοπική κλίμακα, εμφανίζεται συμπύκνωση και αλλαγές στις φυσικές ιδιότητες των πεπτιδίων και των πρωτεϊνών μετά από έκθεσή τους σε γλουταραλδεΐδη. Τα ινίδια κολλαγόνου μετά από έκθεση σε γλουταραλδεΐδη παρουσιάζουν μεγαλύτερη μηχανική, θερμική και χημική σταθερότητα (Gustavson, 1956).

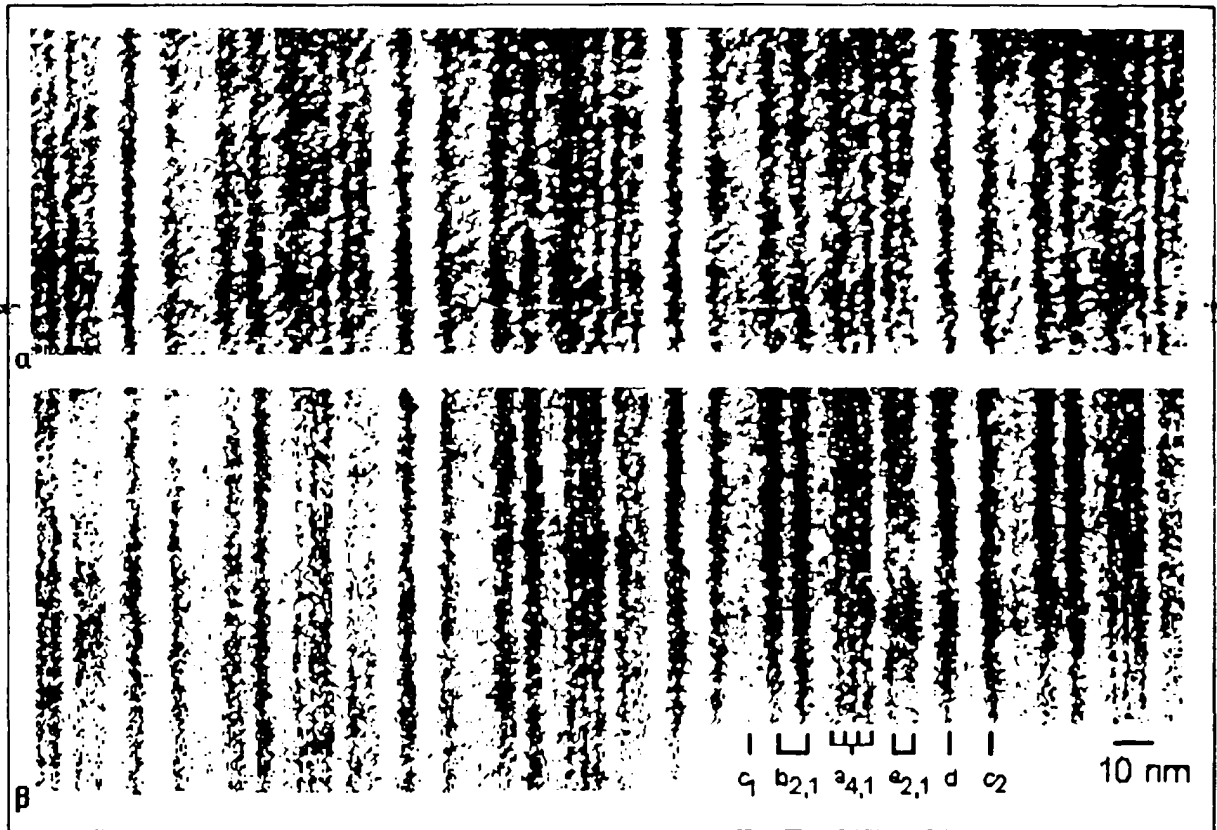
### 3.16.2 Αντιδραση της γλουταραλδεΐδης με το κολλαγόνο

Από μελέτες που έγιναν διαπιστώθηκε ότι η γλουταραλδεΐδη αντιδρά με τα αμινοξέα της λυσίνης και της υδροξυλυσίνης και πιθανώς της ιστιδίνης (Charman *et al.*, 1990). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την τροποποίηση της κατανομής των φορτίων κατά μήκος του μορίου του κολλαγόνου και επομένως αλλαγές στο υπόδειγμα θετικής χρώσης του ινιδίου. Πολλοί ερευνητές έχουν δείξει ότι η γλουταραλδεΐδη δημιουργεί πολυμερικούς χιαστούς δεσμούς (polymeric cross-links) (Bowes *et al.*, 1965; Bowes and Cater, 1968; Richards and Knowles, 1968; Korn *et al.*, 1972). Ο πολυμερισμός είναι πιθανόν να προκαλείται από την αρχική αντίδραση της γλουταραλδεΐδης με μια αμινομάδα.

Η αλληλεπίδραση της γλουταραλδεΐδης με φορτισμένα αμινοξέα του κολλαγόνου μειώνει την ικανότητα της χρώσης να αντιδράσει με όλα τα θετικά φορτισμένα αμινοξέα. Ερευνες επίσης έχουν δείξει ότι όταν η πολυμερισμένη γλουταραλδεΐδη αντιδρά με μια λυσίνη εμποδίζει τα γειτονικά αμινοξέα να αλληλεπιδράσουν με τη χρώση. Αποτέλεσμα αυτών είναι η μείωση της αντίθεσης στο δείγμα. Αυτό παρατηρείται και στο σχήμα 3.19 όπου συγκρίνεται ένα υπόδειγμα θετικής χρώσης ινιδίου κολλαγόνου μετά από σταθεροποίηση με γλουταραλδεΐδη (α) με ένα αντίστοιχο υπόδειγμα χωρίς σταθεροποίηση (β). Τα ινίδια και στις δυο



περιπτώσεις χρωματίστηκαν θετικά με φωσφοροβολφραμικό οξύ και με οξικό ουρανύλιο. Πράγματι παρατηρείται μια γενική μείωση της αντίθεσης του υποδείγματος μετά από σταθεροποίηση με γλουταραλδεύδη.



Σχήμα 3.19: Η επίδραση της γλουταραλδεύδης στο υπόδειγμα θετικής χρώσης ινιδίων κολλαγόνου. (α) ινίδιο κολλαγόνου που ανασυγκροτήθηκε *in vitro*. Το ινίδιο αρχικά σταθεροποιήθηκε με γλουταραλδεύδη και στη συνέχεια χρωματίστηκε θετικά με φωσφοροβολφραμικό οξύ και με οξικό ουρανύλιο. (β) το ίδιο ινίδιο κολλαγόνου στο οποίο δεν έχει γίνει σταθεροποίηση, αλλά χρωματίστηκε με παρόμοιο τρόπο. Στο υπόδειγμα (α) παρατηρείται μείωση της αντίθεσης.

### 3.16.3 Σταθεροποίηση με τετροξειδίο του οσμίου

Το όσμιο είναι ένα στοιχείο με ατομικό αριθμό 76. Το τετροξειδίο του οσμίου χρησιμοποιείται στην Ηλεκτρονική Μικροσκοπία γιατί είναι ένα αξιόπιστο αντιδραστήριο για την σταθεροποίηση των βιολογικών υλικών. Επίσης χρησιμοποιείται και για τη χρώση ορισμένων βιολογικών ιστών (Hayat, 1975).

Όπως και η γλουταραλδεΐδη έτσι και το τετροξειδίο του οσμίου είναι ένα αντιδραστήριο που σχηματίζει χιαστούς δεσμούς. Έτσι σχηματίζοντας χημικούς δεσμούς μεταξύ των μορίων δημιουργείται ένα σταθερό δίκτυο μεταξύ των κυττάρων. Το δίκτυο αυτό εμποδίζει το χάσιμο των υλικών που βρίσκονται μέσα σε αυτό, καθώς επίσης και το χάσιμο των υλικών που πίνονται μέσα στο δίκτυο (Weakley, 1972).

Κατά τη σταθεροποίηση με το τετροξειδίο του οσμίου μπορεί να συμβούν και άλλοι τύποι αντίδρασης, οι οποίοι είναι επίσης υπεύθυνοι για τη διατήρηση των ιστών. Χημικοί δεσμοί μπορεί να σχηματιστούν είτε μεταξύ των μορίων του τετροξειδίου του οσμίου και των ιστών είτε μεταξύ των τμημάτων μέσα στους ιστούς τα οποία δεν έχουν αντιδράσει με το υλικό της σταθεροποίησης (Weakley, 1972).

Ο μηχανισμός της αντίδρασης που λαμβάνει χώρα όταν οι πρωτεΐνες εκτεθούν σε τετροξειδίο του οσμίου δεν είναι εντελώς γνωστός. Ο Hake (1965) υποστηρίζει ότι σχηματίζονται χιαστοί δεσμοί μεταξύ των πρωτεϊνών και του τετροξειδίου του οσμίου. Επίσης οι ομάδες SH και SS πιθανόν να αντιδρούν (Bahr, 1954, 1955).



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 4.1 Εισαγωγή

Το λίθιο, όπως έχει ήδη αναφερθεί στο κεφάλαιο 2, χρησιμοποιείται στη ψυχιατρική για την θεραπεία και την προφύλαξη διαφόρων ψυχικών ασθενειών. Εκτός όμως από τις θετικές του επιδράσεις προκαλεί και παρενέργειες σε διάφορους ιστούς και όργανα του ανθρώπινου οργανισμού. Το κολλαγόνο είναι το βασικό συστατικό των ιστών και των οργάνων του σώματος. Μέχρι σήμερα όμως, δεν έχει ερευνηθεί ευρέως η επίδραση του λιθίου στο κολλαγόνο.

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για την μελέτη διαφόρων δομικών αλλοιώσεων των ινιδίων κολλαγόνου που προκαλούνται από διάφορες ασθένειες. Επίσης έχει χρησιμοποιηθεί για την μελέτη της επίδρασης του λιθίου πάνω στη δομή των νεφρών. Η εργασία αυτή αναφέρεται στη μελέτη των επιδράσεων του λιθίου στα ινίδια κολλαγόνου δέρματος.

Για την μελέτη των επιδράσεων του λιθίου στα ινίδια του κολλαγόνου δέρματος χρησιμοποιήθηκαν για πειραματόζωα ποντίκια (mice) Swiss Albino, ηλικίας 5 εβδομάδων στην αρχή των πειραμάτων. Στα πειραματόζωα δόθηκε καθημερινά με ενδοπεριτοναϊκή ένεση διάλυμα LiCl. Στα διάφορα πειράματα που έγιναν χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά δοσολογικά σχήματα.



## 4.2 Παρασκευή διαλυμάτων LiCl

Στα πειράματα που έγιναν χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα LiCl με συγκέντρωση 0,15 M ή 0,6 M.

1) Διάλυμα 0,15 M LiCl :

$$0,15 \text{ M LiCl} = 0,15 \text{ mole LiCl} / 1 \text{ lt διαλύματος} \quad (1)$$

$$0,15 \text{ mole LiCl} = 0,15 \times \text{M.B.}_{(\text{LiCl})} = 0,15 \times 42,4 \text{ gr LiCl} = 6,36 \text{ gr LiCl} \quad (2)$$

Από τις (1) και (2) προκύπτει ότι σε 1 λίτρο διαλύματος 0,15 M LiCl αντιστοιχούν 6,36 gr καθαρού LiCl.

2) Διάλυμα 0,6 M LiCl :

$$0,6 \text{ M LiCl} = 0,6 \text{ mole LiCl} / 1 \text{ lt διαλύματος} \quad (3)$$

$$0,6 \text{ mole LiCl} = 0,6 \times \text{M.B.}_{(\text{LiCl})} = 0,6 \times 42,4 \text{ gr LiCl} = 25,44 \text{ gr LiCl} \quad (4)$$

Από τις (3) και (4) προκύπτει ότι σε 1 λίτρο διαλύματος 0,6 M LiCl αντιστοιχούν 25,44 gr καθαρού LiCl.

Το χλωριούχο λίθιο που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρίας SIGMA (No L-8895) και ήταν σε μορφή σκόνης με καθαρότητα 99,2%.

Τα διαλύματα LiCl που χρησιμοποιήθηκαν έπρεπε να είναι αποστειρωμένα. Γι' αυτό η παρασκευή τους έγινε ως εξής: σε αποστειρωμένο νερό προστέθηκε η απαραίτητη ποσότητα αποστειρωμένης σκόνης LiCl. Η αποστείρωση της σκόνης του LiCl έγινε στους 200 °C για 1 ώρα. Τα παραπάνω αποστειρωμένα διαλύματα LiCl τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα μπουκαλάκια των 15 ml. Στη συνέχεια τα αποστειρωμένα μπουκαλάκια τοποθετήθηκαν στο ψυγείο ώστε να μην υπάρχουν ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξη μικροβίων. Έτσι διατηρήθηκαν στους 4 °C κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.



Για την παρασκευή λοιπόν διαλύματος 0,15 M LiCl σε 1 λίτρο αποστειρωμένο νερό προστέθηκαν και διαλύθηκαν 6,36 gr αποστειρωμένης σκόνης χλωριούχου λιθίου. Ενώ για την παρασκευή διαλύματος 0,6 M LiCl σε 1 λίτρο αποστειρωμένο νερό προστέθηκαν και διαλύθηκαν 25,44 gr αποστειρωμένης σκόνης χλωριούχου λιθίου.

### 4.3 Πειράματα

Για την μελέτη των επιδράσεων του λιθίου στο κολλαγόνο δέρματος ποντικών έγιναν πειράματα με διάφορες δόσεις και με διαφορετικές διάρκειες χορήγησης του λιθίου. Αυτό έγινε για να διαπιστωθεί αν οι επιδράσεις του λιθίου στο κολλαγόνο εξαρτώνται από τη δόση και από τη διάρκεια χορήγησης του στα πειραματόζωα.

#### 4.3.1 Πρώτο πείραμα - Καθημερινές ενέσεις για 1- μήνα με δόση 1,5 meq Li/Kg ζώου

Σε 12 πειραματόζωα δόθηκε καθημερινά με ενδοπεριτοναϊκή ένεση 1,5 meq Li/Kg βάρους τους. Οι ενέσεις διήρκησαν 1 μήνα. Μετά το τέλος των ενέσεων τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες των τριών ζώων. Τα πειραματόζωα της πρώτης, δεύτερης, τρίτης και τέταρτης ομάδας θυσιάστηκαν 1- μέρα, 1-, 2- και 6- μήνες μετά το τέλος των ενέσεων αντίστοιχα.

Η καθημερινή δόση 1,5 meq Li/Kg βάρους του πειραματοζώου επιλέχθηκε γιατί αυτή είναι η δόση που χρησιμοποιείται συνήθως στους ασθενείς στην ψυχιατρική για την θεραπεία και την προφύλαξη της μανίας και της κατάθλιψης (Wissocq *et al.*, 1979).





Η ηλικία των πειραματοζώων της πρώτης, δεύτερης, τρίτης και τέταρτης ομάδας κατά την θυσία τους ήταν 9-, 13-, 17- και 33- εβδομάδες αντίστοιχα. 14 πειραματόζωα (Swiss Albino mice) χρησιμοποιήθηκαν για μάρτυρες. Στα πειραματόζωα αυτά δεν έγιναν ενέσεις. Τα ζώα αυτά χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες των 3 ή των 4 ποντικών και θυσιάστηκαν σε ηλικίες 9-, 13-, 17- και 33- εβδομάδων. Σκοπός είναι να γίνει σύγκριση των ινιδίων κολλαγόνου δέρματος των πειραματοζώων που δέχθηκαν λίθιο με τα ινίδια από τους μάρτυρες αντίστοιχης ηλικίας.

Στο διάγραμμα 4.1 περιγράφεται παραστατικά το πείραμα, τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι μάρτυρες αντίστοιχης ηλικίας.

Οι ενέσεις έγιναν με διάλυμα LiCl συγκέντρωσης 0,15 M. Ο υπολογισμός του καθημερινού απαιτούμενου όγκου ενέσιμου διαλύματος έγινε ως εξής:

$$\frac{1,5 \text{ meq Li}}{\text{Kg πειρ / ζώου}} = \frac{1,5 \text{ mmole LiCl}}{\text{Kg πειρ / ζώου}} \quad (5)$$

$$1,5 \text{ mmole LiCl} = (1,5 \times 10^{-3} \times \text{M.B.}_{(\text{LiCl})}) \text{ gr LiCl} \Rightarrow$$

$$1,5 \text{ mmole LiCl} = (1,5 \times 10^{-3} \times 42,4) \text{ gr LiCl} \Rightarrow$$

$$1,5 \text{ mmole LiCl} = 63,6 \text{ mgr LiCl} \quad (6)$$

Από τις (5) και (6) προκύπτει:

$$\frac{1,5 \text{ meq Li}}{\text{Kg πειρ / ζώου}} = \frac{63,6 \text{ mgr LiCl}}{\text{Kg πειρ / ζώου}} \Rightarrow$$

$$\frac{1,5 \text{ meq Li}}{\text{Kg πειρ / ζώου}} = \frac{0,0636 \text{ mgr LiCl}}{\text{gr πειρ / ζώου}} \quad (7)$$



Όπως δείξαμε πιο πριν διάλυμα 0,15 M LiCl σημαίνει ότι 1 λίτρο διαλύματος περιέχει 6,36 gr καθαρού LiCl :

$$0,15 \text{ M LiCl} = \frac{6,36 \text{ gr LiCl}}{1 \text{ lt διαλ / τος}} \Rightarrow$$

$$0,15 \text{ M LiCl} = \frac{0,0636 \text{ mgr LiCl}}{0,01 \text{ ml διαλ / τος}} \quad (8)$$

Από τις (7) και (8) προκύπτει ότι για να δοθεί σε κάθε πειραματόζωο δόση 1,5 meq Li/Kgr βάρους του θα πρέπει να ενεθεί 0,01 ml διαλύματος 0,15 M LiCl για κάθε γραμμάριο του ζώου, δηλαδή:

$$\frac{1,5 \text{ meq Li}}{\text{Kg πειρ / ζώου}} = \frac{0,01 \text{ ml διαλύματος } 0,15 \text{ M LiCl}}{\text{gr πειρ / ζώου}} \quad (9)$$

Για τον υπολογισμό λοιπόν του καθημερινού όγκου ενέσιμου διαλύματος 0,15 M LiCl σε κάθε πειραματόζωο, ζυγίζεται το πειραματόζωο και στη συνέχεια υπολογίζεται ο απαιτούμενος όγκος από τη σχέση (9). Τα πειραματόζωα είχαν συνήθως βάρος από 20 - 30 gr και επομένως ο όγκος του καθημερινού ενέσιμου διαλύματος για κάθε πειραματόζωο ήταν από 0,2 έως 0,3 ml.



Πρώτο πείραμα

Ηλικία ποντικών στην αρχή των πειραμάτων : 5 εβδομάδες		
Δοκιμασία	Χρόνος που θυσιάστηκαν τα ζώα μετά την τελευταία ένεση - (αριθμός ποντικών)	Αριθμός μαρτύρων αντίστοιχης ηλικίας
<p>1 μήνα καθημερινή ενδοπεριτοναϊκή ένεση με 1,5 meq Li / Kg</p> <p>Σύνολο ζώων που δέχονται την ένεση: 12 ποντίκια</p>	<p>1 μέρα (3 ποντίκια)</p>	3 ποντίκια
	<p>1 μήνα (3 ποντίκια)</p>	3 ποντίκια
	<p>2 μήνες (3 ποντίκια)</p>	4 ποντίκια
	<p>6 μήνες (3 ποντίκια)</p>	4 ποντίκια

Διάγραμμα 4.1: Περιγραφή του πρώτου πειράματος, όπου τα πειραματόζωα δέχονται για 1 μήνα καθημερινή ενδοπεριτοναϊκή ένεση με 1,5 meq Li/Kg βάρους τους.



#### 4.3.2 Δεύτερο πείραμα - Καθημερινές ενέσεις για 1- μήνα με δόση 6 meq Li/Kg ζώου

Σε 14 πειραματόζωα δόθηκε καθημερινά με ενδοπεριτοναϊκή ένεση 6 meq Li/Kg βάρους τους. Οι ενέσεις διήρκησαν 1 μήνα. Μετά το τέλος των ενέσεων τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες των τριών ή τεσσάρων ζώων. Τα πειραματόζωα της πρώτης, δεύτερης, τρίτης και τέταρτης ομάδας θυσιάστηκαν 1- μέρα, 1-, 2- και 6- μήνες μετά το τέλος των ενέσεων αντίστοιχα.

Η καθημερινή δόση 6 meq Li/Kg βάρους του πειραματοζώου επιλέχθηκε στην προσπάθεια για διευκόλυνση της ανίχνευσης των ανωμαλιών στο κολλαγόνο δέρματος που προκαλούνται από το λίθιο. Επίσης επιλέχθηκε μια δόση μεγαλύτερη από αυτή του πρώτου πειράματος για να ελεγχθεί κατα πόσο με την αύξηση της δόσης οι βλάβες στο κολλαγόνο δέρματος γίνονται εντονότερες. Πρέπει εδώ να σημειωθεί ότι για δόσεις μεγαλύτερες των 6 meq Li/Kg ζώου τα ποντίκια εμφάνισαν μετά από μερικές μέρες μυϊκή αδυναμία. Το ίδιο έχει παρατηρηθεί και από άλλους ερευνητές (Wissocq *et al.*, 1979). Μάλιστα οι ερευνητές αυτοί παρατήρησαν ότι με δόση 19 meq Li/Kg ζώου τα περισσότερα από τα ποντίκια πεθαίνουν μετά από την πρώτη ένεση.

Η ηλικία των πειραματοζώων της πρώτης, δεύτερης, τρίτης και τέταρτης ομάδας κατά την θυσία τους ήταν 9-, 13-, 17- και 33- εβδομάδες αντίστοιχα. Για μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν 14 πειραματόζωα (Swiss Albino mice). Στα πειραματόζωα αυτά δεν έγιναν ενέσεις. Τα ζώα αυτά χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες των 3 ή των 4 ποντικίων και θυσιάστηκαν σε ηλικίες 9-, 13-, 17- και 33- εβδομάδων. Σκοπός είναι να γίνει σύγκριση των ινιδίων κολλαγόνου δέρματος των πειραματοζώων που δέχθηκαν λίθιο με τα ινίδια από τους μάρτυρες αντίστοιχης ηλικίας.

Στο διάγραμμα 4.2 περιγράφεται παραστατικά το πείραμα, τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι μάρτυρες αντίστοιχης ηλικίας.



Οι ενέσεις έγιναν με διάλυμα LiCl συγκέντρωσης 0,6 M. Ο υπολογισμός του καθημερινού απαιτούμενου όγκου ενέσιμου διαλύματος έγινε ως εξής:

$$\frac{6 \text{ meq Li}}{\text{Kg πειρ / ζώου}} = \frac{6 \text{ mmole LiCl}}{\text{Kg πειρ / ζώου}} \quad (10)$$

$$6 \text{ mmole LiCl} = (6 \times 10^{-3} \times \text{M.B.}_{(\text{LiCl})}) \text{ gr LiCl} \Rightarrow$$

$$6 \text{ mmole LiCl} = (6 \times 10^{-3} \times 42,4) \text{ gr LiCl} \Rightarrow$$

$$6 \text{ mmole LiCl} = 254,4 \text{ mgr LiCl} \quad (11)$$

Από τις (10) και (11) προκύπτει:

$$\frac{6 \text{ meq Li}}{\text{Kg πειρ / ζώου}} = \frac{254,4 \text{ mgr LiCl}}{\text{Kg πειρ / ζώου}} \Rightarrow$$

$$\frac{6 \text{ meq Li}}{\text{Kg πειρ / ζώου}} = \frac{0,2544 \text{ mgr LiCl}}{\text{gr πειρ / ζώου}} \quad (12)$$

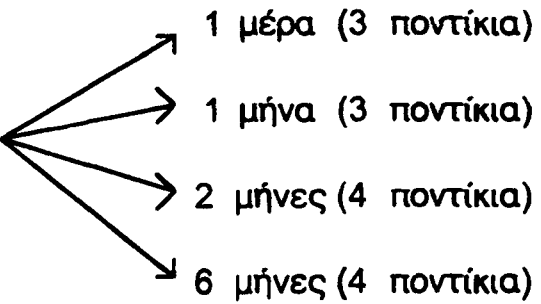
Όπως δείξαμε πιο πριν διάλυμα 0,6 M LiCl σημαίνει ότι 1 λίτρο διαλύματος περιέχει 25,44 gr καθαρού LiCl :

$$0,6 \text{ M LiCl} = \frac{25,44 \text{ gr LiCl}}{1 \text{ lt διαλ / τος}} \Rightarrow$$

$$0,6 \text{ M LiCl} = \frac{0,2544 \text{ mgr LiCl}}{0,01 \text{ ml διαλ / τος}} \quad (13)$$



## Δεύτερο πείραμα

Ηλικία ποντικών στην αρχή των πειραμάτων : 5 εβδομάδες		
Δοκιμασία	Χρόνος που θυσιάστηκαν τα ζώα μετά την τελευταία ένεση - (αριθμός ποντικών)	Αριθμός μαρτύρων αντίστοιχης ηλικίας
<p>1 μήνα καθημερινή ενδοπεριτοναϊκή ένεση με 6 meq Li / Kg</p> <p>Σύνολο ζώων που δέχονται την ένεση: 14 ποντίκια</p>	 <p>1 μέρα (3 ποντίκια)</p> <p>1 μήνα (3 ποντίκια)</p> <p>2 μήνες (4 ποντίκια)</p> <p>6 μήνες (4 ποντίκια)</p>	<p>3 ποντίκια</p> <p>3 ποντίκια</p> <p>4 ποντίκια</p> <p>4 ποντίκια</p>

**Διάγραμμα 4.2:** Περιγραφή του δεύτερου πειράματος, όπου τα πειραματόζωα δέχονται για 1 μήνα καθημερινή ενδοπεριτοναϊκή ένεση με 6 meq Li/Kg βάρους τους.



Από τις (12) και (13) προκύπτει ότι για να δοθεί σε κάθε πειραματόζωο δόση 6 meq Li/Kg βάρους του θα πρέπει να ενεθεί 0,01 ml διαλύματος 0,6 M LiCl για κάθε γραμμάριο του ζώου, δηλαδή:

$$\frac{6 \text{ meq Li}}{\text{Kg πειρ / ζώου}} = \frac{0,01 \text{ ml διαλύματος } 0,6 \text{ M LiCl}}{\text{gr πειρ / ζώου}} \quad (14)$$

Για τον υπολογισμό λοιπόν του καθημερινού όγκου ενέσιμου διαλύματος 0,6 M LiCl σε κάθε πειραματόζωο, ζυγίζεται το πειραματόζωο και στη συνέχεια υπολογίζεται ο απαιτούμενος όγκος από τη σχέση (14). Τα πειραματόζωα είχαν συνήθως βάρος από 20 - 30 gr και επομένως ο όγκος του καθημερινού ενέσιμου διαλύματος για κάθε πειραματόζωο ήταν από 0,2 έως 0,3 ml.

#### 4.3.3 Τρίτο πείραμα - Καθημερινές ενέσεις για 1- μήνα με δόση 0,7 meq Li/Kg ζώου

Σε 16 πειραματόζωα δόθηκε καθημερινά με ενδοπεριτοναϊκή ένεση 0,7 meq Li/Kg βάρους τους. Οι ενέσεις διήρκησαν 1 μήνα. Μετά το τέλος των ενέσεων τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες των τεσσάρων ζώων. Τα πειραματόζωα της πρώτης, δεύτερης, τρίτης και τέταρτης ομάδας θυσιάστηκαν 1- μέρα, 1-, 2- και 6- μήνες μετά το τέλος των ενέσεων αντίστοιχα.

Η καθημερινή δόση 0,7 meq Li/Kg βάρους του πειραματοζώου επιλέχθηκε για να ερευνηθεί αν σε αυτή τη μικρή δόση εξακολουθούν να υπάρχουν οι δομικές αλλοιώσεις που προκαλεί το λίθιο στο κολλαγόνο και



για να γίνει σύγκριση με εκείνες που παρατηρούνται όταν στα πειραματόζωα χορηγούνται για το ίδιο χρονικό διάστημα μεγαλύτερες δόσεις των 1,5 και 6 meq Li/Kg.

Όπως και στα προηγούμενα πειράματα η ηλικία των πειραματοζώων της πρώτης, δεύτερης, τρίτης και τέταρτης ομάδας κατά την θυσία τους ήταν 9-, 13-, 17- και 33- εβδομάδες αντίστοιχα. Για μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν 14 πειραματόζωα (Swiss Albino mice). Στα πειραματόζωα αυτά δεν έγιναν ενέσεις. Τα ζώα αυτά χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες των 3 ή των 4 ποντικών και θυσιάστηκαν σε ηλικίες 9-, 13-, 17- και 33- εβδομάδων. Σκοπός είναι να γίνει σύγκριση των ινιδίων κολλαγόνου δέρματος των πειραματοζώων που δέχθηκαν λίθιο με τα ινίδια από τους μάρτυρες αντίστοιχης ηλικίας.

Στο διάγραμμα 4.3 περιγράφεται παραστατικά το πείραμα, τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι μάρτυρες αντίστοιχης ηλικίας.

Οι ενέσεις έγιναν με διάλυμα LiCl συγκέντρωσης 0,15 M. Ο υπολογισμός του καθημερινού απαιτούμενου όγκου ενέσιμου διαλύματος έγινε ως εξής:

$$\frac{0,7 \text{ meq Li}}{\text{Kg πειρ / ζώου}} = \frac{0,7 \text{ mmole LiCl}}{\text{Kg πειρ / ζώου}} \quad (15)$$

$$0,7 \text{ mmole LiCl} = (0,7 \times 10^{-3} \times \text{M.B.}_{(\text{LiCl})}) \text{ gr LiCl} \Rightarrow$$

$$0,7 \text{ mmole LiCl} = (0,7 \times 10^{-3} \times 42,4) \text{ gr LiCl} \Rightarrow$$

$$0,7 \text{ mmole LiCl} = 29,68 \text{ mgr LiCl} \quad (16)$$





Από τις (15) και (16) προκύπτει:

$$\frac{0,7 \text{ meq Li}}{\text{Kg πειρ / ζώου}} = \frac{29,68 \text{ mgr LiCl}}{\text{Kg πειρ / ζώου}} \Rightarrow$$

$$\frac{0,7 \text{ meq Li}}{\text{Kg πειρ / ζώου}} = \frac{0,02968 \text{ mgr LiCl}}{\text{gr πειρ / ζώου}} \quad (17)$$

Όπως δείξαμε πιο πριν διάλυμα 0,15 M LiCl σημαίνει ότι 1 λίτρο διαλύματος περιέχει 6,36 gr καθαρού LiCl :

$$0,15 \text{ M LiCl} = \frac{6,36 \text{ gr LiCl}}{1 \text{ lt διαλ / τος}} \Rightarrow$$

$$0,15 \text{ M LiCl} = \frac{0,02968 \text{ mgr LiCl}}{0,00467 \text{ ml διαλ / τος}} \quad (18)$$

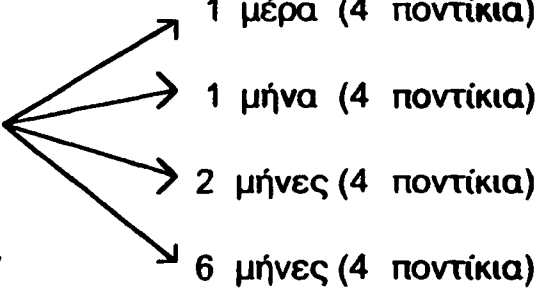
Από τις (17) και (18) προκύπτει ότι για να δοθεί σε κάθε πειραματόζωο δόση 0,7 meq Li/Kgr βάρους του θα πρέπει να ενεθεί 0,00467 ml διαλύματος 0,15 M LiCl για κάθε γραμμάριο του ζώου, δηλαδή:

$$\frac{0,7 \text{ meq Li}}{\text{Kg πειρ / ζώου}} = \frac{0,00467 \text{ ml διαλύματος } 0,15 \text{ M LiCl}}{\text{gr πειρ / ζώου}} \quad (19)$$

Για τον υπολογισμό λοιπόν του καθημερινού όγκου ενέσιμου διαλύματος 0,15 M LiCl σε κάθε πειραματόζωο, ζυγίζεται το πειραματόζωο και στη συνέχεια υπολογίζεται ο απαιτούμενος όγκος από τη σχέση (19). Όπως ήδη αναφέρθηκε, τα πειραματόζωα είχαν συνήθως βάρος από 20 - 30 gr και επομένως ο όγκος του καθημερινού ενέσιμου διαλύματος για κάθε πειραματόζωο ήταν περίπου από 0,10 έως 0,15 ml.



### Τρίτο πείραμα

Ηλικία ποντικών στην αρχή των πειραμάτων : 5 εβδομάδες		
Δοκιμασία	Χρόνος που θυσιάστηκαν τα ζώα μετά την τελευταία ένεση - (αριθμός ποντικών)	Αριθμός μαρτύρων αντιστοιχικής ηλικίας
<p>1 μήνα καθημερινή ενδοπεριτοναϊκή ένεση με 0,7 meq Li / Kg</p> <p>Σύνολο ζώων που δέχονται την ένεση: 16 ποντίκια</p>	 <p>1 μέρα (4 ποντίκια) 1 μήνα (4 ποντίκια) 2 μήνες (4 ποντίκια) 6 μήνες (4 ποντίκια)</p>	<p>3 ποντίκια 3 ποντίκια 4 ποντίκια 4 ποντίκια</p>

**Διάγραμμα 4.3:** Περιγραφή του τρίτου πειράματος, όπου τα πειραματόζωα δέχονται για 1 μήνα καθημερινή ενδοπεριτοναϊκή ένεση με 0,7 meq Li/Kg βάρους τους.



#### 4.3.4 Τέταρτο πείραμα - Καθημερινές ενέσεις για 1-, ή 2- εβδομάδες με δόση 1,5 meq Li/Kg ζώου

Σε 14 πειραματόζωα δόθηκε καθημερινά με ενδοπεριτοναϊκή ένεση 1,5 meq Li/Kg βάρους τους. Οι ενέσεις διήρκησαν 2 εβδομάδες (6 πειραματόζωα) ή 1 εβδομάδα (8 πειραματόζωα). Μετά το τέλος των ενέσεων τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε ομάδες των τριών ή τεσσάρων ζώων. Πειραματόζωα θυσιάστηκαν 1- μέρα και 1- ή 2- εβδομάδες μετά την τελευταία ένεση.

Σκοπός του πειράματος αυτού είναι να ερευνηθεί αν με την κοινή κλινική δόση 1,5 meq Li/Kg βάρους του ζώου όταν χορηγείται για μικρότερο χρονικό διάστημα (1- ή 2- εβδομάδες) εξακολουθούν να παρατηρούνται αλλοιώσεις στο κολλαγόνο δέρματος προκαλούμενες από το λίθιο. Επίσης γίνεται σύγκριση με τις παρατηρήσεις του πρώτου πειράματος, όπου χρησιμοποιείται η ίδια δόση σε μεγαλύτερη διάρκεια (1- μήνα).


Η ηλικία των πειραματοζώων κατά την θυσία τους ήταν 6-, 7- και 9- εβδομάδες. Για μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν 9 πειραματόζωα (Swiss Albino mice). Στα ζώα αυτά δεν έγιναν ενέσεις. Τα ζώα χωρίστηκαν σε ομάδες και θυσιάστηκαν σε ηλικίες 6-, 7- και 9- εβδομάδων.

Στο διάγραμμα 4.4 περιγράφεται παραστατικά το πείραμα, τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι μάρτυρες αντίστοιχης ηλικίας.

Οι ενέσεις έγιναν με διάλυμα LiCl συγκέντρωσης 0,15 M. Ο υπολογισμός του απαιτούμενου καθημερινού όγκου ενέσιμου διαλύματος σε κάθε πειραματόζωο έγινε όπως και στο πρώτο πείραμα, μια και στα δύο πειράματα απαιτείται η ίδια καθημερινή δόση και χρησιμοποιείται διάλυμα χλωριούχου λιθίου ίδιας συγκέντρωσης.



## Τέταρτο πείραμα

Ηλικία ποντικών στην αρχή των πειραμάτων : 5 εβδομάδες		
Δοκιμασία	Χρόνος που θυσιάστηκαν τα ζώα μετά την τελευταία ένεση - (αριθμός ποντικών)	Αριθμός μαρτύρων αντίστοιχης ηλικίας
<b>1 εβδομάδα</b>  <b>και</b>  <b>2 εβδομάδες</b>  <b>καθημερινή ενδοπεριτοναϊκή ένεση με 1,5 meq Li / Kg</b>	 1 μέρα (4 ποντίκια)	3 ποντίκια
	1 εβδομάδα (4 ποντίκια)	3 ποντίκια
	1 μέρα (3 ποντίκια)	3 ποντίκια
	2 εβδομάδες (3 ποντίκια)	3 ποντίκια
Σύνολο ζώων που δέχονται την ένεση: 14 ποντίκια		

Διάγραμμα 4.4: Περιγραφή του τέταρτου πειράματος, όπου τα πειραματόζωα δέχονται για 1-, ή 2- εβδομάδες καθημερινή ενδοπεριτοναϊκή ένεση με 1,5 meq Li/Kg βάρους τους.



#### 4.3.5 Πέμπτο πείραμα - Καθημερινές ενέσεις για 1- εβδομάδα με δόση 0,7 meq Li/Kg ζώου

Σε 8 πειραματόζωα δόθηκε καθημερινά με ενδοπεριτοναϊκή ένεση 0,7 meq Li/Kg βάρους τους. Οι ενέσεις διήρκησαν 1 εβδομάδα. Μετά το τέλος των ενέσεων τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε δύο ομάδες των τεσσάρων ζώων. Τα πειραματόζωα της πρώτης ομάδας θυσιάστηκαν 1-μέρα μετά την τελευταία ένεση, ενώ τα πειραματόζωα της δεύτερης ομάδας θυσιάστηκαν 1 εβδομάδα μετά την τελευταία ένεση.

Σκοπός του πειράματος αυτού είναι να ερευνηθεί αν με δόση 0,7 meq Li/Kg βάρους του ζώου, που είναι αρκετά μικρότερη από την κοινή κλινική δόση και με μικρή διάρκεια χορήγησης του λιθίου (1 εβδομάδα) εξακολουθούν να παρατηρούνται αλλοιώσεις στο κολλαγόνο δέρματος προκαλούμενες από το λίθιο. Επίσης γίνεται σύγκριση με τις παρατηρήσεις του τρίτου πειράματος, όπου χρησιμοποιείται η ίδια δόση σε μεγαλύτερη διάρκεια (1 μήνα), και με εκείνες του τέταρτου πειράματος στα πειραματόζωα που έχουμε ίδια διάρκεια θεραπείας αλλά μεγαλύτερη δόση (1,5 meq Li/Kg).

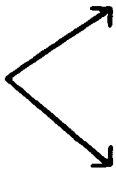
Η ηλικία των πειραματοζώων της πρώτης και δεύτερης ομάδας κατά την θυσία τους ήταν 6- και 7- εβδομάδες αντίστοιχα. Για μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν 6 πειραματόζωα (Swiss Albino mice) που θυσιάστηκαν σε ηλικίες 6- και 7- εβδομάδων.

Στο διάγραμμα 4.5 περιγράφεται παραστατικά το πείραμα, τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι μάρτυρες αντίστοιχης ηλικίας.

Οι ενέσεις έγιναν με διάλυμα LiCl συγκέντρωσης 0,15 M. Ο υπολογισμός του απαιτούμενου καθημερινού όγκου ενέσιμου διαλύματος σε κάθε πειραματόζωο έγινε όπως και στο τρίτο πείραμα αφού και στα δύο πειράματα απαιτείται η ίδια καθημερινή δόση και χρησιμοποιείται διάλυμα χλωριούχου λιθίου ίδιας συγκέντρωσης.



## Πέμπτο πείραμα

Ηλικία ποντικών στην αρχή των πειραμάτων : 5 εβδομάδες		
Δοκιμασία	Χρόνος που θυσιάστηκαν τα ζώα μετά την τελευταία ένεση - (αριθμός ποντικών)	Αριθμός μαρτύρων αντίστοιχης ηλικίας
1 εβδομάδα καθημερινή ενδοπεριτοναϊκή ένεση με 0,7 meq Li / Kg  Σύνολο ζώων που δέχονται την ένεση: 8 ποντίκια	 1 μέρα (4 ποντίκια)  1 εβδομάδα (4 ποντίκια)	3 ποντίκια  3 ποντίκια

**Διάγραμμα 4.5:** Περιγραφή του πέμπτου πειράματος, όπου τα πειραματόζωα δέχονται για 1 εβδομάδα καθημερινή ενδοπεριτοναϊκή ένεση με 0,7 meq Li/Kg βάρους τους.



#### 4.4 Προετοιμασία δειγμάτων δέρματος για ηλεκτρονική μικροσκοπία

Αμέσως μετά τη θυσία κάθε πειραματοζώου λαμβάνουμε μικρά κομμάτια δέρματος, περίπου  $1 \text{ mm}^2$ , από την περιοχή του αριστερού ώμου του ζώου. Τα κομμάτια αυτά επεξεργάζονται κατάλληλα για την εξέτασή τους στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Η προετοιμασία αυτή περιλαμβάνει τα στάδια της σταθεροποίησης, της αφυδάτωσης, του εμποτισμού, της κοπής πολύ λεπτών τομών και τέλος της χρώσης των τομών αυτών. Στη συνέχεια περιγράφονται αναλυτικά τα στάδια αυτά.

##### 4.4.1 Σταθεροποίηση των δειγμάτων δέρματος

Το πρώτο στάδιο επεξεργασίας των δειγμάτων είναι η σταθεροποίηση. Σκοπός της σταθεροποίησης, όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι να σταματήσουν οι βιολογικές αλλαγές που γίνονται μετά το θάνατο και να διατηρηθούν οι ιστοί σε μια τέτοια κατάσταση που να μοιάζει όσο το δυνατόν περισσότερο με την κατάσταση των ζωντανών ιστών.

Τα δείγματα δέρματος από κάθε πειραματόζωο αρχικά σταθεροποιούνται σε διάλυμα γλουταραλδεΐδης. Χρησιμοποιήθηκε γλουταραλδεΐδη της εταιρίας SERVA, με συγκέντρωση 25% σε νερό. Το διάλυμα της σταθεροποίησης έγινε ως εξής:

1. Αρχικά φτιάχτηκε διάλυμα κακοδυλικού νατρίου (sodium cacodylate) με συγκέντρωση 0,1 M και  $\text{pH} = 7,4$
2. Στο παραπάνω διάλυμα κακοδυλικού νατρίου προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα από το 25% διάλυμα γλουταραλδεΐδης ώστε τελικά να φτιαχτεί διάλυμα του οποίου η συγκέντρωση σε γλουταραλδεΐδη να είναι 2,5%.



Η αρχική λοιπόν σταθεροποίηση γίνεται με διάλυμα 2,5% γλουταραλδεΐδης σε 0,1 M κακοδυλικό νάτριο στους 4 °C και διαρκεί όλη τη νύχτα.

Στη συνέχεια τα δείγματα ξεπλένονται 2 φορές με διάλυμα 0,1 M κακοδυλικού νατρίου, pH 7,4. Επειτα γίνεται δεύτερη σταθεροποίηση με 1% τετροξειδίου του οσμίου (osmium tetroxide) σε 0,1 M κακοδυλικό νάτριο, pH 7,4.

Χρησιμοποιήθηκε τετροξειδίου του οσμίου ( $O_5O_4$ ) της εταιρίας MERCK. Το τετροξειδίο ήταν σε κρυσταλλική μορφή. Το τελικό διάλυμα του σταθεροποιητού φτιάχτηκε με τρόπο όμοιο με εκείνο της γλουταραλδεΐδης

Η σταθεροποίηση γίνεται στους 4 °C και διαρκεί 2 ώρες. Μετά και από την σταθεροποίηση με τετροξειδίου του οσμίου τα δείγματα δέρματος ξεπλένονται 2 φορές με διάλυμα 0,1 M κακοδυλικού νατρίου. Τέλος ξεπλένονται 2 φορές με δις-απεσταγμένο νερό.





#### 4.4.2 Αφυδάτωση των δειγμάτων δέρματος

Το επόμενο στάδιο μετά την σταθεροποίηση είναι η αφυδάτωση. Η αφυδάτωση γίνεται για να αφαιρεθεί από τα κύτταρα το νερό.

Στα δείγματα η αφυδάτωση έγινε με διαδοχικά εμβάπτισματα σε μίγματα αιθυλικής αλκοόλης με νερό βαθμιαίου αυξανόμενου βαθμού: 50%, 70%, 90% και 100% για 15 ή 30 λεπτά. Τα στάδια της αφυδάτωσης ήταν τα εξής:

1. Εμβάπτιση σε διάλυμα 50% αιθυλικής αλκοόλης για 15 λεπτά.
2. Εμβάπτιση σε διάλυμα 70% αιθυλικής αλκοόλης για 15 λεπτά.  
Η εμβάπτιση αυτή επαναλαμβάνεται 3 φορές.
3. Εμβάπτιση σε διάλυμα 90% αιθυλικής αλκοόλης για 30 λεπτά.  
Η εμβάπτιση αυτή επαναλαμβάνεται 2 φορές.
4. Εμβάπτιση σε διάλυμα 100% αιθυλικής αλκοόλης για 30 λεπτά.  
Η εμβάπτιση αυτή επαναλαμβάνεται 3 φορές.

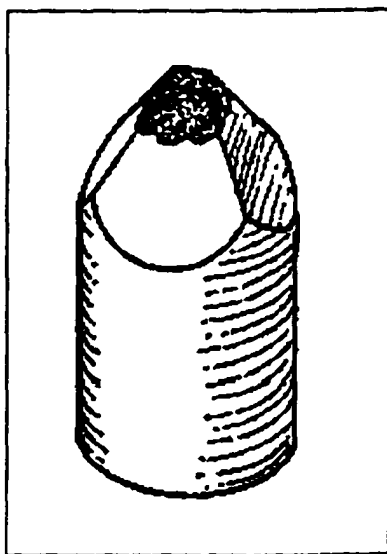
Η διαδικασία αυτή γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου.



#### 4.4.3 Εμποτισμός των δειγμάτων δέρματος

Μετά την αφυδάτωση ακολουθεί ο εμποτισμός (ή στερέωση). Κατά τον εμποτισμό η ρητίνη μπαίνει σε όλα τα μεσοκυττάρια διαστήματα, ακόμη και στα κύτταρα κάνοντας τους ιστούς πολύ ανθεκτικούς στο κόψιμο.

Στο στάδιο αυτό τα δείγματα αρχικά εμποτίζονται με το οξειδίο του προπυλενίου (propylene oxide), που είναι το διαλυτικό της ρητίνης. Χρησιμοποιήθηκε διάλυμα propylene oxide (1,2- Epoxy propane) ( $C_3H_6O$ ) της εταιρίας SERVA. Έτσι τα δείγματα εβαππίζονται 2 φορές στο παραπάνω διάλυμα. Η κάθε εμβάπτιση διαρκεί 15 λεπτά και γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετούνται σε ένα μίγμα από οξειδίο του προπυλενίου και ρητίνη με αναλογία 1/1 και παραμένουν σε ανοικτά μπουκαλάκια στο μίγμα αυτό όλη τη νύχτα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το διαλυτικό της ρητίνης (propylene oxide) με το οποίο είχαν εμποτιστεί οι ιστοί σιγά σιγά εξατμίζεται και οι χώροι που αδειάζουν γεμίζουν με ρητίνη.



Σχήμα 4.1: Τεμάχιο ρητίνης που δημιουργείται κατά τον εμποτισμό των δειγμάτων δέρματος. Μέσα στο τεμάχιο αυτό στο πάνω μέρος βρίσκεται το δείγμα δέρματος.



Τέλος τα δείγματα δέρματος τοποθετούνται σε κάψουλες με φρέσκο ρευστό διάλυμα ρητίνης. Οι κάψουλες με τα δείγματα και τη ρητίνη τοποθετούνται στο φούρνο στους 60 °C για 48 ώρες όπου γίνεται ο πολυμερισμός της ρητίνης και σιγά σιγά πήζει. Έτσι παίρνουμε τεμάχια ρητίνης μέσα στα οποία βρίσκονται τα δείγματα δέρματος, όπως φαίνεται και στο σχήμα 4.1

Για τη δημιουργία της ρητίνης χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά:

1. 2-Dodeceny succinic acid anhydride ή DDSA ( $C_{16}H_{26}O_3$ ) της εταιρίας SERVA.
2. Araldite CY 212 της εταιρίας SERVA
3. Resin 812 της εταιρίας TAAB
4. Επιταχυντής DMP-30 (2,4,6-TRI(DIMETHYLAMINOMETHYL) PHENOL της εταιρίας TAAB

Εγινε ανάμειξη των παραπάνω υλικών με τις εξής αναλογίες:

12 ml DDSA  
4 ml Araldite  
5 ml Resin 812  
0,6 ml DMP



#### 4.4.4 Κοπή πολύ λεπτών τομών

Κατά την εξέταση των βιολογικών δειγμάτων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης ηλεκτρόνια αλληλεπιδρούν με το δείγμα. Τα άτομα του δείγματος αναγκάζουν αρκετά από τα ηλεκτρόνια να σκεδαστούν. Τα ηλεκτρόνια που σκεδάζονται ισχυρά δεν συνεισφέρουν στο σχηματισμό της εικόνας. Εκείνα όμως που διαπερνούν το δείγμα ή δεν σκεδάζονται ισχυρά πέφτουν πάνω σε φθορίζουσα οθόνη και έτσι σχηματίζονται οι φωτεινές περιοχές στην εικόνα. Ενώ οι σκοτεινές περιοχές αντιστοιχούν στα μέρη του δείγματος όπου τα άτομα έχουν σκεδάσει ισχυρά τα ηλεκτρόνια. Μ' αυτόν τον τρόπο δημιουργείται αντίθεση στην εικόνα.

Η αντίθεση στην εικόνα αυξάνεται όταν το πάχος της τομής του βιολογικού δείγματος γίνεται μικρό. Τα ηλεκτρόνια, στα ηλεκτρονικά μικροσκόπια διέλευσης που χρησιμοποιούνται, επιταχύνονται σε δυναμικό που κυμαίνεται από 20 KV έως 100 KV. Με ηλεκτρόνια τέτοιας ενέργειας οι τομές των βιολογικών δειγμάτων πρέπει να είναι της τάξης των μερικών nm.

Ο σπουδαιότερος όμως λόγος για τον οποίο τα δείγματα πρέπει να είναι πολύ λεπτά είναι το χρωματικό σφάλμα. Όταν το δείγμα είναι παχύ, ο αριθμός των ατόμων που αλληλεπιδρά με τα ηλεκτρόνια είναι μεγάλος με αποτέλεσμα να υπάρχουν ηλεκτρόνια με τελείως διαφορετικές ταχύτητες και επομένως με μεγάλες διακυμάνσεις μήκους κύματος. Αυτό έχει σαν συνέπεια τα ηλεκτρόνια να εστιάζονται σε διαφορετικά σημεία και το είδωλο να εμφανίζεται θολό. Τα λεπτά δείγματα, λόγω του μικρού αριθμού ατόμων που περιέχουν, μετριάζουν κατά πολύ το φαινόμενο αυτό.

Κατά την προετοιμασία λοιπόν των δειγμάτων για το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο το επόμενο στάδιο μετά τον εμποτισμό είναι η δημιουργία πολύ λεπτών τομών. Η δημιουργία τέτοιων τομών από το κομμάτι της ρητίνης μέσα στο οποίο βρίσκεται ο ιστός (σχήμα 4.1), γίνεται με υπερμικροτόμο. Χρησιμοποιήθηκε ο υπερμικροτόμος (ULTRACUT E) της εταιρίας REICHERT-JUNG. Για την κοπή των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε διαμάντινο μαχαίρι.

Το πάχος της τομής των δειγμάτων ήταν από 40 nm έως και 90 nm. Το πάχος αυτό κρίνεται από το χρώμα που έχουν οι τομές καθώς επιπλέουν στο υγρό όπου συλλέγονται. Στη συνέχεια οι τομές τοποθετούνται πάνω σε ένα χάλκινο πλέγμα (grid) ώστε να διευκολύνεται ο χειρισμός και η μεταφορά τους.

#### 4.4.5 Χρώση των λεπτών τομών των δειγμάτων δέρματος

Τα περισσότερα από τα άτομα στα βιολογικά δείγματα έχουν μικρό ατομικό αριθμό και επομένως μικρή ικανότητα σκέδασης των ηλεκτρονίων. Επίσης, όπως έχει ήδη αναφερθεί, η σκέδαση δεν διαφέρει πολύ από ένα μέρος του δείγματος σε ένα άλλο. Οι εικόνες, λοιπόν, των βιολογικών δειγμάτων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έχουν πολύ μικρή αντίθεση.

Ο βασικότερος τρόπος με τον οποίο πετυχαίνεται αύξηση της αντίθεσης είναι εκείνος κατά τον οποίο βαριά μεταλλικά άτομα ενσωματώνονται στο βιολογικό δείγμα. Αυτό συμβαίνει γιατί τα άτομα αυτά σκεδάζουν έντονα τη δέσμη των ηλεκτρονίων. Η παραπάνω διαδικασία λέγεται χρώση. Το τελευταίο στάδιο, λοιπόν, κατά την προετοιμασία των δειγμάτων για το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο είναι η χρώση των πολύ λεπτών τομών των δειγμάτων.

Οι πολύ λεπτές τομές των δειγμάτων δέρματος χρωματίστηκαν θετικά (βλέπε παράγραφο 3.14 για τη θετική χρώση) με φωσφοροβολφραμικό οξύ και με οξικό ουρανύλιο. Τα διαλύματα της χρώσης ήταν:

α) 2% φωσφοροβολφραμικό οξύ (phosphotungstic acid) (PTA)  
με  $\text{pH} = (3,2 - 3,4)$ . Το pH ρυθμίζεται με διάλυμα 1N NaOH.

β) 2% οξικό ουρανύλιο (uranyl acetate) (UA)  
με  $\text{pH} = (4,2 - 4,4)$ . Το pH ρυθμίζεται με διάλυμα 0,1N NaOH.



Η διαδικασία της χρώσης είναι η εξής:

- 1) τα χάλκινα πλέγματα με τις τομές των βιολογικών δειγμάτων τοποθετούνται σε διάλυμα 2% φωσφοροβολφραμικού οξέος για 1 ώρα.
- 2) οι τομές ξεπλένονται με δις-απεσταγμένο νερό (περίπου 10 σταγόνες) και στη συνέχεια στεγνώνονται, όχι όμως πλήρως.
- 3) στη συνέχεια τα πλέγματα με τις τομές των βιολογικών δειγμάτων τοποθετούνται σε διάλυμα 2% οξικού ουρανυλίου για 1/2 ώρα.
- 4) οι τομές ξεπλένονται με απεσταγμένο νερό (περίπου 10 σταγόνες) και στη συνέχεια στεγνώνονται καλά.

Έτσι οι λεπτές τομές των δειγμάτων δέρματος είναι έτοιμες για την παρατήρησή τους στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.



#### 4.5 Ηλεκτρονική μικροσκοπία

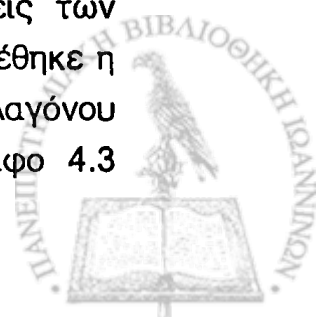
Οι λεπτές χρωματισμένες τομές των δειγμάτων δέρματος εξετάστηκαν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Χρησιμοποιήθηκε το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο JEOL JEM 100CX-II. Για την επιτάχυνση των ηλεκτρονίων χρησιμοποιήθηκε δυναμικό 80 KV. Ο αστιγματισμός διορθώθηκε παρατηρώντας τα δακτυλίδια Fresnel στα άκρα των οπών των πολύ λεπτών τομών των δειγμάτων.

Φωτογραφήθηκαν περιοχές τόσο παράλληλες όσο και εγκάρσιες προς τα ινίδια κολλαγόνου. Ηλεκτρονικές μικρογραφίες πάρθηκαν με μεγενθύνσεις από 8.000 έως 100.000. Για την βαθμονόμηση της μεγένθυσης του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου χρησιμοποιήθηκαν ειδικά πλέγματα (grid) τα grating replicas. Για τις ηλεκτρονικές μικρογραφίες χρησιμοποιήθηκαν αρνητικά Kodak (Kodak Electron microscope film Estar Thick Base 4489). Για την εμφάνιση των αρνητικών χρησιμοποιήθηκαν υγρά της Kodak: α) developer D-19 και β) fixer. Η διαδικασία αυτή γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου.

#### 4.6 Ανάλυση των ηλεκτρονικών μικρογραφιών

Όπως αναφέρθηκε, φωτογραφήθηκαν περιοχές παράλληλες και εγκάρσιες με τα ινίδια κολλαγόνου. Από τις φωτογραφίες σε περιοχές εγκάρσιες με τα ινίδια κολλαγόνου έγιναν μετρήσεις της διαμέτρου των ινιδίων κολλαγόνου. Για κάθε πειραματόζωο μετρήθηκαν τουλάχιστον 400 ινίδια από 4 τουλάχιστον διαφορετικές περιοχές. Στις μετρήσεις αυτές έγινε στατιστική ανάλυση και βρέθηκε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της διαμέτρου των ινιδίων για κάθε πειραματόζωο.

Σε κάθε ένα από τα πειράματα, σε όλες τις μετρήσεις των πειραματοζώων της ίδιας ομάδας έγινε στατιστική ανάλυση και βρέθηκε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της διαμέτρου των ινιδίων κολλαγόνου για κάθε ομάδα. Σε κάθε ομάδα όπως είδαμε στην παράγραφο 4.3



υπήρχαν τουλάχιστον 3 πειραματόζωα. Άρα η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της διαμέτρου των ινιδίων για κάθε ομάδα υπολογίστηκε από 1200 τουλάχιστον ινίδια και από 12 τουλάχιστον διαφορετικές περιοχές.

Χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό t-test για μη συζευμένα δείγματα για να γίνει η σύγκριση της διαμέτρου των ινιδίων μεταξύ μιας ομάδας με τους μάρτυρες αντίστοιχης ηλικίας ή μεταξύ δύο ομάδων. Όλες οι παραπάνω στατιστικές αναλύσεις έγιναν με την βοήθεια ενός προσωπικού υπολογιστή (personal computer).

Για την μελέτη της αρχιτεκτονικής των ινιδίων χρησιμοποιήθηκαν φωτογραφίες σε περιοχές παράλληλες με τα ινίδια κολλαγόνου. Οι φωτογραφίες αυτές των πειραματοζώων που δέχθηκαν λίθιο συγκρίθηκαν με αυτές των αντίστοιχων μαρτύρων. Παρόμοια σύγκριση έγινε και με φωτογραφίες σε περιοχές εγκάρσιες με τα ινίδια κολλαγόνου. Ακόμη, από φωτογραφίες με μεγάλη μεγένθυση έγινε σύγκριση του υποδείγματος θετικής χρώσης των ινιδίων κολλαγόνου από πειραματόζωα που δέχθηκαν λίθιο με εκείνο των αντίστοιχων μαρτύρων. Από τις παραπάνω συγκρίσεις έγιναν διάφορες παρατηρήσεις που θα τις δούμε αναλυτικά στα αποτελέσματα.





#### 4.7 Ανάλυση υποδειγμάτων θετικής χρώσης ινιδίων κολλαγόνου

Φωτογραφίες με μεγένθυση  $M_{HM} = 53.000$  από τομές παράλληλες με τα ινίδια κολλαγόνου χρησιμοποιήθηκαν για να γίνει επεξεργασία κατά μήκος των ινιδίων κολλαγόνου ή με άλλα λόγια ανάλυση σε υποδείγματα θετικής χρώσης ινιδίων κολλαγόνου.

Τα αρνητικά από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο με τα υποδείγματα θετικής χρώσης τυπώνονται σε χαρτί με μεγένθυση  $M_{\varphi} = 2,2$ . Άρα η συνολική μεγένθυση των υποδειγμάτων είναι:

$$M_{ολ} = M_{HM} \times M_{\varphi} = 53.000 \times 2,2 \Rightarrow$$

$$M_{ολ} = 116.600 \quad (20)$$

Για να γίνει ανάλυση των υποδειγμάτων θετικής χρώσης ινιδίων κολλαγόνου, αρχικά οι εικόνες των υποδειγμάτων ψηφιοποιούνται. Στην συνέχεια στις ψηφιοποιημένες εικόνες γίνεται επεξεργασία χρησιμοποιώντας κατάλληλο πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνας. Τέλος τα δεδομένα που παίρνουμε από την επεξεργασία εικόνας αναλύονται κατάλληλα με τη βοήθεια προγραμμάτων που δημιουργήθηκαν ειδικά για το σκοπό αυτό. Στη συνέχεια περιγράφονται αναλυτικά κάθε ένα από τα στάδια κατά την ανάλυση των υποδειγμάτων.

Η μελέτη του υποδείγματος θετικής χρώσης (positive staining pattern) μπορεί να αποτελέσει ένα αξιοσημείωτο δείκτη για την ανίχνευση δομικών ανωμαλιών στο κολλαγόνο προερχόμενες από διάφορους παράγοντες (Tzaphlidou, 1991). Στόχος μας λοιπόν κατά την ανάλυση των υποδειγμάτων θετικής χρώσης είναι να μελετήσουμε σε υπερμικροσκοπικό επίπεδο τις δομικές αλλαγές του κολλαγόνου προερχόμενες από την δράση του λιθίου. Με την μέθοδο που αναλύουμε παρακάτω μπορούμε να βρούμε την κατανομή των φορτισμένων αμινοξέων ή αλλιώς την κατανομή των φορτίων κατά μήκος του άξονα των ινιδίων από πειραματόζωα που δέχθηκαν λίθιο και να την συγκρίνουμε με αυτή των αντίστοιχων μαρτύρων ή με την αντίστοιχη κατανομή από θεωρητικά δεδομένα. Γνωρίζοντας την αλληλουχία των αμινοξέων κολλαγόνου τύπου I και III



που βρίσκονται στο δέρμα και τη δομή του ινιδίου και του μορίου κολλαγόνου, μπορούμε με την μαθηματική και στατιστική αυτή επεξεργασία των δεδομένων να εντοπίσουμε σε ποιο σημείο του ινιδίου ή ακόμη και του μορίου του κολλαγόνου έχουμε ανωμαλίες προερχόμενες από το λίθιο. Έτσι, δημιουργείται ένα μοντέλο που μπορεί να εφαρμοστεί σε κάθε ινώδη πρωτεΐνη και για κάθε είδος θεραπευτικής αγωγής από το οποίο αποκομίζονται πολύ σημαντικές πληροφορίες για την ερμηνεία των αλλοιώσεων που προκαλούνται στο κολλαγόνο ή σε άλλες ινώδεις πρωτεΐνες από διάφορους παράγοντες, όπως για παράδειγμα λίθιο, ή διάφορες αρρώστιες. Ακόμη μπορούμε να εξετάσουμε κατά πόσο ο λόγος κολλαγόνου I/III αλλάζει με το λίθιο, παράμετρος ιδιαίτερα σημαντική στον καθορισμό της διαμέτρου των ινιδίων. Σύγκριση της πρόσληψης χρώσης (staining uptake) από κολλαγόνο με λίθιο και χωρίς λίθιο μπορεί να μας προσφέρει αξιόλογες παρατηρήσεις για τον τρόπο δράσης του λιθίου με τα φορτισμένα αμινοξέα.

#### 4.7.1 Ψηφιοποίηση στις εικόνες των υποδειγμάτων

Το πρώτο βήμα κατά την ανάλυση των υποδειγμάτων είναι η ψηφιοποίηση των εικόνων τους από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο τυπωμένων σε χαρτί. Για την ψηφιοποίηση των εικόνων χρησιμοποιήθηκε ψηφιοποιητής (scanner) κατάλληλα συνδεδεμένος με έναν υπολογιστή. Ο ψηφιοποιητής που χρησιμοποιήθηκε είναι ο Scanner Epson GT6000.

Κατά την ψηφιοποίηση των εικόνων των υποδειγμάτων επιλέχθηκαν κατάλληλα στοιχεία ώστε τα 4,5 εκατοστά στο χαρτί να χωρίζονται σε 500 σημεία.

4,5 cm στο χαρτί → 500 σημεία

Άρα η διακριτική ικανότητα Δ.Ι. (resolution) πάνω στο χαρτί είναι:



$$\Delta.l. (\text{στο χαρτί}) = \frac{4,5 \text{ cm}}{500} \Rightarrow$$

$$\Delta.l. (\text{στο χαρτί}) = 9 \times 10^{-5} \text{ m} \quad (21)$$

Η διακριτική ικανότητα  $\Delta.l.$  πάνω στα ινίδια υπολογίζεται λαμβάνοντας υπόψη την ολική μεγένθυση  $M_{ολ}$  πάνω στο χαρτί. Έτσι έχουμε :

$$\Delta.l. (\text{στα ινίδια}) = \frac{\Delta.l. (\text{στο χαρτί})}{M_{ολ}} \quad (22)$$

Από τη σχέση (22) βρίσκουμε την διακριτική ικανότητα στα ινίδια αντικαθιστώντας το  $\Delta.l.$  (στο χαρτί) από τη σχέση (21) και το  $M_{ολ}$  από τη σχέση (20). Έτσι παίρνουμε:

$$\Delta.l. (\text{στα ινίδια}) = \frac{9 \times 10^{-5} \text{ m}}{116.600} \Rightarrow$$

$$\Delta.l. (\text{στα ινίδια}) = 0,8 \text{ nm} \quad (23)$$

Αρα με τις συνθήκες που επιλέχθηκαν η διακριτική ικανότητα πάνω στα ινίδια είναι 0,8 nm. Η διακριτική αυτή ικανότητα είναι πολύ καλή και μας επιτρέπει να δούμε τις λεπτομέρειες που θέλουμε κατά την ανάλυση των υποδειγμάτων θετικής χρώσης των ινιδίων.



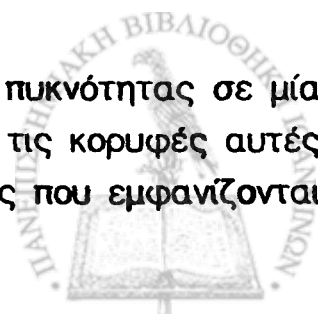
Με το σύστημα της ψηφιοποίησης θα μπορούσαμε επιλέγοντας κατάλληλες συνθήκες να πάρουμε ακόμα καλύτερη διακριτική ικανότητα. Αυτό όμως δεν έχει νόημα να γίνει γιατί η καλύτερη διακριτική ικανότητα που παίρνουμε με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σε βιολογικά δείγματα, όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι 2 - 3 nm. Αρα η διακριτική ικανότητα του όλου συστήματος δεν περιορίζεται από τον ψηφιοποιητή αλλά από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Μέσα λοιπόν από την ανάλυση αυτή των υποδειγμάτων θετικής χρώσης ινιδίων κολλαγόνου παίρνουμε πληροφορίες στο επίπεδο των (2 - 3)nm. Οι πληροφορίες αυτές είναι πολύ σημαντικές και μπορεί να βοηθήσουν στην κατανόηση των αλλοιώσεων στο κολλαγόνο.

#### 4.7.2 Εύρεση της καμπύλης κατανομής των φορτίων κατά μήκος των ινιδίων κολλαγόνου

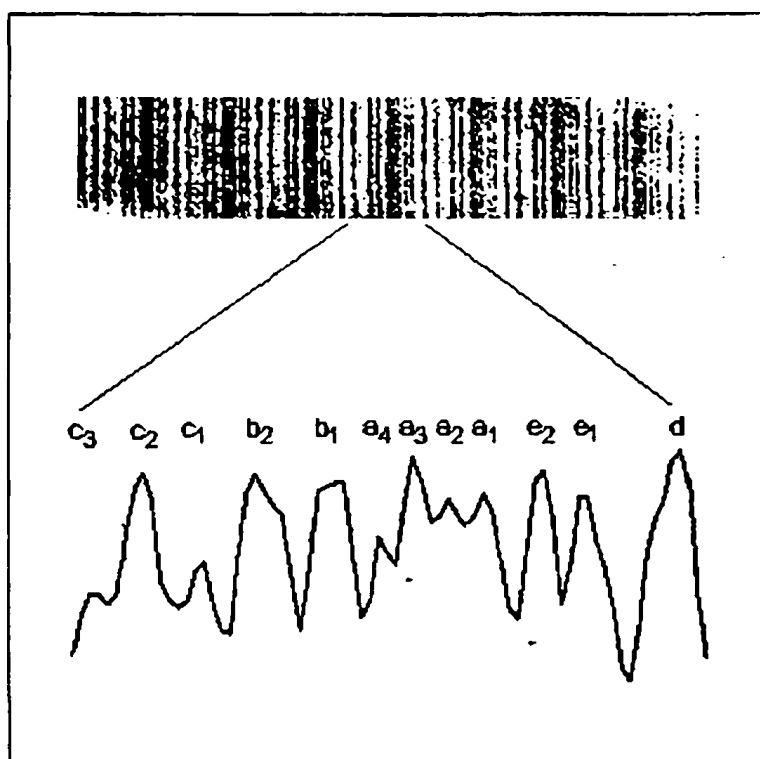
Το δεύτερο βήμα κατά την ανάλυση των υποδειγμάτων είναι η ψηφιακή επεξεργασία των ψηφιοποιημένων εικόνων που πήραμε από τα υποδείγματα. Η ψηφιακή επεξεργασία γίνεται με τη βοήθεια του προγράμματος Image Pro Plus (IPPLUS). Το πρόγραμμα αυτό είναι ένα πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνας.

Με τη βοήθεια του προγράμματος IPPLUS στις ψηφιοποιημένες εικόνες γίνεται πυκνομετρία κατά μήκος του ινιδίου κολλαγόνου σε κάθε περίοδο D. Μετά από την πυκνομετρία κάθε περίοδος D χαρακτηρίζεται από μια σειρά αριθμών η γραφική παράσταση των οποίων δείχνει την κατανομή της πυκνότητας σε αυτή την περίοδο κατά μήκος του άξονα του ινιδίου. Στο σχήμα 4.2 βλέπουμε το υπόδειγμα θετικής χρώσης ενός φυσιολογικού ινιδίου κολλαγόνου και την γραφική παράσταση της κατανομής της πυκνότητας σε μία περίοδο, όπως προκύπτει μετά από την πυκνομετρία.

Στην γραφική παράσταση της κατανομής της πυκνότητας σε μία περίοδο παρατηρούνται 12 κορυφές. Η κάθε μία από τις κορυφές αυτές αντιστοιχεί σε μία από τις 12 χαρακτηριστικές ταινίες που εμφανίζονται



σε μια περίοδο στο υπόδειγμα θετικής χρώσης ενός φυσιολογικού ινιδίου κολλαγόνου. Η αντιστοιχία των κορυφών της γραφικής παράστασης με τις ταινίες στο υπόδειγμα, ακολουθώντας την κλασσική ονομασία (Hodge and Schmitt, 1960) φαίνεται στο σχήμα 4.2.



Σχήμα 4.2: Το υπόδειγμα θετικής χρώσης ενός φυσιολογικού ινιδίου κολλαγόνου και η γραφική παράσταση της κατανομής της πυκνότητας σε μία περίοδο, όπως προκύπτει μετά από την πυκνομετρία. Στο σχήμα φαίνεται και η αντιστοιχία των 12 κορυφών της γραφικής παράστασης με τις 12 ταινίες που εμφανίζονται σε μια περίοδο στο υπόδειγμα θετικής χρώσης ινιδίου κολλαγόνου με την κλασσική ονομασία (Hodge and Schmitt, 1960).

5)

Οι 12 χαρακτηριστικές ταινίες, που εμφανίζονται σε κάθε περίοδο D, οφείλονται στις αλληλεπιδράσεις των μεταλλικών ιόντων της χρώσης με τα φορτισμένα αμινοξέα του κολλαγόνου (Hodge and Schmitt, 1960;



Kuhn and Zimmer, 1961), όπως έχει ήδη αναφερθεί. Αρα, η γραφική παράσταση της πυκνότητας κατά μήκος του άξονα του ινιδίου δίνει πληροφορίες για την κατανομή των φορτισμένων αμινοξέων ή με άλλα λόγια για την κατανομή των φορτίων κατά μήκος του άξονα του ινιδίου κολλαγόνου.

Από την πυκνομετρία, για κάθε περίοδο προκύπτει ένα σύνολο δεδομένων τα οποία αποθηκεύονται σε ένα αρχείο στον υπολογιστή. Τα αρχεία αυτά όπως δημιουργούνται από το πρόγραμμα IPPLUS δεν είναι σε κατάλληλη μορφή για να γίνει η επεξεργασία τους με γλώσσες προγραμματισμού. Δημιουργήθηκε γι' αυτό πρόγραμμα το οποίο τροποποιεί τα παραπάνω αρχεία και τους δίνει τέτοια μορφή ώστε να είναι επιτρεπτή η επεξεργασία τους από γλώσσες προγραμματισμού. Το πρόγραμμα αυτό φαίνεται στο παράρτημα 1.

#### 4.7.3 Εύρεση της καμπύλης του μέσου όρου της κατανομής των φορτίων

Για τη βελτίωση του λόγου σήμα προς θόρυβο κατά την εύρεση της κατανομής των φορτίων κατά μήκος των ινιδίων απαιτείται η εύρεση του μέσου όρου της κατανομής των φορτίων από πολλές περιόδους D. Γι' αυτό σε κάθε περίπτωση γίνεται πυκνομετρία σε πολλές περιόδους (τουλάχιστον 80) από ινίδια κολλαγόνου διαφόρων περιοχών και βρίσκεται ο μέσος όρος. Για κάθε περίοδο προκύπτει μια καμπύλη που δείχνει την κατανομή της πυκνότητας στην περίοδο. Σε κάθε περίπτωση πρέπει να βρεθεί από τις καμπύλες των διαφόρων περιόδων μια καμπύλη που θα εκφράζει το μέσο όρο της πυκνότητας σε μια περίοδο για τη συγκεκριμένη περίπτωση. Αρα η καμπύλη αυτή θα εκφράζει και την πιθανότερη κατανομή των φορτισμένων αμινοξέων ή με άλλα λόγια των φορτίων του κολλαγόνου μέσα σε κάθε περίοδο D. Στο παράρτημα 2 φαίνεται ένα από τα προγράμματα που δημιουργήθηκαν για το σκοπό αυτό. Το πρόγραμμα αυτό βρίσκει και την καμπύλη του μέσου όρου της

κατανομής της πυκνότητας σε κάθε περίπτωση και άρα την καμπύλη του μέσου όρου της κατανομής των φορτίων κατά μήκος των ινιδίων.

Τα βήματα που έγιναν για την εύρεση της καμπύλης του μέσου όρου της κατανομής της πυκνότητας ήταν τα εξής: α) όλες οι καμπύλες περιγράφονται από τον ίδιο αριθμό σημείων β) βρίσκεται η θέση στην οποία ταιριάζουν καλύτερα οι καμπύλες γ) γίνονται διορθώσεις στις καμπύλες με έναν πολλαπλασιαστικό και έναν προσθετικό παράγοντα και δ) άθροισμα καμπυλών για την εύρεση του μέσου όρου. Κάθε ένα από τα βήματα αυτά αναφέρονται αναλυτικά στη συνέχεια.

### 1) Καμπύλες με ίδιο αριθμό σημείων

Για την εύρεση της καμπύλης του μέσου όρου της κατανομής της πυκνότητας πρέπει οι καμπύλες που εκφράζουν την κατανομή της πυκνότητας σε κάθε περίοδο να περιγράφονται όλες από τον ίδιο αριθμό στοιχείων. Αυτό δεν συμβαίνει αμέσως μετά την πυκνομετρία μια και η τιμή της περιόδου  $D$  χαρακτηρίζεται από μια διακύμανση.

Ο αριθμός των στοιχείων που περιγράφουν τις καμπύλες στις διάφορες περιόδους κυμαίνεται από 80 έως 100. Για να γίνουν οι καμπύλες έτσι ώστε να περιγράφονται από τον ίδιο αριθμό σημείων, χρησιμοποιήθηκε παρεμβολή (interpolation) με τη συνάρτηση cubic spline. Με την παρεμβολή μπορούμε να βρούμε την τιμή της πυκνότητας που αντιστοιχεί σε κάθε σημείο της καμπύλης. Αυτό γίνεται ως εξής:

Εστω μια καμπύλη περιγράφεται από  $m$  σημεία όπου στον άξονα των  $x$  ισχύει:

$$a = x_0 < x_1 < x_2 \dots < x_m = b$$

και για τα σημεία στον άξονα των  $y$  ισχύει ότι:

5)

$$f(x_i) = y_i \quad (0 \leq i \leq m)$$



Τότε για κάθε σημείο  $x$  μεταξύ δύο πειραματικών σημείων η τιμή της πυκνότητάς του,  $q_i(x)$ , δίδεται από την παρακάτω σχέση:

$$q_i(x) = ty_i + (1-t)y_{i-1} + h_i t(1-t) [(k_{i-1} - d_i)(1-t) - (k_i - d_i)t] \quad (24)$$

$$(i = 1, 2, 3, \dots, m)$$

όπου

$$x \in [x_{i-1}, x_i)$$

$$h_i = x_i - x_{i-1}$$

$$d_i = (y_i - y_{i-1}) / h_i$$

$$t = (x - x_{i-1}) / h_i$$

Για την εύρεση της πυκνότητας  $q_i(x)$  από την εξίσωση (24) πρέπει να υπολογιστούν οι συντελεστές  $k_i$ . Ο υπολογισμός των συντελεστών αυτών γίνεται από τις εξισώσεις που προκύπτουν θεωρώντας ότι η πρώτη και η δεύτερη παράγωγος στη σχέση (24) είναι συνεχής. Αν για παράδειγμα υπάρχουν 6 πειραματικά σημεία οι τιμές για τους 6 συντελεστές  $k_i$  βρίσκονται από το παρακάτω σύστημα εξισώσεων:

$$\begin{bmatrix} 2 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 4 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 4 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 4 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 4 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} k_0 \\ k_1 \\ k_2 \\ k_3 \\ k_4 \\ k_5 \end{bmatrix} = 3 \begin{bmatrix} d_1 \\ d_2 + d_1 \\ d_3 + d_2 \\ d_4 + d_3 \\ d_5 + d_4 \\ d_5 \end{bmatrix}$$





Στην περίπτωση μας υπάρχουν από 80 έως 100 πειραματικά σημεία και άρα οι συντελεστές βρίσκονται από ένα σύστημα που αποτελείται από 80 έως 100 εξισώσεις. Η επίλυση αυτών των συστημάτων γίνεται με πρόγραμμα που δημιουργήθηκε στον υπολογιστή. Το πρόγραμμα αυτό είναι τμήμα του προγράμματος της μικροπυκνομετρίας που φαίνεται στο παράρτημα 2.

Ολες οι καμπύλες μετά την παρεμβολή θα περιγράφονται από 120 σημεία. Το διάστημα λοιπόν  $[b - a]$  χωρίζεται σε 120 σημεία και για κάθε σημείο βρίσκεται η πυκνότητα  $q_i(x)$  που αντιστοιχεί σε αυτό με αντικατάσταση στην εξίσωση (24).

## 2) Ταίριασμα των καμπυλών

Το δεύτερο βήμα κατά την εύρεση του μέσου όρου των καμπυλών είναι το ταίριασμά τους. Αυτό επιτυγχάνεται ως εξής: μία από τις καμπύλες που θα αθροιστούν θεωρείται σταθερή (standard καμπύλη). Για κάθε μία από τις υπόλοιπες βρίσκεται η θέση που ταιριάζει καλύτερα με την standard καμπύλη. Η θέση αυτή βρίσκεται χρησιμοποιώντας το κριτήριο των ελαχίστων τετραγώνων:

$$\sum (F_i - T_i)^2 \quad (25)$$

όπου  $F_i$  τα σημεία της standard καμπύλης και  $T_i$  τα σημεία της άλλης καμπύλης.

Η καλύτερη ευθυγράμμιση των καμπυλών είναι στη θέση εκείνη όπου το άθροισμα στη σχέση (25) γίνεται ελάχιστο.



## 3) Διόρθωση των καμπυλών

Μετά την ευθυγράμμιση των καμπυλών γίνεται η διόρθωσή τους με έναν πολλαπλασιαστικό παράγοντα  $A$  και με έναν προσθετικό  $B$ . Η διόρθωση είναι απαραίτητη γιατί συχνά παίρνουμε φωτογραφίες με διαφορετική αμαύρωση. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε πολλούς παράγοντες όπως: σε διαφορετικό πάχος των τομών, σε διαφορετική φωτεινότητα στη δέσμη των ηλεκτρονίων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, σε διαφορετικό χρόνο εμφάνισης του αρνητικού, στον τρόπο με τον οποίο τυπώνονται τα αρνητικά στο χαρτί.

Η διόρθωση γίνεται με βάση την standard καμπύλη. Έτσι κάθε καμπύλη  $T$  μετά τη διόρθωση γίνεται  $T'$  όπου

$$T' = A \times T + B \quad (26)$$

$$A = \frac{\sum_{i=1}^m \frac{F_i - F_{i-1}}{T_i - T_{i-1}}}{m} \quad (27)$$

$$B = \frac{\sum F_i - \sum T_i}{m} \quad (28)$$

όπου  $F_i$  τα στοιχεία της standard καμπύλης και  $T_i$  τα στοιχεία της καμπύλης που γίνεται η διόρθωση.



Ο πολλαπλασιαστικός παράγοντας διορθώνει την διαφορά στην αμαύρωση που οφείλεται σε διαφορετική αντίθεση. Συχνά μια φωτογραφία βγαίνει πιο μαύρη ή πιο άσπρη από την stadard. Αυτό διορθώνεται με τον προσθετικό παράγοντα.

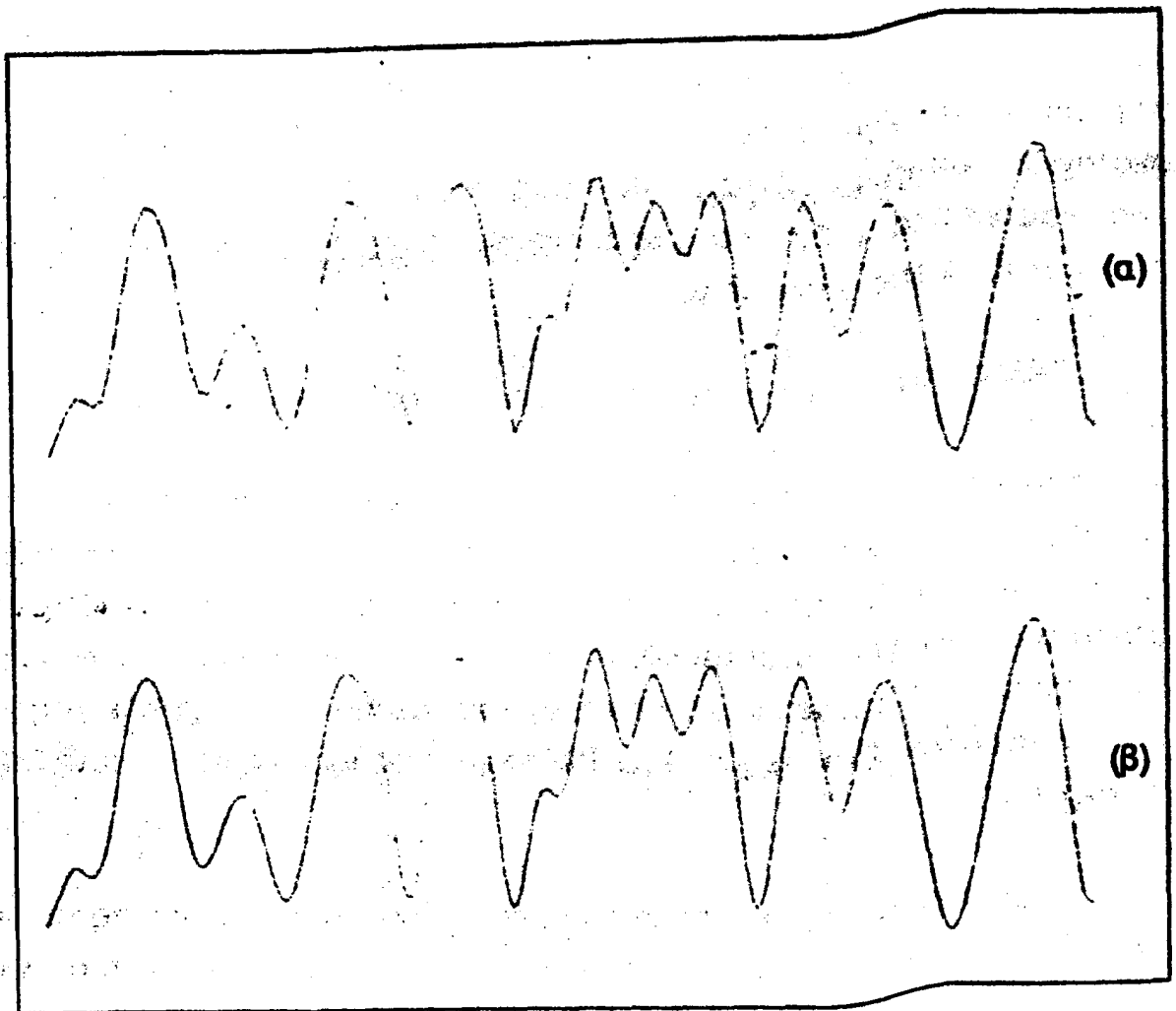
#### 4)Αθροισμα καμπυλών και εύρεση του μέσου όρου

Οι διορθωμένες πλέον καμπύλες αθροίζονται σημείο προς σημείο και βρίσκεται η καμπύλη του μέσου όρου σε κάθε περίπτωση. Στα πειράματα που έγιναν σε κάθε υποομάδα η καμπύλη του μέσου όρου υπολογίζεται από τουλάχιστον 80 περιόδους D. Οι περίοδοι λαμβάνονται από διαφορετικά ινίδια και από διαφορετικές περιοχές στα διάφορα πειραματόζωα της υποομάδας.

Τέλος στην καμπύλη του μέσου όρου γίνεται εξομάλυνση (smoothing). Το πρόγραμμα με το οποίο γίνεται η εξομάλυνση φαίνεται στο παράρτημα 3. Η εξομάλυνση γίνεται ως εξής: χρησιμοποιώντας τα 120 σημεία της καμπύλης του μέσου όρου με τη συνάρτηση cubic spline βρίσκονται οι τιμές της πυκνότητας για 1000 σημεία. Έτσι η καμπύλη του μέσου όρου περιγράφεται από 1000 σημεία και είναι πιο ομαλή από πριν. Στο σχήμα 4.3α φαίνεται μια καμπύλη του μέσου όρου της πυκνότητας σε μία περίοδο. Στο σχήμα 4.3β βλέπουμε την ίδια καμπύλη μετά από εξομάλυνση.

Μελετώντας την καμπύλη του μέσου όρου της πυκνότητας σε μία περίοδο παίρνουμε πληροφορίες για την κατανομή των φορτισμένων αμινοξέων κατά μήκος των ινιδίων. Με τον τρόπο αυτό ελέγχουμε σε κάθε περίπτωση αν υπάρχουν στην καμπύλη και οι 12 κορυφές, οι οποίες αντιστοιχούν στις 12 χαρακτηριστικές ταινίες σε μία περίοδο στο υπόδειγμα θετικής χρώσης των ινιδίων.





Σχήμα 4.3: (α): Μία καμπύλη του μέσου όρου της κατανομής της πυκνότητας σε μια περίοδο  $D$ . Στην καμπύλη δεν έχει γίνει εξομάλυνση. (β): Η ίδια καμπύλη μετά από εξομάλυνση.

#### 4.7.4 Σύγκριση καμπυλών κατανομής φορτίων

Στόχος μας κατά την ανάλυση των υποδειγμάτων θετικής χρώσης ινιδίων κολλαγόνου είναι να βρεθεί η καμπύλη του μέσου όρου της κατανομής των φορτίων μιας περίπτωσης (α) και να συγκριθεί με την αντίστοιχη των μαρτύρων (β). Για να γίνει η σύγκριση γίνονται τα εξής:

1) θεωρώντας σταθερή (standard καμπύλη) την καμπύλη των μαρτύρων (β) ευθυγραμμίζεται η καμπύλη (α) χρησιμοποιώντας το κριτήριο των ελαχίστων τετραγώνων (βλέπε παράγραφο 4.7.3 στο ταίριασμα των καμπυλών).

2) Στη θέση αυτή γίνεται διόρθωση της καμπύλης (α) και η καμπύλη γίνεται:

$$T' = A \times T + B$$

Οι συντελεστές A και B βρίσκονται από τις σχέσεις (27) και (28). Στις σχέσεις αυτές  $F_i$  είναι τα στοιχεία της καμπύλης των μαρτύρων (β) (standard καμπύλη) και  $T_i$  τα στοιχεία της καμπύλης (α) που γίνεται η διόρθωση.

3) Η διορθωμένη καμπύλη (α) και η αντίστοιχη καμπύλη των μαρτύρων (β) τυπώνονται η μία πάνω στην άλλη στη θέση που ταιριάζουν καλύτερα (ευθυγράμμιση των καμπυλών).

Από τη σύγκριση των δύο καμπυλών μπορούμε να ελέγξουμε αν υπάρχουν όλες οι κορυφές σε μία περίοδο, αν είναι μετατοπισμένες και αν έχουν την ίδια ένταση. Έτσι, στη συγκεκριμένη μελέτη, μπορούμε να διαπιστώσουμε αν το λίθιο έχει προκαλέσει δομικές αλλοιώσεις κατά μήκος των ινιδίων κολλαγόνου και ιδιαίτερα σε ποιο μέρος του ινιδίου ή και του μορίου συμβαίνουν. Με άλλα λόγια μπορούμε να ανιχνεύουμε σε υπερμικροσκοπικό επίπεδο το βαθμό διατήρησης της πρωτοταγούς και τριτοταγούς δομής.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΛΙΘΙΟΥ ΣΤΟ ΚΟΛΛΑΓΟΝΟ ΔΕΡΜΑΤΟΣ ΠΟΝΤΙΚΩΝ

#### I. ΜΕΛΕΤΗ ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗΣ ΙΝΙΔΙΩΝ ΚΟΛΛΑΓΟΝΟΥ ΣΕ ΥΠΕΡΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

##### 5.1 Εισαγωγή

Μελετήθηκε με ηλεκτρονική μικροσκοπία η επίδραση του λιθίου στο κολλαγόνο δέρματος ποντικών. Στη συνέχεια αναφέρονται αναλυτικά οι παρατηρήσεις που έγιναν κατά την εξέταση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο δειγμάτων δέρματος από τους μάρτυρες καθώς και από τα πειραματόζωα που δέχθηκαν λίθιο με τα παρακάτω δοσολογικά σχήματα:

1) Για 1 μήνα καθημερινή ενδοπεριτοναϊκή ένεση με δόσεις:

- α) 0,7 meq Li/Kg πειραματοζώου
- β) 1,5 meq Li/Kg πειραματοζώου και
- γ) 6 meq Li/Kg πειραματοζώου

2) Καθημερινή ενδοπεριτοναϊκή ένεση με δόση 1,5 meq Li/Kg πειραματοζώου για :

- α) 1 εβδομάδα και
- β) 2 εβδομάδες

3) Για 1 εβδομάδα καθημερινή ενδοπεριτοναϊκή ένεση με δόση 0,7 meq Li/Kg πειραματοζώου.



## 5.2 Αρχιτεκτονική ινιδίων κολλαγόνου και μορφομετρική ανάλυση στους μάρτυρες

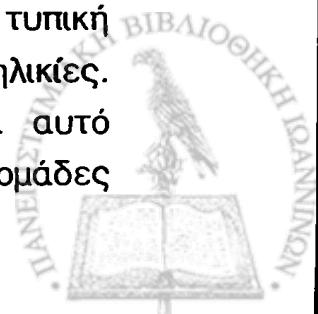
Σε παράλληλες τομές ινιδίων κολλαγόνου από πειραματόζωα στα οποία δεν χορηγήθηκε λίθιο, δηλαδή από μάρτυρες, τα ινίδια εμφανίζονται να είναι παράλληλα μεταξύ τους, όπως φαίνεται και στο σχήμα 5.1. Αυτή είναι μια χαρακτηριστική διάταξη ινιδίων φυσιολογικού κολλαγόνου από δέρμα. Η όλη δέσμη είναι καλά οργανωμένη και όλα τα ινίδια έχουν μεταξύ τους παράλληλη διεύθυνση. Επίσης δεν εμφανίζονται ινίδια που αλλάζουν διεύθυνση και φορά ή ινίδια με κυματοειδή μορφή.

Τα ινίδια από τους μάρτυρες σε εγκάρσιες τομές εμφανίζονται κατά πλειοψηφία με σχήμα στρογγυλό, ενώ το εμβαδόν τους (ή η διάμετρός τους) δεν εμφανίζει μεγάλες διακυμάνσεις. Στο σχήμα 5.2 φαίνεται μια τέτοια χαρακτηριστική διάταξη φυσιολογικών ινιδίων κολλαγόνου δέρματος, όπου πράγματι παρατηρείται ομοιογένεια στο σχήμα και στη διάμετρο των ινιδίων.

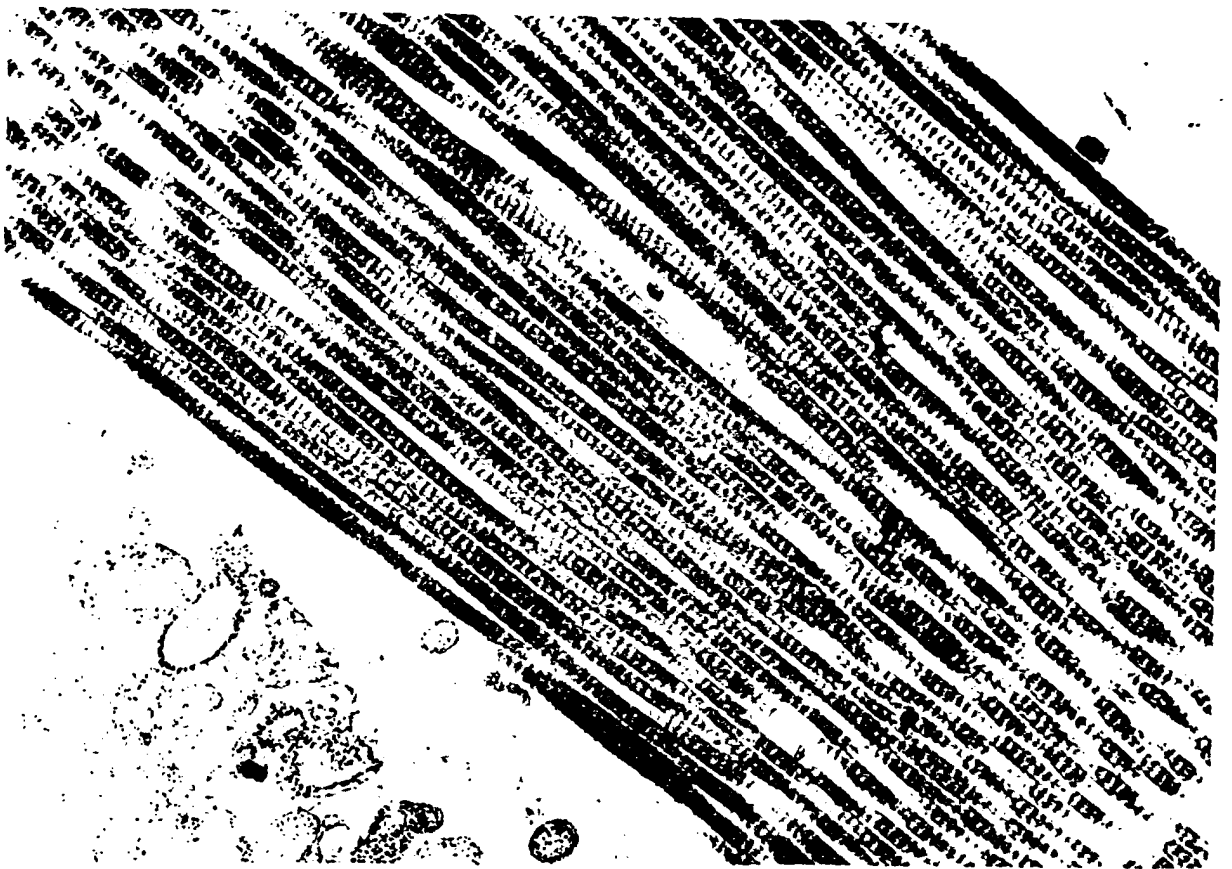
Από εγκάρσιες τομές επίσης μετρήθηκε η διάμετρος των ινιδίων. Όπως έχει ήδη αναφερθεί μετρήθηκαν τουλάχιστον 400 ινίδια για να βρεθεί η μέση τιμή της διαμέτρου των ινιδίων σε κάθε πειραματόζωο. Σε κάθε ομάδα μαρτύρων ίδιας ηλικίας μελετήθηκαν 3 με 4 πειραματόζωα και επομένως η μέση τιμή της διαμέτρου των ινιδίων κάθε ομάδας υπολογίστηκε τουλάχιστον από 1200 ινίδια.

Μεταξύ των μαρτύρων ίδιας ηλικίας η μέση τιμή της διαμέτρου των ινιδίων δεν παρουσιάζει σημαντικές διαφορές. Σαν παράδειγμα στο παράρτημα 4 φαίνεται αναλυτικά η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της διαμέτρου των ινιδίων κολλαγόνου σε κάθε ένα από τα πειραματόζωα μάρτυρες με ηλικία 33- εβδομάδων.

Για κάθε ομάδα μαρτύρων ίδιας ηλικίας, λαμβάνοντας υπόψη όλες τις μετρήσεις από όλα τα ζώα υπολογίστηκε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της διαμέτρου των ινιδίων κολλαγόνου στις διάφορες ηλικίες. Στον πίνακα 5.1 φαίνονται οι τιμές αυτές. Από τον πίνακα αυτό παρατηρείται ότι η μέση διάμετρος είναι περίπου ίδια σε όλες τις ομάδες



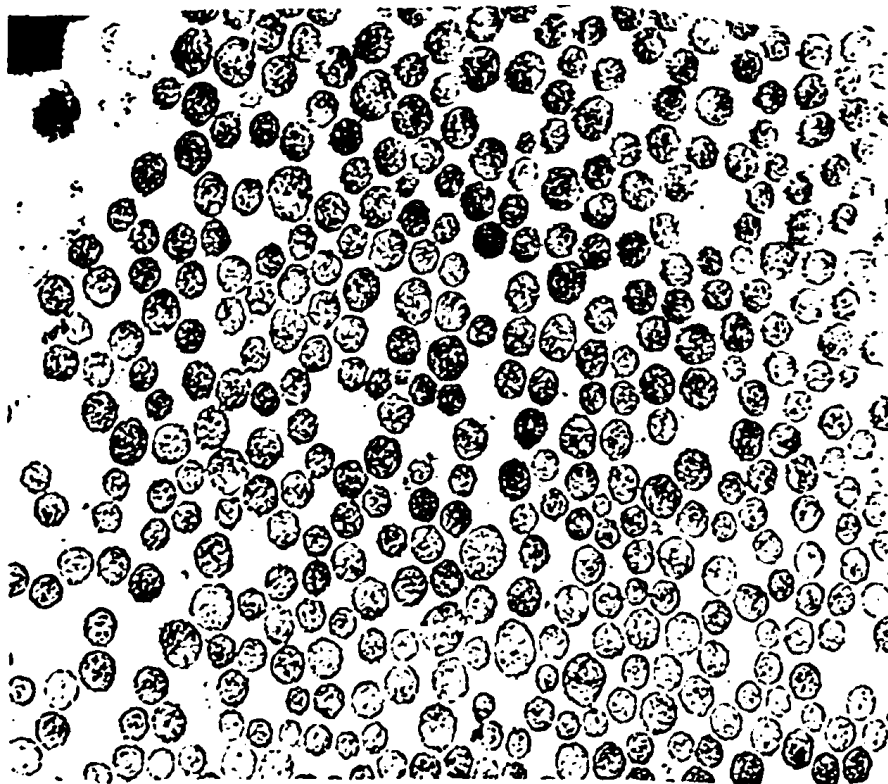
των μαρτύρων ανεξάρτητα από την ηλικία τους. Για το λόγο αυτό υπολογίστηκε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της διαμέτρου των ινιδίων κολλαγόνου από όλους τους μάρτυρες ανεξαρτήτως ηλικίας. Η τιμή αυτή είναι  $(109,3 \pm 11,2)$  nm. Άρα η μέση τιμή της διαμέτρου των φυσιολογικών ινιδίων κολλαγόνου είναι περίπου 109,3 nm ανεξάρτητα από την ηλικία του πειραματοζώου.



Σχήμα 5.1: Ινίδια κολλαγόνου από μάρτυρες. Τα ινίδια είναι καλά οργανωμένα με παράλληλη διεύθυνση. ( $\times 22.000$ ).







Σχήμα 5.2: Εγκάρσια τομή ινιδίων κολλαγόνου δέρματος από μάρτυρες ηλικίας 33- εβδομάδων. Τα ινίδια έχουν σχήμα κατά πλειοψηφία στρογγυλό και η διάμετρός τους δεν εμφανίζει μεγάλες διακυμάνσεις.

**Πίνακας 5.1:** Μέση τιμή και τυπική απόκλιση της διαμέτρου των ινιδίων κολλαγόνου δέρματος για κάθε μία ομάδα μαρτύρων ίδιας ηλικίας. Στην τελευταία γραμμή του πίνακα φαίνεται η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της διαμέτρου των ινιδίων κολλαγόνου όλων των μαρτύρων. Η τιμή αυτή υπολογίστηκε λαμβάνοντας όλες τις μετρήσεις από όλους τους μάρτυρες ανεξάρτητα από την ηλικία τους.

<b>Ηλικία μαρτύρων</b>	<b>Μέση τιμή και τυπική απόκλιση της διαμέτρου των ινιδίων κολλαγόνου στους μάρτυρες (nm)</b>
6- εβδομάδες	108,4 ± 8,9
7- εβδομάδες	108,1 ± 9,4
9- εβδομάδες	110,9 ± 9,1
13- εβδομάδες	107,5 ± 10,8
17- εβδομάδες	110,9 ± 10,8
33- εβδομάδες	109,1 ± 11,5
<b>Μέση τιμή και τυπική απόκλιση της διαμέτρου όλων των μαρτύρων</b>	<b>109,3 ± 11,2</b>



### 5.3 Επιδράσεις λιθίου στο κολλαγόνο δέρματος ποντικών που δέχθηκαν καθημερινή δόση 1,5 meq Li/Kg για 1- μήνα

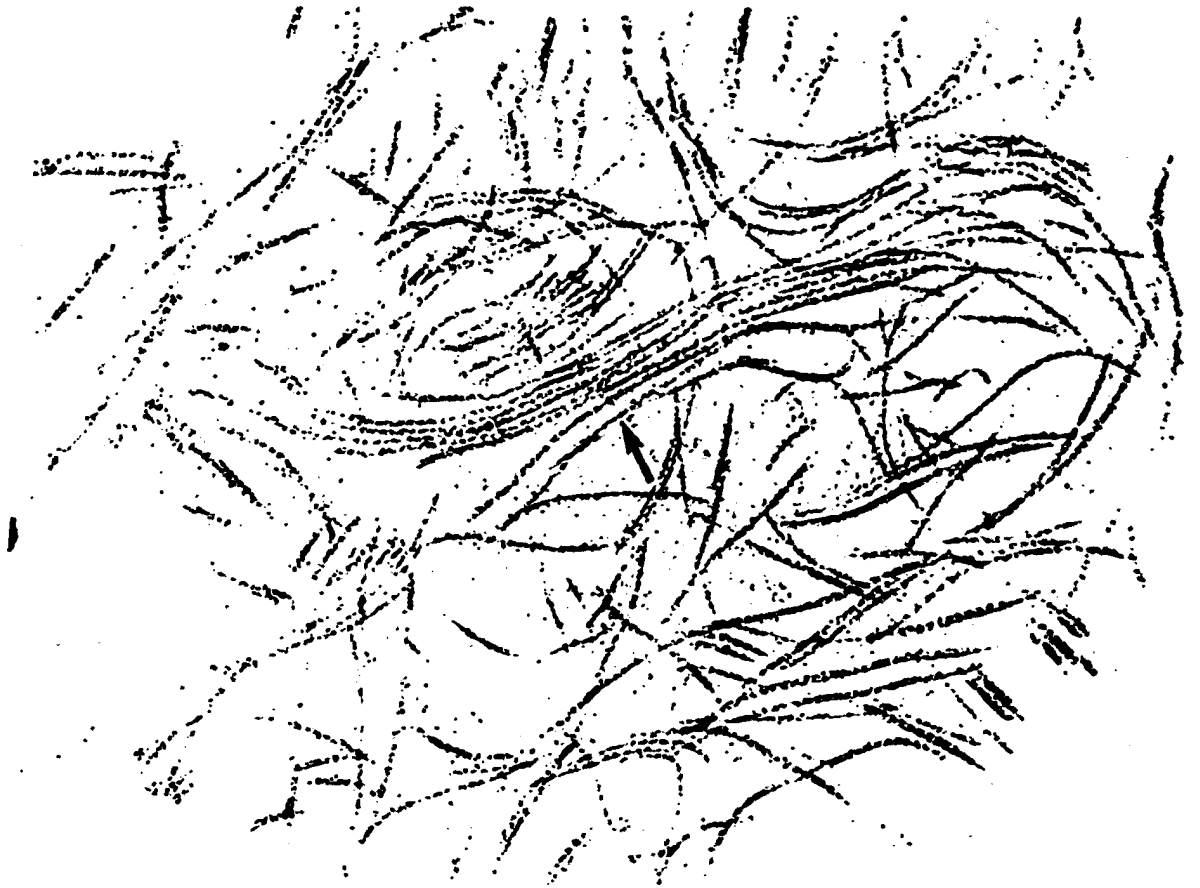
Κατά την εξέταση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο δειγμάτων δέρματος από τα πειραματόζωα που δέχθηκαν για 1- μήνα καθημερινή ενδοπεριτοναϊκή ένεση με 1,5 meq Li/Kg ζώου και θυσιάστηκαν διάφορους χρόνους μετά την τελευταία ένεση, σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλοιώσεις στη δομή των ινιδίων κολλαγόνου.

Όπως έχει αναφερθεί, σε τομές παράλληλες με τα ινίδια κολλαγόνου στους μάρτυρες τα ινίδια εμφανίζονται να είναι παράλληλα μεταξύ τους (βλέπε σχήμα 5.1). Στα πειραματόζωα που δέχθηκαν λίθιο, αν και η χαρακτηριστική παράλληλη διάταξη των ινιδίων σε μερικές περιοχές παραμένει, σε πολλές όμως χάνεται (σχήματα 5.3 και 5.4). Σε μερικές μάλιστα περιοχές η χαρακτηριστική παράλληλη διάταξη των ινιδίων χάνεται εντελώς (σχήμα 5.4(β)), ενώ σε άλλες συνυπάρχουν ινίδια με φυσιολογική διεύθυνση και ινίδια με μη φυσιολογική διάταξη (σχήματα 5.3, και 5.4(α), -τα βέλη δηλώνουν περιοχές με φυσιολογική διεύθυνση ινιδίων). Οι αλλοιώσεις αυτές στην διάταξη των ινιδίων κολλαγόνου εμφανίζονται αμέσως μετά το τέλος των ενέσεων και παραμένουν το ίδιο έντονες ακόμη και 6 μήνες μετά την τελευταία ένεση.

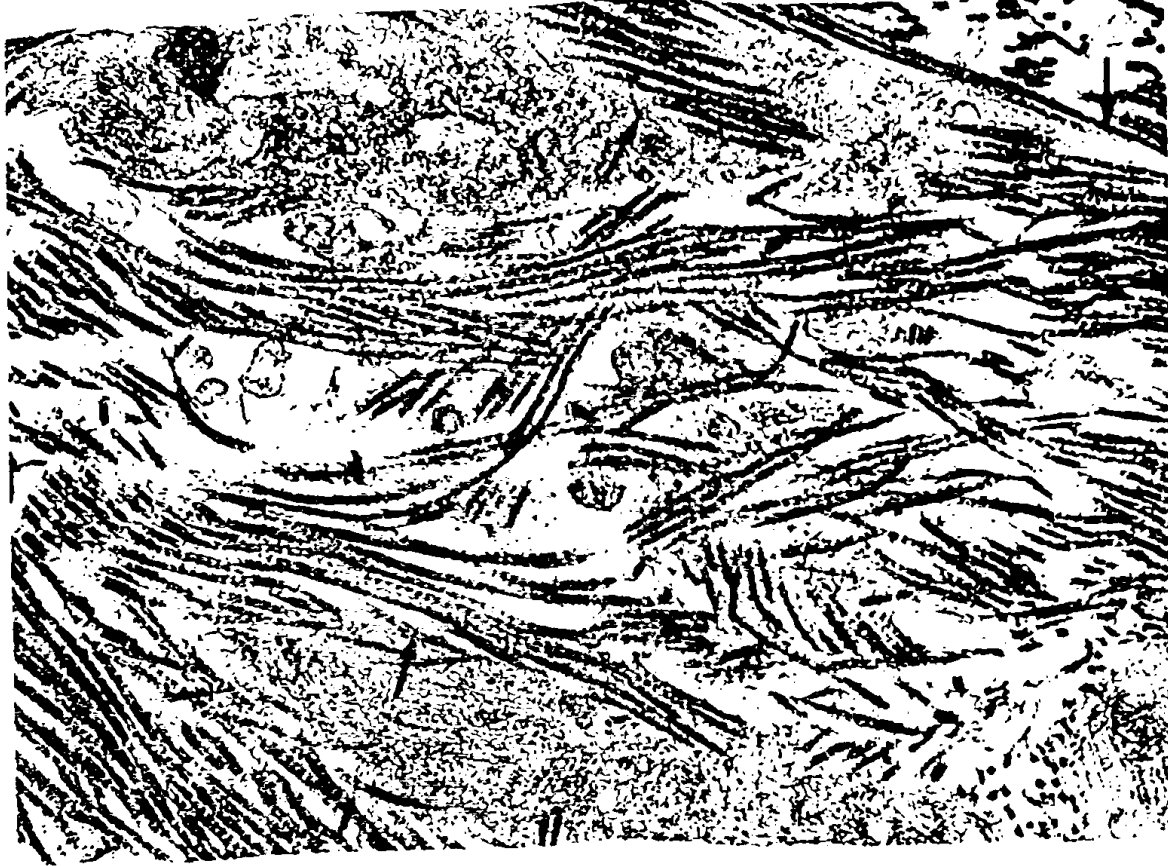
Σε μερικές μάλιστα περιοχές αν και η παράλληλη διεύθυνση παραμένει, υπάρχουν ινίδια που εμφανίζουν σημαντική κάμψη ή κυματοειδή μορφή (twisting) (σχήμα 5.5), ενώ στους μάρτυρες δεν παρατηρείται κάτι τέτοιο (βλέπε σχήμα 5.1).

Μια άλλη επίπτωση του λιθίου είναι η αλλαγή διεύθυνσης των ινιδίων ακόμη και κατά  $180^{\circ}$ . Ακόμη και μέσα στην παράλληλη δέσμη υπάρχουν μερικά ινίδια που αλλάζουν τελείως διεύθυνση και φορά (hairpin loop). Στο σχήμα 5.6 βλέπουμε τέτοιες περιοχές από τα πειραματόζωα που θυσιάστηκαν 1- μέρα και 2- μήνες μετά το τέλος των ενέσεων, ενώ το ίδιο παρατηρείται σε όλα τα πειραματόζωα.





Σχήμα 5.3: Ινίδια κολλαγόνου από πειραματόζωα που δέχθηκαν για 1- μήνα καθημερινή ένεση με 1,5 mg/kg ζώου και θυσιάστηκαν 1- μήνα μετά την τελευταία ένεση. Εδώ υπάρχουν ινίδια με παράλληλη διεύθετηση και ινίδια με μή παράλληλη διάταξη. ( $\times 22.000$ ).



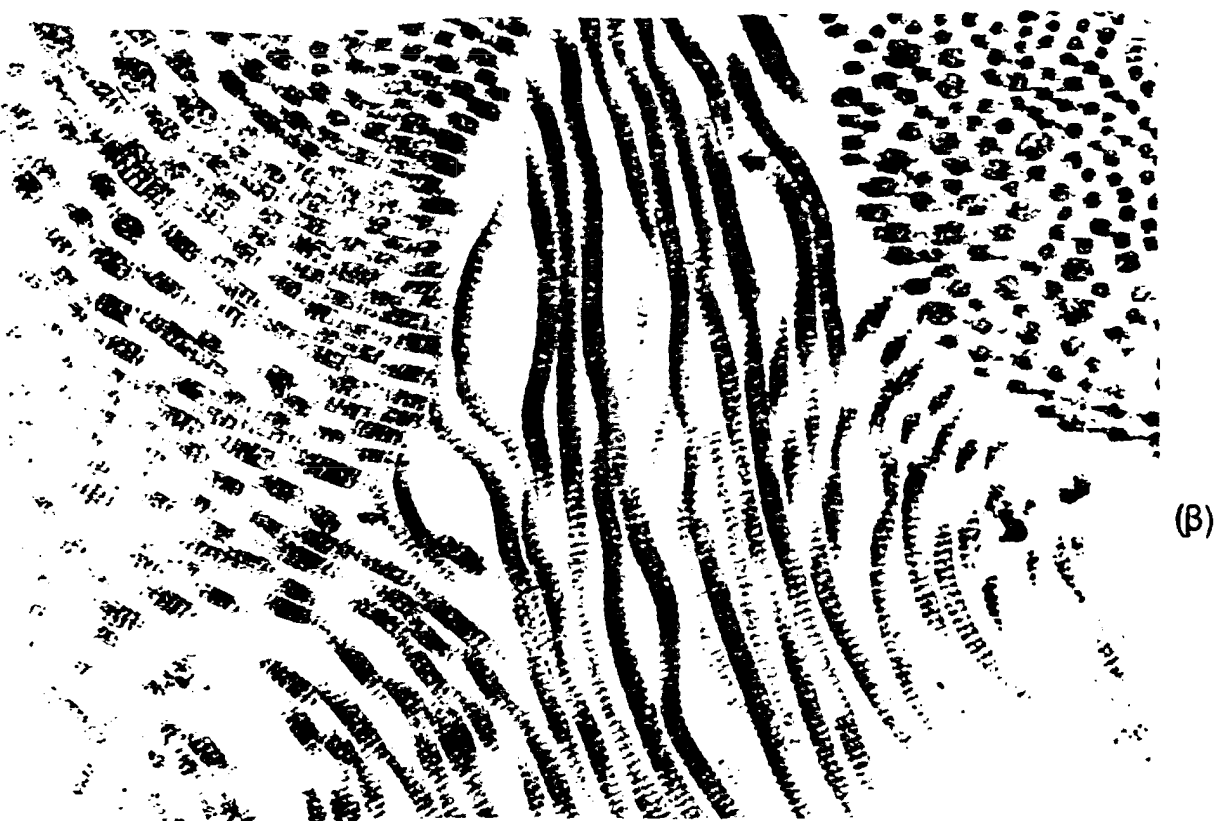
(α)



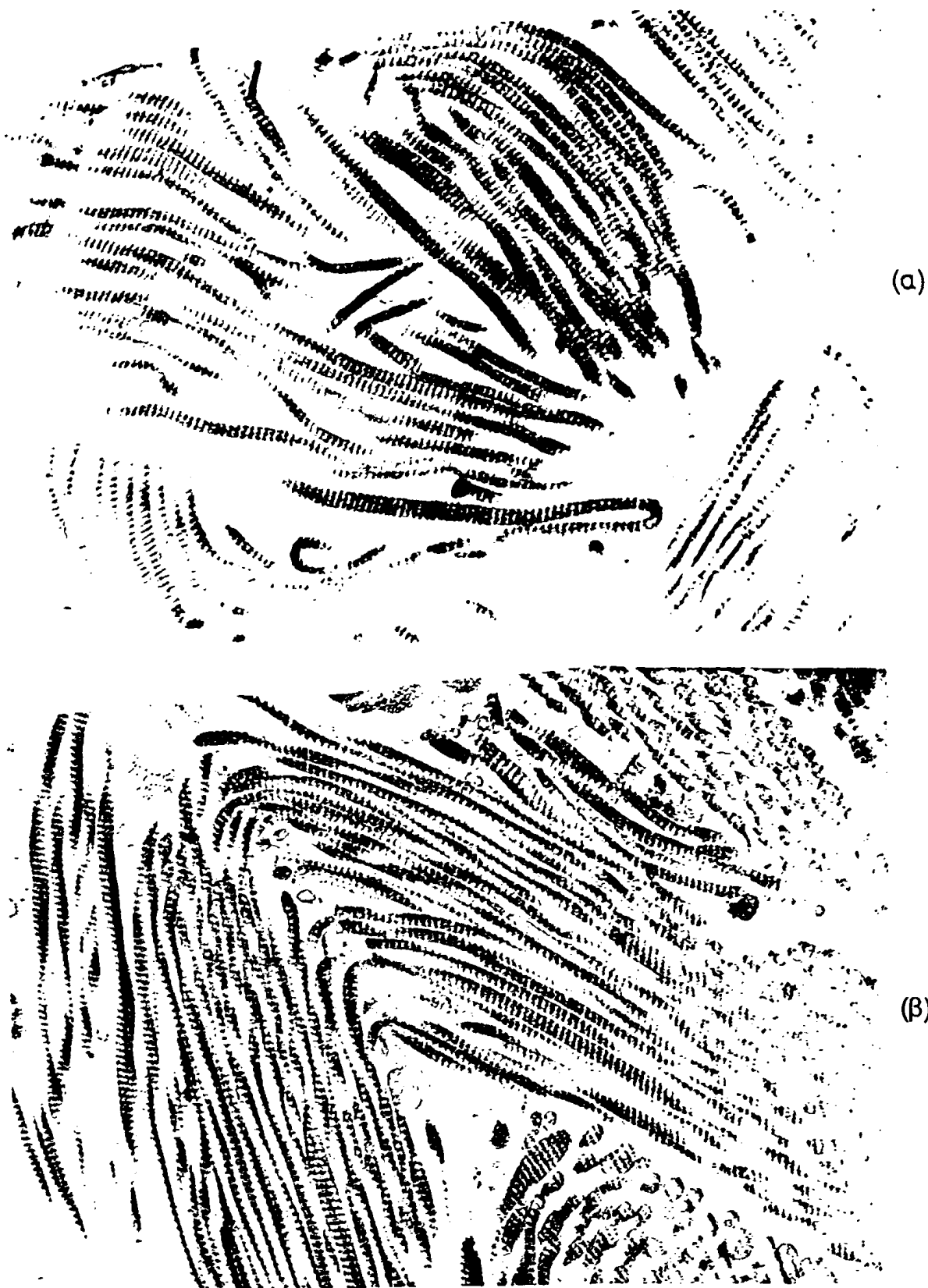
(β)

Σχήμα 5.4: Ινίδια κολλαγόνου από πειραματόζωα που δέχθηκαν για 1- μήνα καθημερινή ένεση με 1,5 mg/kg ζώου και θυσιάστηκαν 2- μήνες (α) και 6- μήνες (β) μετά την τελευταία ένεση. (α): στην περιοχή αυτή υπάρχουν ινίδια με παράλληλη και με μη παράλληλη διάταξη. (β): εδώ τα ινίδια έχουν χάσει εντελώς τον παράλληλο προσανατολισμό τους. ( $\times 22.000$ ).

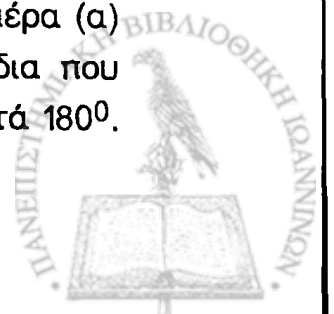




Εικόνα 5.5: Ινίδια κολλαγόνου από πειραματόζωα που δέχθηκαν για 1-ήνα καθημερινή ένεση με 1,5 mg Li/Kg ζώου και θυσιάστηκαν 1- μέρα (α) και 2- μήνες (β) μετά την τελευταία ένεση. Στις περιοχές αυτές όπου τα ινίδια έχουν μεταξύ τους παράλληλο προσανατολισμό εμφανίζονται ινίδια με κάμψη ή με κυματοειδή μορφή. ( $\times 28.600$ ).



Σχήμα 5.6: Ινίδια κολλαγόνου από πειραματόζωα που δέχθηκαν για 1- μήνα καθημερινή ένεση με 1,5 mg Li/Kg ζώου και θυσιάστηκαν 1- μέρα (α) και 2- μήνες (β) μετά την τελευταία ένεση. Εδώ υπάρχουν ινίδια που αλλάζουν διεύθυνση και φορά (ινίδια με hairpin loop) ακόμα και κατά 180°. ( × 22.000).



Από εγκάρσιες τομές στα ινίδια μετρήθηκε η διάμετρος των ινιδίων στα πειραματόζωα που δέχθηκαν λίθιο. Όπως και στους μάρτυρες μετρήθηκαν τουλάχιστον 400 ινίδια γαι να βρεθεί η μέση τιμή της διαμέτρου των ινιδίων σε κάθε πειραματόζωο. Σε κάθε ομάδα πειραματοζώων υπάρχουν 3 πειραματόζωα και επομένως η μέση τιμή της διαμέτρου των ινιδίων κάθε ομάδας υπολογίστηκε τουλάχιστον από 1200 ινίδια. Επειδή όπως και στους μάρτυρες η μέση τιμή της διαμέτρου ινιδίων κολλαγόνου δεν διαφέρει σημαντικά μεταξύ των πειραματοζώων της ίδιας ομάδας, στους πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζεται μόνο η μέση τιμή της διαμέτρου κάθε ομάδας. Στο παράρτημα 4 σαν παράδειγμα φαίνεται αναλυτικά η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της διαμέτρου των ινιδίων κολλαγόνου σε κάθε ένα από τα πειραματόζωα που δέχθηκαν για 1- μήνα καθημερινή δόση με 6 meq Li/Kg και θυσιάστηκαν 1- μήνα μετά την τελευταία ένεση.

Στον πίνακα 5.2 στη δεύτερη στήλη φαίνεται η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της διαμέτρου των ινιδίων από κάθε ομάδα πειραματοζώων που δέχθηκαν για 1- μήνα καθημερινή ένεση με 1,5 meq Li/Kg και θυσιάστηκαν 1- μέρα, 1-, 2- και 6- μήνες μετά την τελευταία ένεση. Οι τιμές αυτές συγκρίνονται με αυτές των μαρτύρων αντίστοιχης ηλικίας (τρίτη στήλη του πίνακα 5.2). Σε όλες τις περιπτώσεις υπάρχει μια στατιστικά σημαντική μείωση ( $p=0$ ) στη μέση διάμετρο των πειραματοζώων που δέχθηκαν λίθιο σε σχέση με αυτή των αντίστοιχων μαρτύρων. Με άλλα λόγια το λίθιο προκαλεί σημαντική μείωση στη διάμετρο των ινιδίων κολλαγόνου.





Πίνακας 5.2: Η επίδραση των 1,5 meq Li/Kg πάνω στα ινίδια κολλαγόνου: η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της διαμέτρου των ινιδίων από πειρ/ζωα που δέχθηκαν LiCl για 1- μήνα και θυσιάστηκαν διάφορους χρόνους μετά την τελευταία ένεση συγκρίνεται με αυτή των μαρτύρων αντίστοιχης ηλικίας.

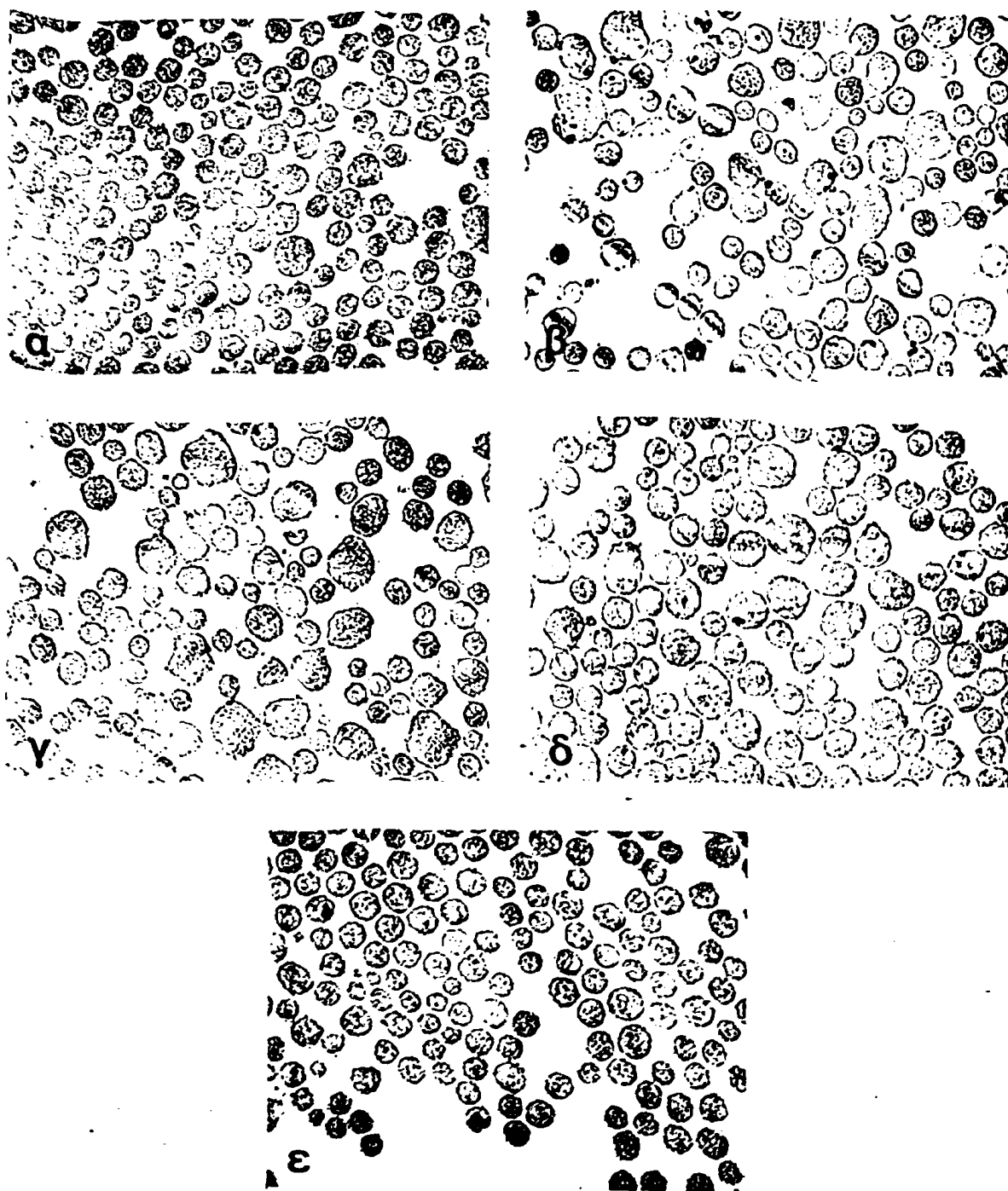
Χρόνος όπου θυσιάστηκαν τα πειρ/ζωα μετά την τελευταία ένεση	Μέση τιμή και τυπική απόκλιση της διαμέτρου ινιδίων κολλαγόνου (nm)		t-test μεταξύ πειρ/ζώων και αντίστοιχων μαρτύρων
	Πειρ/ζωα που δέχθηκαν 1,5 meq Li/Kg	Μάρτυρες αντίστοιχης ηλικίας	
1-μέρα	95,2 ± 11,6	110,9 ± 9,1	p = 0,0
1-μήνα	86,6 ± 11,9	107,5 ± 10,8	p = 0,0
2-μήνες	96,1 ± 10,7	110,9 ± 12,9	p = 0,0
6-μήνες	95,5 ± 10,4	109,1 ± 11,5	p = 0,0

Η μέση τιμή της διαμέτρου όλων των ινιδίων από όλα τα πειραματόζωα μάρτυρες είναι  $109,3 \pm 11,2$  nm



Επίσης σε τομές εγκάρσιες στα ινίδια κολλαγόνου παρατηρείται ότι στα πειραματόζωα που δέχθηκαν λίθιο η διάμετρος των ινιδίων παρουσιάζει μεγάλες μεταβολές (σχήματα 5.7(α-δ)), ενώ αυτό δεν συμβαίνει στους μάρτυρες (σχήμα 5.7(ε)). Μάλιστα ενώ σε εγκάρσιες τομές από τους μάρτυρες τα ινίδια έχουν κατά πλειοψηφία στρογγυλό σχήμα, στα πειραματόζωα που δέχθηκαν λίθιο υπάρχουν και ινίδια μεγάλα και με ακανόνιστο σχήμα (σχήμα 5.7). Το φαινόμενο αυτό γίνεται εντονότερο καθώς περνά ο χρόνος μετά την τελευταία ένεση (σχήματα 5.7(γ,δ)). Τα μεγάλα και με ακανόνιστο σχήμα αυτά ινίδια πιθανόν να οφείλονται σε αθροίσματα μικρότερων ινιδίων. Η διάμετρος των ινιδίων αυτών κυμαίνεται από 143 nm έως 261 nm με μέση τιμή και τυπική απόκλιση  $187,9 \pm 25,2$  nm. Αυτά τα μεγάλα και με ανώμαλο σχήμα ινίδια που αποτελούν περίπου το 15% του ολικού πληθυσμού των ινιδίων, δεν χρησιμοποιήθηκαν στον υπολογισμό της μέσης τιμής της διαμέτρου ινιδίων των πειραματοζώων που φαίνονται στους πίνακες του παραρτήματος 5 και στον πίνακα 5.2.





Σχήμα 5.7: Φωτογραφίες σε περιοχές εγκάρσιες στα ινίδια κολλαγόνου. Στις φωτογραφίες (α-δ) τα πειραματόζωα δέχθηκαν για 1- μήνα λίθιο με καθημερινή δόση 1,5 mg/kg και θυσιάστηκαν 1- μέρα, 1-, 2- και 6- μήνες μετά την τελευταία ένεση αντίστοιχα. Οι φωτογραφίες αυτές συγκρίνονται με την φωτογραφία (ε) από τους μάρτυρες. Η φωτογραφία αυτή είναι από μάρτυρες ηλικίας 33 εβδομάδων. (  $\times 35.200$  )

#### 5.4 Επιδράσεις λιθίου στο κολλαγόνο δέρματος ποντικών που δέχθηκαν καθημερινή δόση 6 meq Li/Kg για 1- μήνα

Όπως και στο προηγούμενο πείραμα, κατά την εξέταση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο παρατηρήθηκαν σημαντικές δομικές αλλοιώσεις στο κολλαγόνο δέρματος πειραματοζώων που δέχθηκαν για 1- μήνα καθημερινή ενδοπεριτοναϊκή ένεση με 6 meq Li/Kg ζώου. Οι αλλοιώσεις μάλιστα στο πείραμα αυτό είναι πιο έντονες από ότι στο προηγούμενο.

Σε τομές παράλληλες με τα ινίδια κολλαγόνου σε μερικές περιοχές διατηρείται η χαρακτηριστική παράλληλη διάταξη των ινιδίων (σχήμα 5.8). Όμως, στις περισσότερες περιοχές η διάταξη των ινιδίων είναι εντελώς τυχαία (σχήμα 5.9) και τα ινίδια έχουν χάσει τον παράλληλο προσανατολισμό τους. Και εδώ, όπως και στο προηγούμενο πείραμα, υπάρχουν περιοχές όπου συνυπάρχουν ινίδια με φυσιολογική παράλληλη διεύθυνση και ινίδια με μη φυσιολογική -διάταξη (σχήμα 5.8). Οι αλλοιώσεις αυτές εμφανίζονται αμέσως μετά το τέλος των ενέσεων και παραμένουν ακόμα και 6- μήνες μετά το τέλος των ενέσεων.

Παρατηρούνται επίσης ινίδια με κυματοειδή μορφή (twisting) (σχήμα 5.10). Τέτοια ινίδια εμφανίζονται και όταν χορηγείται για το ίδιο διάστημα η μικρότερη δόση των 1,5 meq Li/Kg. Όμως με την μεγάλη δόση των 6 meq Li/Kg το φαινόμενο εμφανίζεται πιο συχνά και είναι πιο έντονο. Ακόμα υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία στο πάχος των ινιδίων κάτι που δεν εμφανίζεται στους μάρτυρες. Τα πολύ παχιά ινίδια έχουν σπειροειδή μορφή και ίσως αποτελούν αθροίσματα μικρότερων ινιδίων.

Τέλος, ένα ακόμα φαινόμενο που προέρχεται από τη χρήση του λιθίου είναι η εμφάνιση ινιδίων που αλλάζουν διεύθυνση και φορά (ινίδια με hairpin loop) (σχήμα 5.11) και μάλιστα μερικές φορές κατά  $180^{\circ}$  (σχήμα 5.11(a)). Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται και στα πειραματόζωα που δέχθηκαν την κοινή κλινική δόση των 1,5 meq Li/Kg.



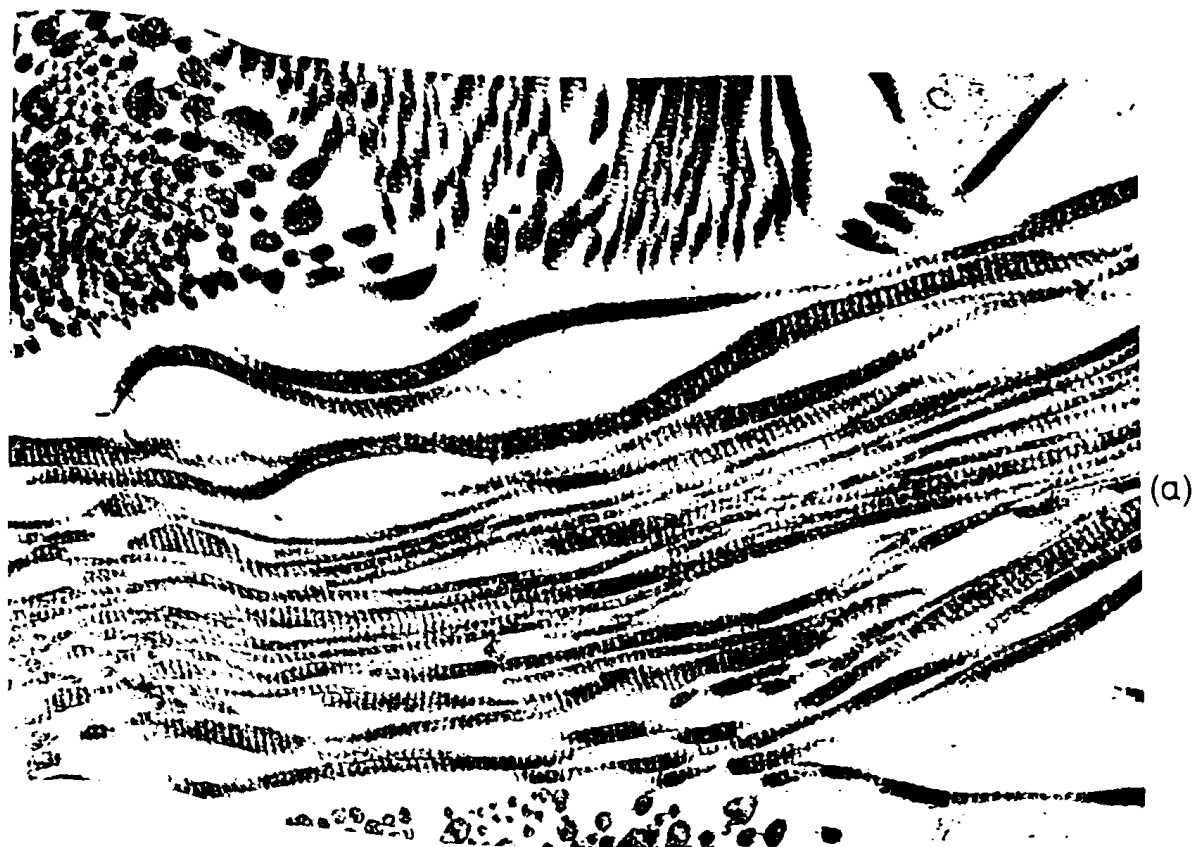


Σχήμα 5.8: Ινίδια κολλαγόνου από πειραματόζωα που δέχθηκαν για 1- μήνα καθημερινή δόση με 6 mg Li/Kg ζώου και θυσιάστηκαν 1- μέρα μετά την τελευταία ένεση. Εδώ υπάρχουν ινίδια με παράλληλη διεύθυνση και ινίδια με μή παράλληλη διάταξη. (  $\times 22.000$  ).

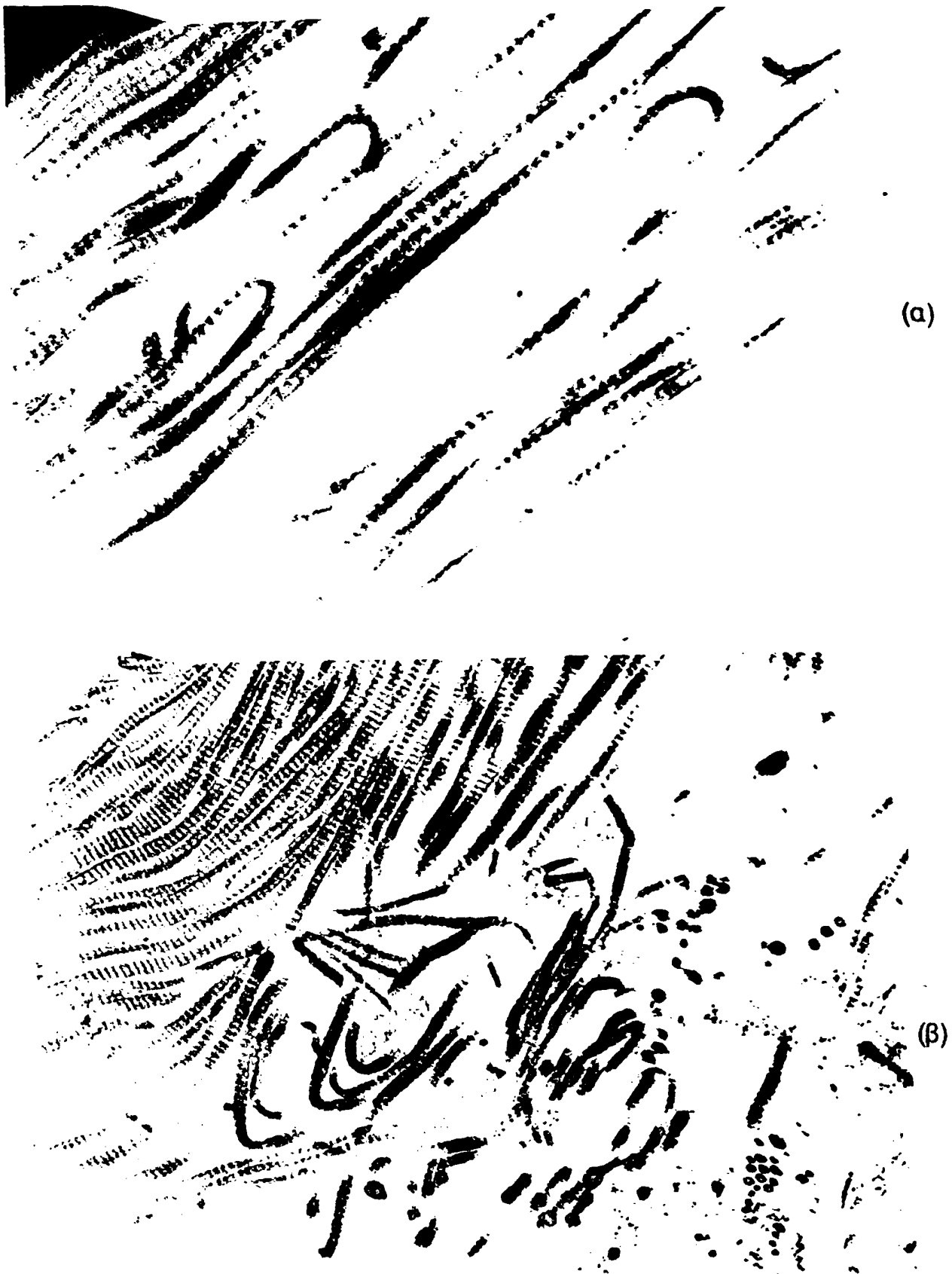
5



Σχήμα 5.9: Περιοχές παράλληλες με τα ινίδια κολλαγόνου στα πειραματόζωα που δέχθηκαν για 1- μήνα καθημερινή δόση με 6 mg/kg ζώου και θυσιάστηκαν 2- μήνες (α) και 6- μήνες (β) μετά την τελευταία ένεση. Στις περιοχές αυτές τα ινίδια έχουν χάσει σχεδόν εντελώς τον παράλληλο προσανατολισμό τους. ( $\times 22.000$ ).



Σχήμα 5.10: Περιοχές παράλληλες με τα ινίδια κολλαγόνου στα πειραματόζωα που δέχθηκαν για 1- μήνα καθημερινή δόση με 6 mg/kg ζώου και θυσιάστηκαν 1- μήνα (α) και 6- μήνες (β) μετά την τελευταία ένεση. Παρατηρούνται ινίδια με κυματοειδή μορφή και μεγάλη ποικιλία στο πάχος των ινιδίων. ( $\times 17.600$ ).



Σχήμα 5.11: Περιοχές παράλληλες με τα ινίδια κολλαγόνου στα πειραματόζωα που δέχθηκαν για 1- μήνα καθημερινή δόση με 6 mg/kg ζώου και θυσιάστηκαν 1- μέρα (α) και 6- μήνες (β) μετά την τελευταία ένεση. Παρατηρούνται ινίδια που αλλάζουν διεύθυνση και φορά (ινίδια με hairpin loop) ακόμα και κατά  $180^\circ$ . ( $\times 22.000$ ).



Και εδώ μετρήθηκε η διάμετρος από τουλάχιστον 400 ινίδια σε κάθε πειραματόζωο και υπολογίστηκε η μέση τιμή της καθώς και εκείνη της κάθε ομάδας.

Η διάμετρος των πειραματοζώων που δέχθηκαν λίθιο για 1- μήνα με καθημερινή δόση 6 meq Li/kg ζώου παρουσιάζει μια στατιστικά σημαντική μείωση σε σχέση με αυτή των μαρτύρων αντίστοιχης ηλικίας. Στην δεύτερη στήλη του πίνακα 5.3 φαίνονται οι μέσες τιμές των διαμέτρων των ινιδίων κολλαγόνου των πειραματοζώων που δέχθηκαν λίθιο και θυσιάστηκαν διάφορους χρόνους μετά το τέλος των ενέσεων. Οι τιμές αυτές συγκρίνονται με αυτές των μαρτύρων αντίστοιχης ηλικίας (τρίτη στήλη του πίνακα 5.3). Σε όλες τις περιπτώσεις υπάρχει μια στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p=0$ ) στη μέση διάμετρο μεταξύ των πειραματοζώων και των αντίστοιχων μαρτύρων.

Μείωση στη διάμετρο των ινιδίων κολλαγόνου παρατηρήθηκε και στα πειραματόζωα που δέχθηκαν μικρότερη καθημερινή δόση (1,5 meq Li/Kg) για το ίδιο διάστημα. Στα πειραματόζωα όμως που δέχθηκαν την μεγάλη δόση, 6 meq Li/Kg, η μείωση είναι σημαντικά ( $p=0$ ) μεγαλύτερη στους 2- και 6- μήνες μετά το τέλος των ενέσεων, ενώ η μείωση είναι περίπου ίδια στα πειραματόζωα που θυσιάστηκαν 1- μέρα και 1- μήνα μετά την τελευταία ένεση (πίνακας 5.4).



Πίνακας 5.3: Η επίδραση των 6 meq Li/Kg πάνω στα ινίδια κολλαγόνου: η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της διαμέτρου των ινιδίων από πειρ/ζωα που δέχθηκαν LiCl για 1- μήνα και θυσιάστηκαν διάφορους χρόνους μετά την τελευταία ένεση συγκρίνεται με αυτή των μαρτύρων αντίστοιχης ηλικίας.

Χρόνος όπου θυσιάστηκαν τα πειρ/ζωα μετά την τελευταία ένεση	Μέση τιμή και τυπική απόκλιση της διαμέτρου ινιδίων κολλαγόνου (nm)		t-test μεταξύ πειρ/ζώων και αντίστοιχων μαρτύρων
	Πειρ/ζωα που δέχθηκαν 6 meq Li/Kg	Μάρτυρες αντίστοιχης ηλικίας	
1-μέρα	96,9 ± 10,1	110,9 ± 9,1	p = 0,0
1-μήνα	86,0 ± 17,7	107,5 ± 10,8	p = 0,0
2-μήνες	69,7 ± 14,4	110,9 ± 12,9	p = 0,0
6-μήνες	76,7 ± 10,8	109,1 ± 11,5	p = 0,0

Η μέση τιμή της διαμέτρου όλων των ινιδίων από όλα τα πειραματόζωα μάρτυρες είναι 109,3 ± 11,2 nm



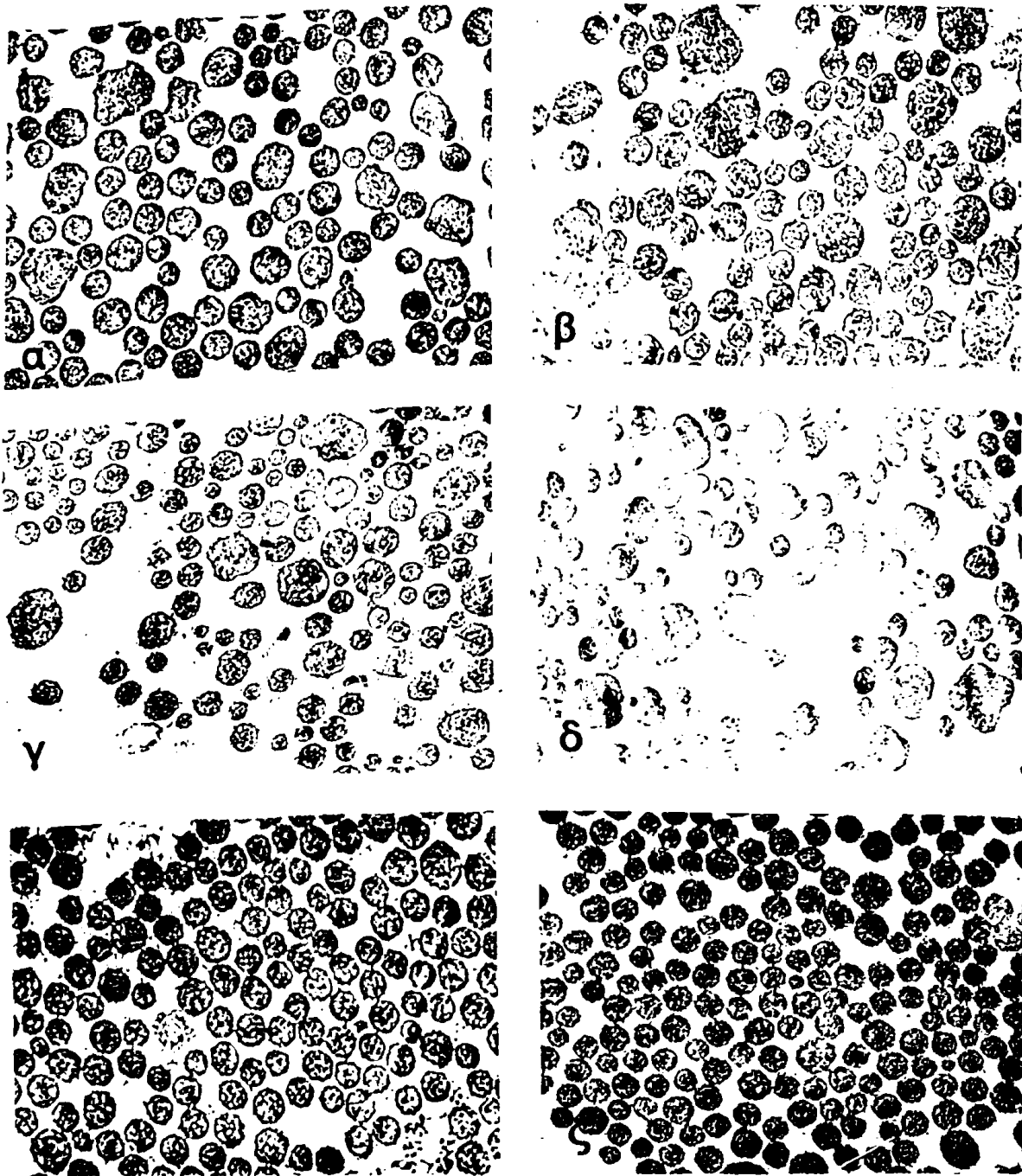
Πίνακας 5.4: Η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της διαμέτρου των ινιδίων κολλαγόνου από πειρ/ζωα που δέχθηκαν LiCl για 1- μήνα με καθημερινή δόση 1,5 meq Li/Kg ή 6 meq Li/Kg και θυσιάστηκαν διάφορους χρόνους μετά την τελευταία ένεση.

Χρόνος όπου θυσιάστηκαν τα πειρ/ζωα μετά την τελευταία ένεση	Μέση τιμή και τυπική απόκλιση της διαμέτρου ινιδίων κολλαγόνου (nm)		t-test μεταξύ πειραματοζώων
	Πειρ/ζωα που δέχθηκαν 6 meq Li/Kg	Πειρ/ζωα που δέχθηκαν 1,5 meq Li/Kg	
1-μέρα	96,9 ± 10,1	95,2 ± 11,6	p = 0,0
1-μήνα	86,0 ± 17,7	86,6 ± 11,9	p = 0,5
2-μήνες	69,7 ± 14,4	96,1 ± 10,7	p = 0,0
6-μήνες	76,7 ± 10,8	95,5 ± 10,4	p = 0,0

Όπως και στα πειραματόζωα που δέχθηκαν τη δόση των 1,5 mg Li/Kg έτσι και εδώ σε τομές εγκάρσιες στα ινίδια παρατηρείται ότι η διάμετρος παρουσιάζει μεγαλύτερες μεταβολές (σχήματα 5.12(α-δ) από ότι στους μάρτυρες (σχήματα 5.12(ε,ζ)). Επίσης εμφανίζονται ινίδια μεγάλα και με ακανόνιστο σχήμα, όπως φαίνεται στα σχήματα 5.12(α-δ). Το φαινόμενο αυτό μάλιστα είναι εντονότερο εδώ από ότι στα πειραματόζωα που δέχθηκαν για 1- μήνα 1,5 mg Li/Kg. Τα μεγάλα και ακανόνιστα αυτά ινίδια εμφανίζονται έντονα ακόμα και 1- μέρα μετά το τέλος των ενέσεων και εξακολουθούν να υπάρχουν 6- μήνες μετά το τέλος των ενέσεων.

Όπως ειπώθηκε και πριν, τα μεγάλα αυτά ινίδια πιθανόν να οφείλονται σε αθροίσματα μικρότερων ινιδίων. Τέτοιου είδους ινίδια παρατηρήθηκαν και σε παράλληλες τομές (σχήμα 5.10). Η διάμετρος των ινιδίων αυτών κυμαίνεται από 143 nm έως 260 nm με μέση τιμή και τυπική απόκλιση  $188,4 \pm 28,8$  nm. Αυτά τα μεγάλα και με ανώμαλο σχήμα ινίδια δεν χρησιμοποιήθηκαν στον υπολογισμό της μέσης τιμής της διαμέτρου ινιδίων των πειραματοζώων που φαίνονται και στους πίνακες 5.3 και 5.4. Τα ινίδια αυτά αποτελούν περίπου το 22% του ολικού πληθυσμού των ινιδίων.





Σχήμα 5.12: Φωτογραφίες σε περιοχές εγκάρσιες στα ινίδια κολλαγόνου. Στις φωτογραφίες (α-δ) τα πειραματόζωα δέχθηκαν για 1- μήνα λίθιο με καθημερινή δόση 6 mg/Li/kg και θυσιάστηκαν 1- μέρα, 1- , 2- και 6- μήνες μετά την τελευταία ένεση αντίστοιχα. Οι φωτογραφίες αυτές συγκρίνονται με τις φωτογραφίες (ε) και (ζ) από τους μάρτυρες ηλικίας 9- και 33- εβδομάδων αντίστοιχα. (  $\times 35.200$  )

### 5.5 Επιδράσεις λιθίου στο κολλαγόνο δέρματος ποντικών που δέχθηκαν καθημερινή δόση 0,7 meq Li/Kg για 1- μήνα

Όπως και στα προηγούμενα πειράματα και στο πείραμα αυτό με καθημερινή δόση 0,7 meq Li/Kg για 1 μήνα, που είναι πολύ μικρότερη από τις δόσεις των προηγούμενων πειραμάτων (1,5 και 6 meq Li/Kg), παρατηρούνται σημαντικές αλλοιώσεις στο κολλαγόνο δέρματος των πειραματοζώων κατά την εξέτασή τους στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Παρόλο ότι η δόση είναι πολύ μικρή, οι παρατηρούμενες μεταβολές στην οργάνωση και στη διάταξη των ινιδίων είναι παρόμοιες με εκείνες των μεγαλύτερων δόσεων (1,5 και 6 meq Li/Kg). Η αποδιοργάνωση στον προσανατολισμό των ινιδίων που παρατηρήθηκε στις μεγαλύτερες δόσεις παρατηρείται και εδώ. Έτσι αν και υπάρχουν περιοχές με ινίδια σε φυσιολογική παράλληλη διεύθυνση (σχήμα 5.13(α), δηλώνονται με βέλη) συχνά τα ινίδια βρίσκονται αποδιοργανωμένα και τοποθετημένα τυχαία μεταξύ τους (σχήματα 5.13(β) και 5.14). Σε άλλες περιοχές ανάμεσα από τις κανονικές διατάξεις υπάρχουν ινίδια με τελείως αναρχική διάταξη (σχήμα 5.13(α)).

Σε μερικές περιοχές ο παράλληλος προσανατολισμός των ινιδίων διακόπτεται από ινίδια που αλλάζουν διεύθυνση ακόμα και κατά  $180^{\circ}$  (σχήμα 5.15(α)). Μερικές φορές μάλιστα αυτό γίνεται έντονο και ολόκληρη η περιοχή εμφανίζεται με μεγάλη αποδιοργάνωση (σχήματα 5.15(β) και 5.16). Ινίδια με κυματοειδή μορφή εμφανίζονται και εδώ (σχήμα 5.17) όπως και στα πειραματόζωα που δέχθηκαν μεγαλύτερες δόσεις. Συχνά τα ινίδια αυτά συνυπάρχουν με σπειροειδή ινίδια (σχήμα 5.17(β)). Στο σχήμα 5.17(β) φαίνεται καθαρά η ποικιλομορφία στο πάχος των ινιδίων. Χαρακτηριστικά είναι τα πολύ παχιά ινίδια με σπειροειδή μορφή που φαίνεται να προέρχονται από αθροίσματα λεπτότερων ινιδίων.

Οι αλλοιώσεις λοιπόν στη δομή και στη διάταξη των ινιδίων κολλαγόνου δέρματος που προκαλούνται από τη χρήση του λιθίου σε μεγάλες δόσεις (1,5 ή 6 meq Li/Kg) εξακολουθούν να υπάρχουν και όταν η δόση γίνεται αρκετά μικρή (0,7 meq Li/Kg). Αξιοσημείωτο είναι ότι όλες οι αλλοιώσεις εμφανίζονται αμέσως μετά το τέλος των ενέσεων και παραμένουν ακόμα και 6- μήνες μετά τη διακοπή της λήψης του λιθίου.

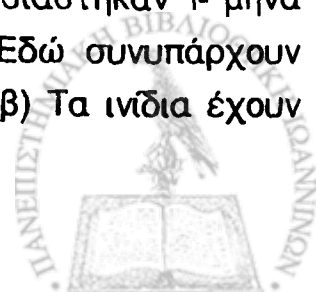
Όσον αφορά τις παρατηρήσεις στις εγκάρσιες τομές, και στη μικρή δόση των 0,7 meq Li/Kg εμφανίζεται μεγάλη διακύμανση στη διάμετρο των ινιδίων, όπως επίσης και ινίδια με μεγάλο και ακανόνιστο σχήμα (σχήματα 5.18(α-δ)). Και εδώ το φαινόμενο γίνεται εντονότερο όσο περνά ο χρόνος μετά το τέλος των ενέσεων. Τα μεγάλα αυτά ινίδια, τα οποία πιθανόν να οφείλονται σε αθροίσματα λεπτότερων ινιδίων, παρατηρήθηκαν και σε παράλληλες τομές (σχήμα 5.17(β)) και αποτελούν περίπου το 10% του ολικού πληθυσμού των ινιδίων με μέση τιμή διαμέτρου ( $195,1 \pm 29,9$ ) nm.

Η διάμετρος των ινιδίων εξακολουθεί να παραμένει σημαντικά μικρότερη ( $p=0$ ) από αυτή των μαρτύρων (πίνακας 5.5). Παρόλα αυτά η μείωση της διαμέτρου δεν είναι τόσο έντονη όσο αυτή που προκαλείται από τη μεγάλη δόση των 6 meq Li/Kg, ενώ είναι παρόμοια με την μείωση από την κοινή κλινική δόση των 1,5 meq Li/Kg (πίνακας 5.6). Πρέπει να σημειωθεί ότι, όπως και στα προηγούμενα πειράματα, τα μεγάλα και με ακανόνιστο σχήμα ινίδια δεν χρησιμοποιήθηκαν στον υπολογισμό της μέσης τιμής της διαμέτρου των ινιδίων.





Σχήμα 5.13: Ινίδια κολλαγόνου από πειραματόζωα που δέχθηκαν για 1- μήνα καθημερινή δόση με 0,7 mg Li/Kg ζώου και θυσιάστηκαν 1- μήνα (α) και 6- μήνες (β) μετά την τελευταία ένεση. (α) Εδώ συνυπάρχουν ινίδια με φυσιολογική και με μη φυσιολογική διάταξη. (β) Τα ινίδια έχουν τυχαία διάταξη ( $\times 22.000$ ).







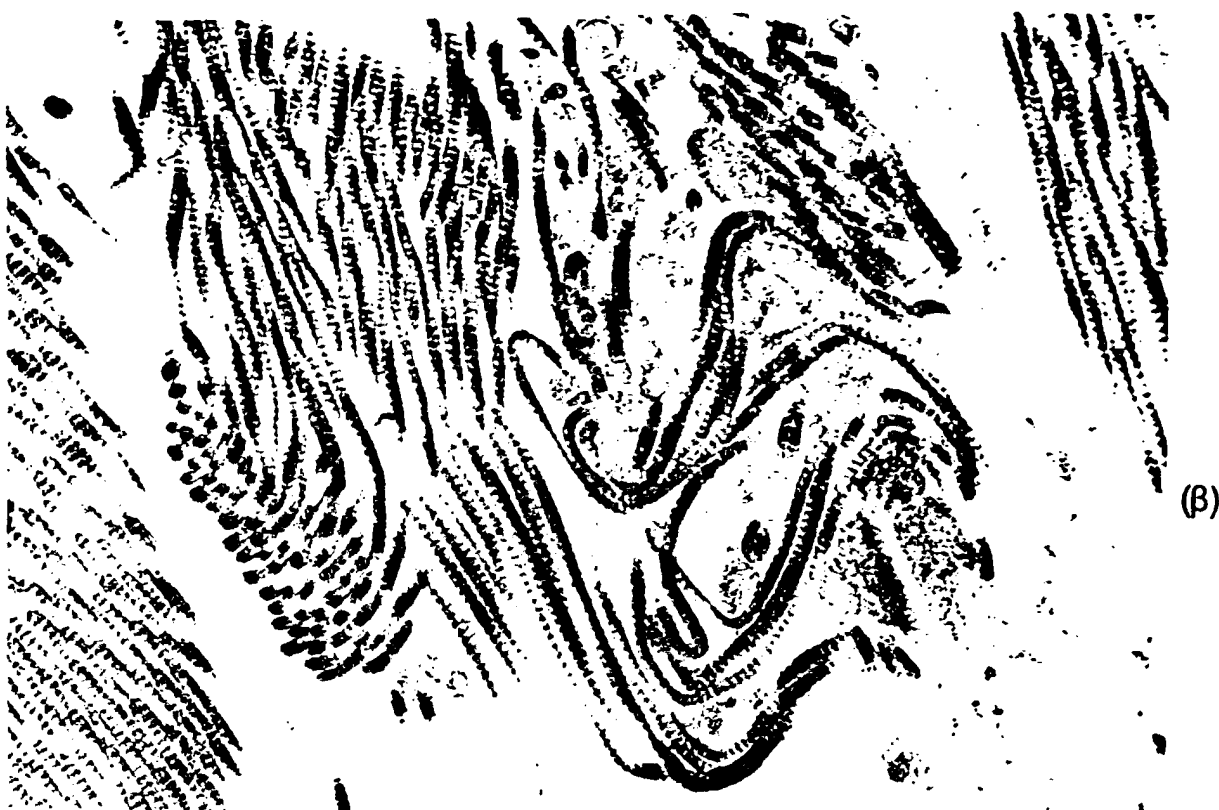
Σχήμα 5.14: Περιοχή παράλληλη με τα ινίδια κολλαγόνου στα πειραματόζωα που δέχθηκαν για 1- μήνα καθημερινή δόση με 0,7 mg/Li/Kg ζώου και θυσιάστηκαν 1- μήνα μετά την τελευταία ένεση. Εδώ η διάταξη των ινιδίων είναι εντελώς τυχαία (  $\times 22.000$ ).

5)



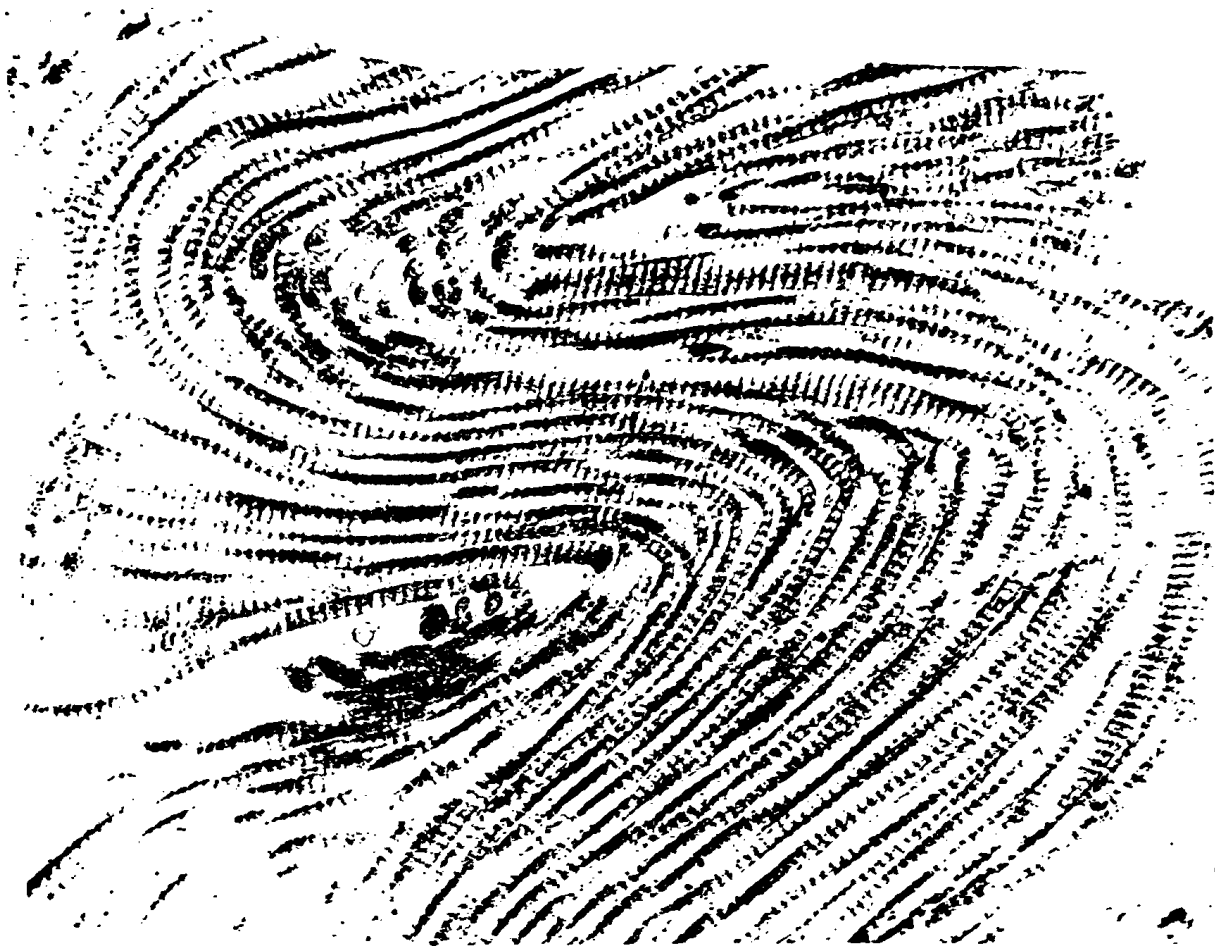


(a)

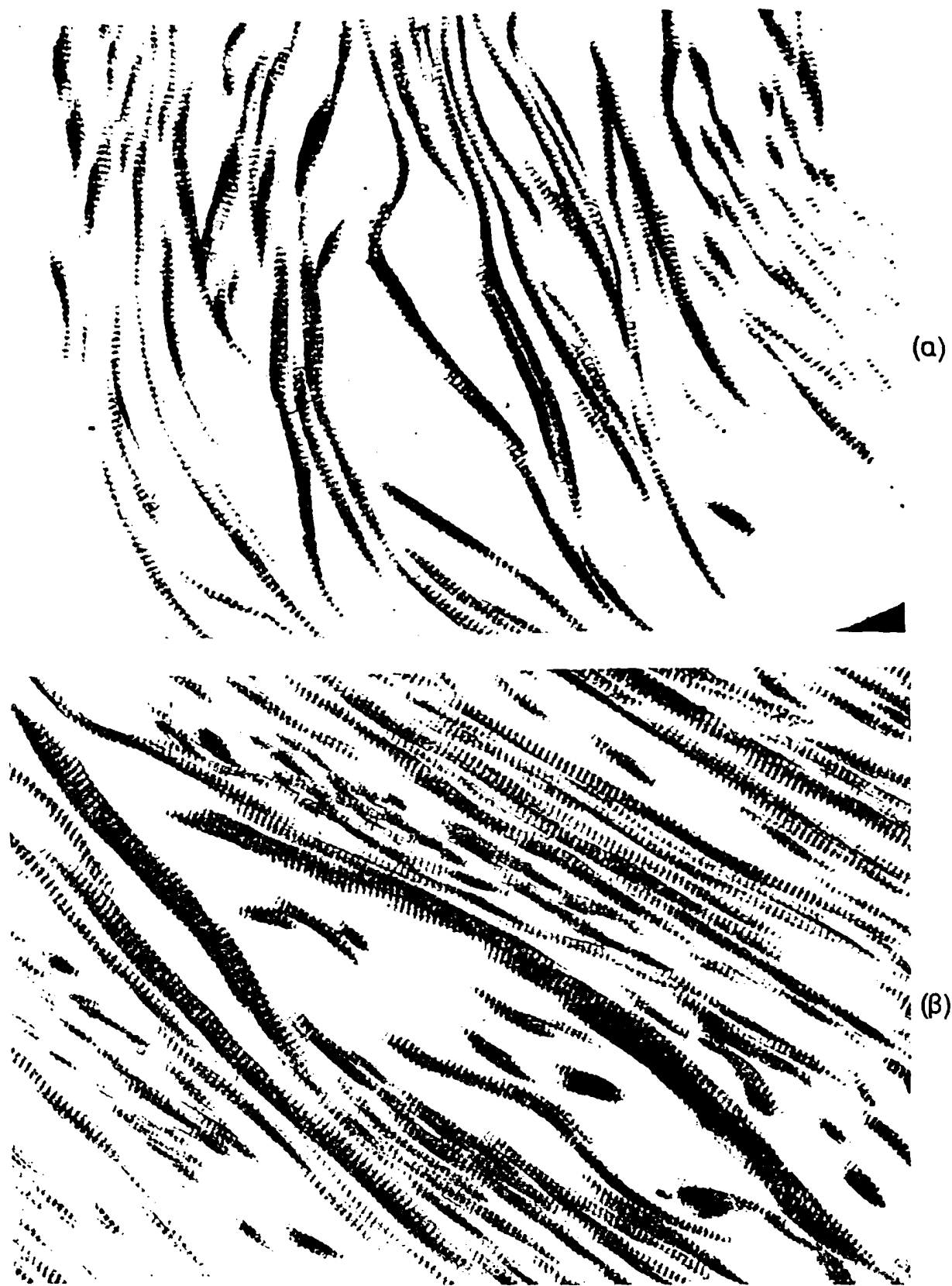


(β)

Σχήμα 5.15: Ινίδια κολλαγόνου από πειραματόζωα που δέχθηκαν για 1- μήνα καθημερινή δόση με 0,7 mg Li/Kg ζώου και θυσιάστηκαν 1- μέρα (α) και 6- μήνες (β) μετά την τελευταία ένεση. Στις περιοχές αυτές τα ινίδια αλλάζουν διεύθυνση και φορά. Το φαινόμενο γίνεται εντονότερο σε μερικές περιοχές (βλέπε (β)). ( × 22.000).



Σχήμα 5.16: Περιοχή παράλληλη με τα ινίδια κολλαγόνου στα πειραματόζωα που δέχθηκαν για 1 μήνα καθημερινή δόση με 0,7 mg/kg ζώου και θυσιάστηκαν 1- μήνα μετά την τελευταία ένεση. Στην περιοχή αυτή ολόκληρη η δέσμη των ινιδίων αλλάζει διεύθυνση και φορά. ( × 26.600).



Σχήμα 5.17: Ινίδια κολλαγόνου από πειραματόζωα που δέχθηκαν για 1- μήνα καθημερινή δόση με 0,7 mg Li/Kg ζώου και θυσιάστηκαν 1- μέρα (α) και 1- μήνα (β) μετά την τελευταία ένεση. Στις περιοχές αυτές παρατηρούνται ινίδια με κυματοειδή και σπειροειδή μορφή. ( $\times 22.000$ ).

Πίνακας 5.5: Η επίδραση των 0,7 meq Li/Kg πάνω στα ινίδια κολλαγόνου: η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της διαμέτρου των ινιδίων από πειρ/ζωα που δέχθηκαν LiCl για 1- μήνα και θυσιάστηκαν διάφορους χρόνους μετά την τελευταία ένεση συγκρίνεται με αυτή των μαρτύρων αντίστοιχης ηλικίας.

Χρόνος όπου θυσιάστηκαν τα πειρ/ζωα μετά την τελευταία ένεση	Μέση τιμή και τυπική απόκλιση της διαμέτρου ινιδίων κολλαγόνου (nm)		t-test μεταξύ πειρ/ζώων και αντίστοιχων μαρτύρων
	Πειρ/ζωα που δέχθηκαν 0,7 meq Li/Kg	Μάρτυρες αντίστοιχης ηλικίας	
1-μέρα	95,7 ± 10,5	110,9 ± 9,1	p = 0,0
1-μήνα	94,0 ± 10,4	107,5 ± 10,8	p = 0,0
2-μήνες	95,6 ± 9,5	110,9 ± 12,9	p = 0,0
6-μήνες	94,8 ± 10,3	109,1 ± 11,5	p = 0,0

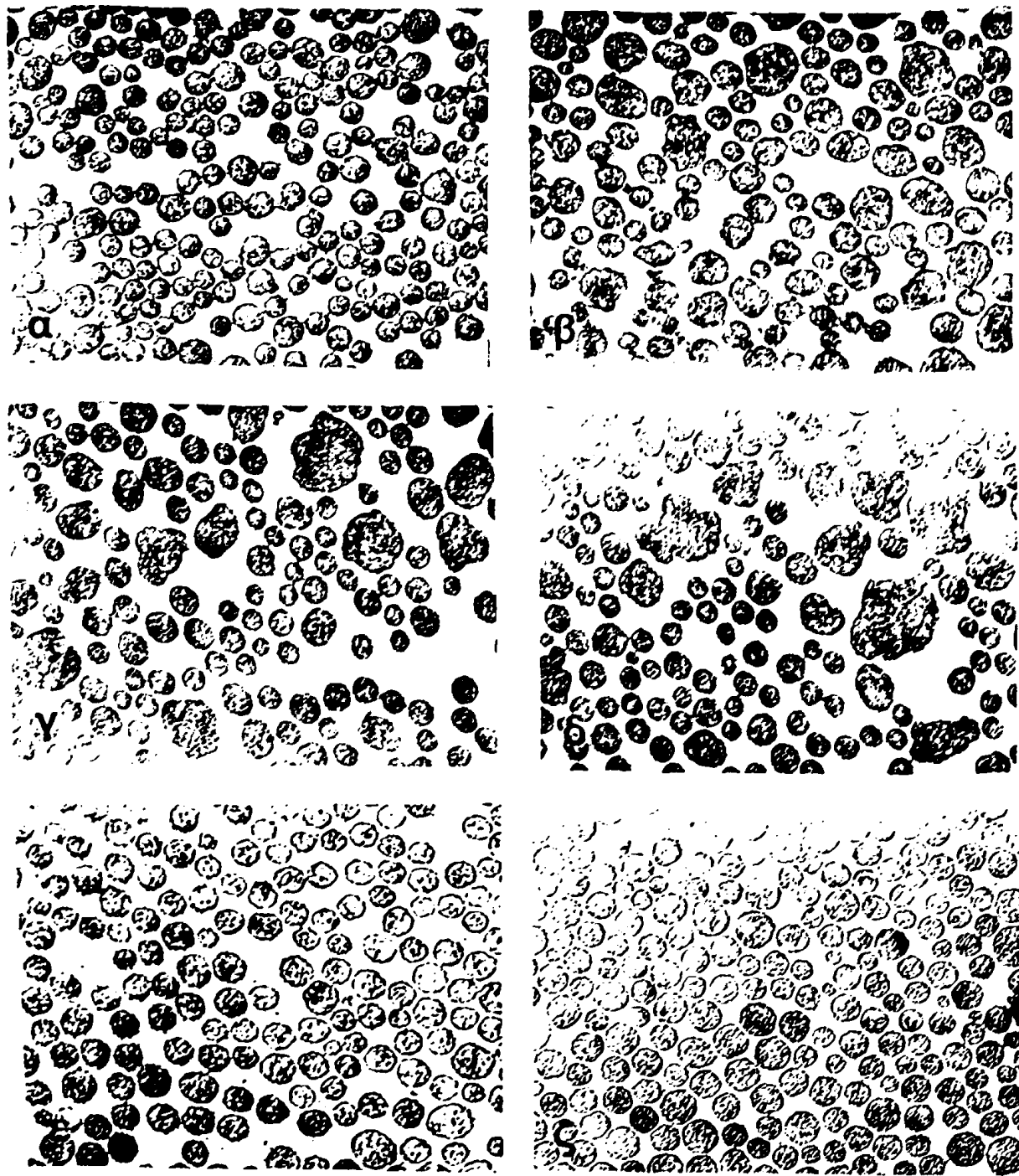
Η μέση τιμή της διαμέτρου<sup>1)</sup> όλων των ινιδίων από όλα τα πειραματόζωα μάρτυρες είναι 109,3 ± 11,2 nm



Πίνακας 5.6: Η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της διαμέτρου των ινιδίων κολλαγόνου από πειρ/ζωα που δέχθηκαν LiCl για 1- μήνα με καθημερινή δόση 0,7 meq Li/Kg και θυσιάστηκαν διάφορους χρόνους μετά την τελευταία ένεση συγκρίνεται με αυτή των πειραματοζώων που δέχθηκαν για 1- μήνα μεγαλύτερες καθημερινές δόσεις, 1,5 ή 6 meq Li/Kg και θυσιάστηκαν αντίστοιχους χρόνους μετά το τέλος των ενέσεων

Χρόνος όπου θυσιάστηκαν τα πειρ/ζωα μετά την τελευταία ένεση	Μέση τιμή και τυπική απόκλιση της διαμέτρου ινιδίων κολλαγόνου (nm)		
	Πειρ/ζωα που δέχθηκαν 6 meq Li/Kg	Πειρ/ζωα που δέχθηκαν 1,5 meq Li/Kg	Πειρ/ζωα που δέχθηκαν 0,7 meq Li/Kg
1-μέρα	96,9 ± 10,1	95,2 ± 11,6	95,7 ± 10,5
1-μήνα	86,0 ± 17,7	86,6 ± 11,9	94,0 ± 10,4
2-μήνες	69,7 ± 14,4	96,1 ± 10,7	95,6 ± 9,5
6-μήνες	76,7 ± 10,8	95,5 ± 10,4	94,8 ± 10,3





Σχήμα 5.18: Φωτογραφίες σε περιοχές εγκάρσιες στα ινίδια κολλαγόνου. Στις φωτογραφίες (α-δ) τα πειραματόζωα δέχθηκαν για 1 μήνα λίθιο με καθημερινή δόση 0,7 mg Li/Kg και θυσιάστηκαν 1- μέρα, 1-, 2- και 6- μήνες μετά την τελευταία ένεση αντίστοιχα. Οι φωτογραφίες αυτές συγκρίνονται με τις φωτογραφίες (ε) και (ζ) από τους μάρτυρες ηλικίας 9- και 33- εβδομάδων αντίστοιχα. (  $\times 35.200$  )

## 5.6 Επιδράσεις λιθίου στο κολλαγόνο δέρματος ποντικών που δέχθηκαν καθημερινή δόση 1,5 meq Li/Kg για 1- εβδομάδα ή για 2- εβδομάδες

Και στα πειράματα αυτά με την κοινή κλινική δόση των 1,5 meq Li/Kg ζώου, παρόλο ότι η χορήγηση λιθίου διαρκεί μόνο 1-, ή 2- εβδομάδες, παρατηρούνται σημαντικές δομικές αλλοιώσεις στο κολλαγόνο δέρματος των πειραματοζώων κατά την εξέτασή τους στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Αυτές οι αλλοιώσεις αφορούν την αρχιτεκτονική διάταξη των ινιδίων καθώς και τον προσανατολισμό τους. Παρόλο ότι υπάρχουν περιοχές όπου η παράλληλη διεύθυνση των ινιδίων παραμένει (σχήμα 5.19, δηλώνονται με βέλη) σε πολλές περιοχές η διάταξη των ινιδίων είναι ακανόνιστη σχηματίζοντας έτσι ένα πλέγμα όπου τα ινίδια είναι μεταξύ τους τοποθετημένα τυχαία (σχήματα 5.19 και 5.20). Επιπλέον η εμφάνιση κυματοειδούς μορφής ινιδίων που παρατηρήθηκε στα ινίδια πειραματοζώων που δέχθηκαν λίθιο για μεγαλύτερο διάστημα, είναι και εδώ παρούσα (σχήμα 5.21(α)). Και εδώ εμφανίζονται ινίδια, αλλά σε μικρή έκταση, που έχουν σπειροειδή μορφή (σχήμα 5.21(β), δηλώνονται με βέλη) αλλά και ινίδια που αλλάζουν τελείως την διεύθυνσή τους (σχήμα 5.21(β), διπλά βέλη). Με άλλα λόγια οι αλλοιώσεις που παρατηρήθηκαν στην οργάνωση και διάταξη των ινιδίων με την ίδια ή μεγαλύτερη δόση και σε διάρκεια χορήγησης ενός μηνός, παρατηρούνται και όταν η χορήγηση του λιθίου γίνεται σε πολύ μικρότερη διάρκεια (1-, ή 2- εβδομάδες).

Στις εγκάρσιες τομές όμως δεν έχουμε όπως στις προηγούμενες περιπτώσεις μεγάλη διακύμανση στη διάμετρο των ινιδίων. Επίσης στην περίπτωση αυτή, δεν παρουσιάζονται πολύ μεγάλα ινίδια με ακανόνιστο σχήμα (σχήμα 5.22). Παρόλα αυτά η διάμετρος των ινιδίων είναι σημαντικά μικρότερη ( $p=0$ ) από αυτή των μαρτύρων (πίνακες 5.7 και 5.8). Βέβαια εδώ η μείωση της διαμέτρου δεν είναι τόσο έντονη όσο στα πειραματόζωα που δέχθηκαν την ίδια δόση για 1- μήνα. Έτσι για παράδειγμα όταν για 1- εβδομάδα δίνονται 1,5 meq Li/Kg η μέση διάμετρος είναι  $104,4 \pm 11,6$  nm 1- μέρα μετά την τελευταία ένεση (πίνακας 5.7), ενώ όταν η ίδια δόση δίνεται για 1- μήνα η μέση διάμετρος 1- μέρα μετά το τέλος των ενέσεων είναι  $95,2 \pm 11,6$  nm (πίνακας 5.2) στατιστικά σημαντικά μικρότερη ( $p=0$ ).





Σχήμα 5.19: Περιοχές παράλληλες με τα ινίδια κολλαγόνου στα πειραματόζωα που δέχθηκαν για 1- εβδομάδα καθημερινή δόση με 1,5 mg Li/Kg ζώου και θυσιάστηκαν 1- μέρα (α) και 1- εβδομάδα (β) μετά την τελευταία ένεση. Στις περιοχές αυτές υπάρχουν ινίδια με φυσιολογική παράλληλη διεύθυνση και ινίδια με μη φυσιολογική διάταξη ( $\times 22.000$ ).

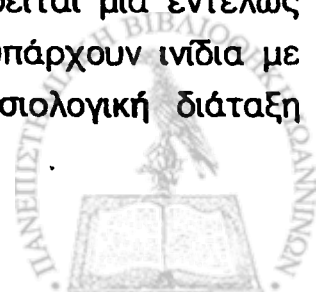


(a)



(β)

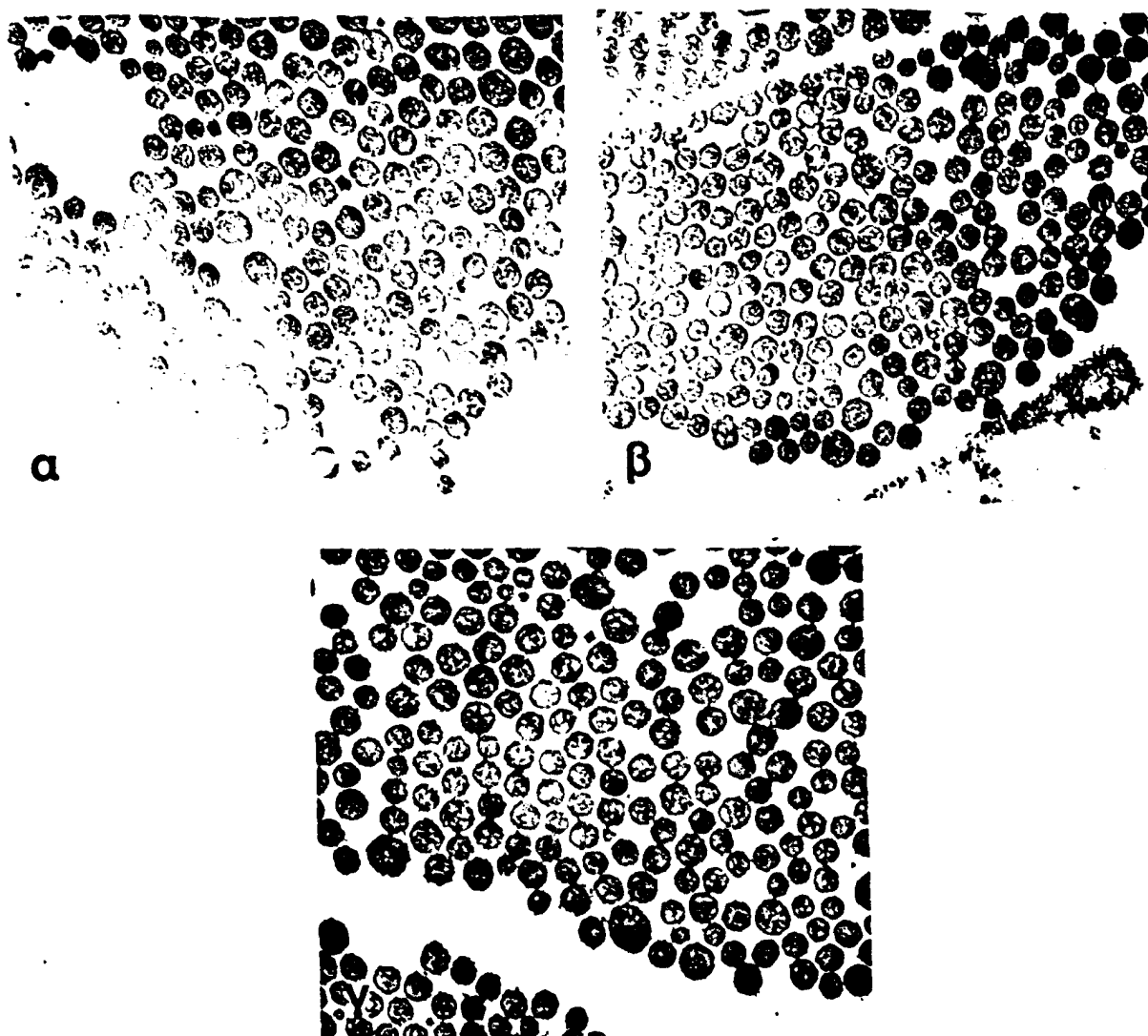
Σχήμα 5.20: Περιοχές παράλληλες με τα ινίδια κολλαγόνου στα πειραματόζωα που δέχθηκαν για 2- εβδομάδες καθημερινή δόση με 1,5 mg Li/Kg ζώου και θυσιάστηκαν 1- μέρα (α) και 2- εβδομάδες (β) μετά την τελευταία ένεση. (α) στην περιοχή παρατηρείται μια εντελώς τυχαία διάταξη των ινιδίων (β): Στην περιοχή αυτή υπάρχουν ινίδια με φυσιολογική παράλληλη διεύθετηση και ινίδια με μη φυσιολογική διάταξη ( $\times 22.000$ ).





Σχήμα 5.21: Περιοχές παράλληλες με τα ινίδια κολλαγόνου στα πειραματόζωα που δέχθηκαν για 1- (α) ή για 2- (β) εβδομάδες καθημερινή δόση με 1,5 mg Li/Kg ζώου και θυσιάστηκαν 1- μέρα μετά την τελευταία ένεση. (α)Στην περιοχή αυτή υπάρχουν ινίδια που έχουν παράλληλο μεταξύ τους προσανατολισμό και ινίδια με κυματοειδή μορφή. (β)Εδώ υπάρχουν ινίδια με φυσιολογική διάταξη, αλλά υπάρχουν και ινίδια που αλλάζουν διεύθυνση και φορά (ινίδια με hairpin loop) καθώς και ινίδια με σπειροειδή μορφή. (  $\times 22.000$ ).





Σχήμα 5.22: Φωτογραφίες σε περιοχές εγκάρσιες στα ινίδια κολλαγόνου. Στη φωτογραφία (α) τα πειραματόζωα δέχθηκαν για 2- εβδομάδες λίθιο με καθημερινή δόση 1,5 mg Li/Kg και θυσιάστηκαν 1- μέρα μετά την τελευταία ένεση. Στη (β) τα πειραματόζωα δέχθηκαν την ίδια δόση λιθίου αλλά για μια εβδομάδα και θυσιάστηκαν 1- μέρα μετά την τελευταία ένεση. Οι φωτογραφίες αυτές συγκρίνονται με τη φωτογραφία (γ) από τους μάρτυρες ηλικίας 6- εβδομάδων. (  $\times 35.200$  )

Πίνακας 5.7: Η επίδραση των 1,5 meq Li/Kg για 1- εβδομάδα πάνω στα ινίδια κολλαγόνου: η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της διαμέτρου των ινιδίων από πειρ/ζωα που δέχθηκαν LiCl και θυσιάστηκαν διάφορους χρόνους μετά την τελευταία ένεση συγκρίνεται με αυτή των μαρτύρων αντίστοιχης ηλικίας.

Χρόνος όπου θυσιάστηκαν τα πειρ/ζωα μετά την τελευταία ένεση	Μέση τιμή και τυπική απόκλιση της διαμέτρου ινιδίων κολλαγόνου (nm)		t-test μεταξύ πειρ/ζώνων και αντίστοιχων μαρτύρων
	Πειρ/ζωα που δέχθηκαν 1,5 meq Li/Kg	Μάρτυρες αντίστοιχης ηλικίας	
1-μέρα	104,4 ± 11,6	108,4 ± 8,9	p = 0,0
1- εβδομάδα	98,5 ± 10,5	108,1 ± 9,4	p = 0,0

Πίνακας 5.8: Η επίδραση των 1,5 meq Li/Kg για 2- εβδομάδες πάνω στα ινίδια κολλαγόνου: η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της διαμέτρου των ινιδίων από πειρ/ζωα που δέχθηκαν LiCl και θυσιάστηκαν διάφορους χρόνους μετά την τελευταία ένεση συγκρίνεται με αυτή των μαρτύρων αντίστοιχης ηλικίας.

Χρόνος όπου θυσιάστηκαν τα πειρ/ζωα μετά την τελευταία ένεση	Μέση τιμή και τυπική απόκλιση της διαμέτρου ινιδίων κολλαγόνου (nm)		t-test μεταξύ πειρ/ζώνων και αντίστοιχων μαρτύρων
	Πειρ/ζωα που δέχθηκαν 1,5 meq Li/Kg	Μάρτυρες αντίστοιχης ηλικίας	
1-μέρα	101,3 ± 10,4	108,1 ± 9,4	p = 0,0
2- εβδομάδες	99,5 ± 11,3	110,9 ± 9,1	p = 0,0



### 5.7 Επιδράσεις λιθίου στο κολλαγόνο δέρματος ποντικών που δέχθηκαν καθημερινή δόση 0,7 meq Li/Kg για 1- εβδομάδα

Τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού μοιάζουν με εκείνα των 1,5 meq Li/Kg όταν χορηγείται για το ίδιο διάστημα. Είναι χαρακτηριστικό ότι αν και η διάρκεια χορήγησης είναι μόνο μία εβδομάδα, οι μεταβολές στη διάταξη και στον προσανατολισμό των ινιδίων είναι παρόμοιες με εκείνες της ίδιας δόσης με μεγαλύτερη διάρκεια (ενός μηνός).

Η αποδιοργάνωση στη διάταξη των ινιδίων που παρατηρήθηκε στα προηγούμενα πειράματα παρατηρείται και εδώ. Υπάρχει μια τυχαία οργάνωση των ινιδίων αν και εν μέρει διατηρείται η φυσιολογική παράλληλη διάταξη (σχήματα 5.23(α,β)). Σε μερικές περιοχές μια ομάδα των ινιδίων ξεφεύγει από αυτή τη χαρακτηριστική παράλληλη διάταξη και σχηματίζει έναν θύσσανο από ινίδια που σχηματίζουν θηλειά (hairpin loop) όπως φαίνεται στο σχήμα 5.24.

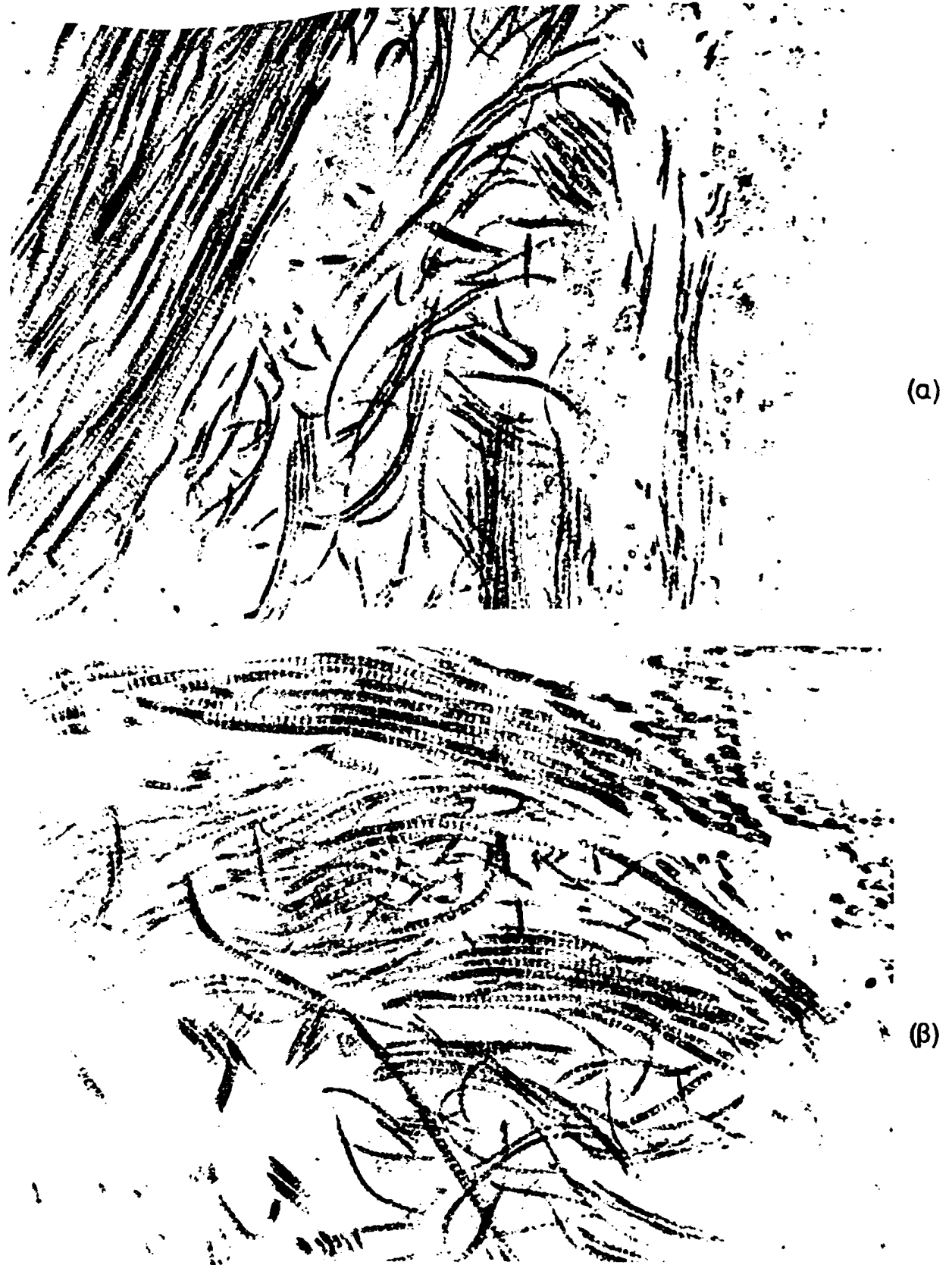
Στο σχήμα 5.25 περιγράφεται θαυμάσια η κυματοειδής μορφή που παίρνουν τα ινίδια όπως αναφέρθηκε και σε όλα τα προηγούμενα πειράματα. Τα ινίδια ενώ φαίνεται να είχαν μια κανονική αξονική διάταξη αλλάζουν τελείως προσανατολισμό. Έτσι, άλλα παρουσιάζουν κάμψη, άλλα ελικοειδές στρίψιμο με αποτέλεσμα να σχηματίζουν μια ακανόνιστη άτρακτο (σχήμα 5.25).

Όσον αφορά όμως τις εγκάρσιες τομές τα ινίδια δεν παρουσιάζουν αυτή τη δραματική εικόνα που παρουσιάζουν τα ινίδια κολλαγόνου από πειραματοζώα που δέχθηκαν λίθιο για μεγαλύτερη διάρκεια. Οι μεγάλες διακυμάνσεις στη διάμετρο των ινιδίων καθώς και τα ακανόνιστα σχήματα είναι απόντα (σχήμα 5.26).

Η διάμετρος αν και παρουσιάζει μια μείωση σε σχέση με τους μάρτυρες δεν είναι της τάξης της μείωσης που παρουσιάζεται στο κολλαγόνο των πειραματοζώων που δέχθηκαν την ίδια δόση αλλά για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Έτσι ενώ όταν η καθημερινή δόση των 0,7 meq Li/Kg χορηγείται για 1- μήνα η διάμετρος των ινιδίων σε διάφορους χρόνους μετά το τέλος των ενέσεων είναι περίπου 95nm, όταν η

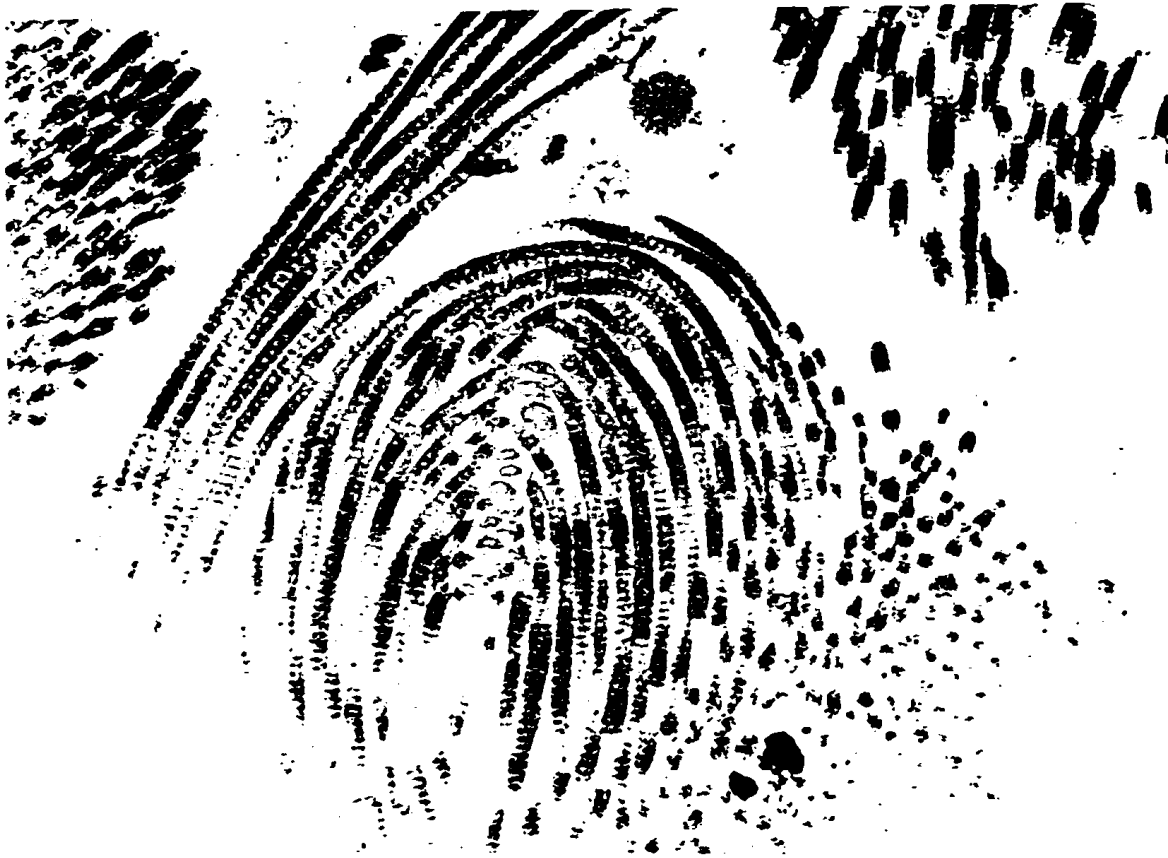
χορήγηση διαρκεί 1- εβδομάδα η διάμετρος των ινιδίων κολλαγόνου κυμαίνεται από 100,3 έως 103,5 nm (πίνακες 5.6 και 5.9). Στον πίνακα 5.9 φαίνονται αναλυτικά τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού, ενώ στον πίνακα 5.10 γίνεται σύγκριση με εκείνα της μεγαλύτερης δόσης των 1,5 mg Li/Kg όταν χορηγείται για ίδιο χρονικό διάστημα (1- εβδομάδα). Από τον τελευταίο πίνακα παρατηρείται ότι 1- μέρα μετά την τελευταία ένεση η μείωση της διαμέτρου και στις δύο αυτές δόσεις δεν είναι στατιστικά σημαντική ( $p=0,045$ ), ενώ 1- εβδομάδα μετά την τελευταία ένεση υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p=0$ ) στην μείωση και η διάμετρος γίνεται μικρότερη όταν αυξάνει η δόση.





Σχήμα 5.23: Περιοχές παράλληλες με τα ινίδια κολλαγόνου στα πειραματόζωα που δέχθηκαν για 1- εβδομάδα καθημερινή δόση με 0,7 mg/kg ζώου και θυσιάστηκαν 1- μέρα (α) και 1- εβδομάδα (β) μετά την τελευταία ένεση. Στις περιοχές αυτές υπάρχουν ινίδια με φυσιολογική παράλληλη διεύθυνση και ινίδια με μη φυσιολογική διάταξη ( $\times 22.000$ ).





Σχήμα 5.24: Ινίδια κολλαγόνου από πειραματόζωα που δέχθηκαν για 1-εβδομάδα καθημερινή δόση με 0,7 mg Li/Kg ζώου και θυσιάστηκαν 1-εβδομάδα μετά την τελευταία ένεση. Ολόκληρη η δέσμη των ινιδίων αλλάζει διεύθυνση και φορά (ινίδια με hairpin loop). (× 22.000).



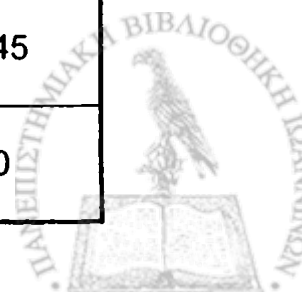
Σχήμα 5.25: Ινίδια κολλαγόνου από πειραματόζωα που δέχθηκαν για 1-εβδομάδα καθημερινή δόση με 0,7 mg Li/Kg ζώου και θυσιάστηκαν 1-εβδομάδα μετά την τελευταία ένεση. Εδώ υπάρχουν ινίδια που έχουν παράλληλο μεταξύ τους προσανατολισμό, αλλά υπάρχουν και ινίδια με κυματοειδή μορφή. ( $\times 22.000$ ).

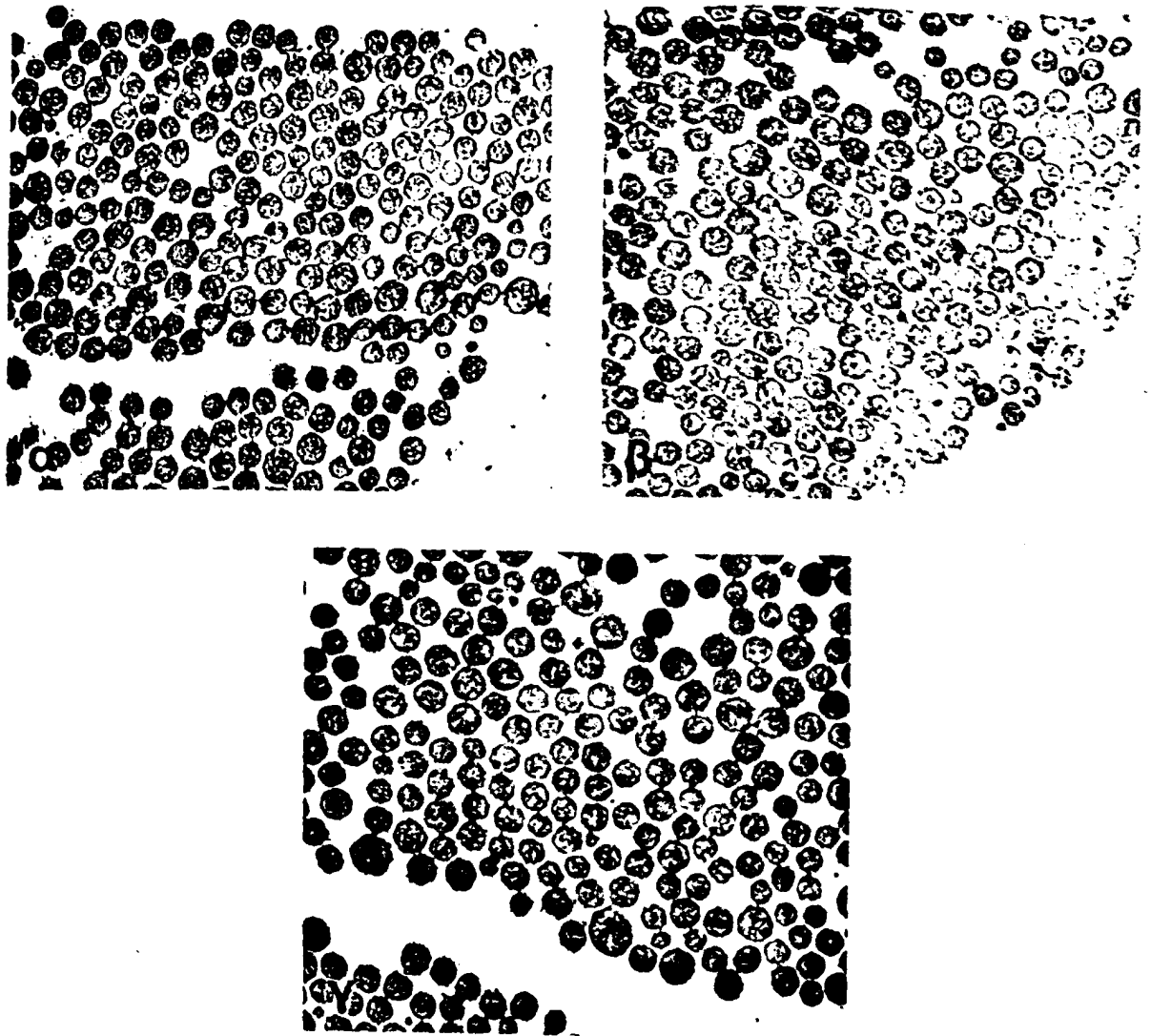
Πίνακας 5.9: Η επίδραση των 0,7 meq Li/Kg για 1- εβδομάδα πάνω στα ινίδια κολλαγόνου: η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της διαμέτρου των ινιδίων από πειρ/ζωα που δέχθηκαν LiCl και θυσιάστηκαν διάφορους χρόνους μετά την τελευταία ένεση συγκρίνεται με αυτή των μαρτύρων αντίστοιχης ηλικίας.

Χρόνος όπου θυσιάστηκαν τα πειρ/ζωα μετά την τελευταία ένεση	Μέση τιμή και τυπική απόκλιση της διαμέτρου ινιδίων κολλαγόνου (nm)		t-test μεταξύ πειρ/ζών και αντίστοιχων μαρτύρων
	Πειρ/ζωα που δέχθηκαν 0,7 meq Li/Kg	Μάρτυρες αντίστοιχης ηλικίας	
1-μέρα	103,5 ± 11,5	108,4 ± 8,9	p = 0,0
1- εβδομάδα	100,3 ± 9,6	108,1 ± 9,4	p = 0,0

Πίνακας 5.10: Η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της διαμέτρου των ινιδίων κολλαγόνου από τα πειρ/ζωα που δέχθηκαν για 1- εβδομάδα την κοινή κλινική δόση των 1,5 meq Li/Kg και θυσιάστηκαν διάφορους χρόνους μετά την τελευταία ένεση συγκρίνεται με αυτή των πειρ/ζών που δέχθηκαν τον ίδιο χρόνο τη μικρή δόση των 0,7 meq Li/Kg και θυσιάστηκαν αντίστοιχους χρόνους μετά το τέλος των ενέσεων .

Χρόνος όπου θυσιάστηκαν τα πειρ/ζωα μετά την τελευταία ένεση	Μέση τιμή και τυπική απόκλιση της διαμέτρου ινιδίων κολλαγόνου (nm)		t-test μεταξύ πειρ/ζών
	Πειρ/ζωα που δέχθηκαν 1,5 meq Li/Kg	Πειρ/ζωα που δέχθηκαν 0,7 meq Li/Kg	
1-μέρα	104,4 ± 11,6	103,5 ± 11,5	p = 0,045
1- εβδομάδα	98,5 ± 10,5	100,3 ± 9,6	p = 0,0





Σχήμα 5.26: Φωτογραφίες σε περιοχές εγκάρσιες στα ινίδια κολλαγόνου. Στις φωτογραφίες (α,β) τα πειραματόζωα δέχθηκαν για 1- εβδομάδα λίθιο με καθημερινή δόση 0,7 mg Li/Kg και θυσιάστηκαν 1- μέρα και 1- εβδομάδα μετά την τελευταία ένεση αντίστοιχα. Οι φωτογραφίες αυτές συγκρίνονται με τη φωτογραφία (γ) από τους μάρτυρες ηλικίας 6-εβδομάδων. ( × 35.200)

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΘΕΤΙΚΗΣ ΧΡΩΣΗΣ ΙΝΙΔΙΩΝ ΚΟΛΛΑΓΟΝΟΥ

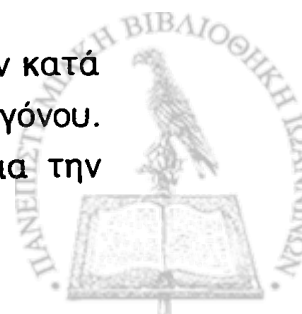
#### II. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΤΩΝ ΦΟΡΤΙΩΝ ΚΑΤΑ ΜΗΚΟΣ ΤΩΝ ΙΝΙΔΙΩΝ ΚΟΛΛΑΓΟΝΟΥ

##### 6.1 Εισαγωγή

Στο προηγούμενο κεφάλαιο αναφέρθηκαν οι παρατηρήσεις που έγιναν κατά την εξέταση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο των δειγμάτων δέρματος από τα πειραματόζωα που δέχθηκαν λίθιο σε διάφορες δόσεις και σε διάφορες διάρκειες. Στο κεφάλαιο αυτό θα αναφερθούν αναλυτικά οι παρατηρήσεις που έγιναν κατά την πυκνομετρία στα ινίδια κολλαγόνου των πειραματοζώων αυτών. Έγινε δηλαδή μια προσπάθεια κατόπιν σάρωσης των ηλεκτρονικών μικρογραφιών και ανάλυσής τους με μια σειρά προγραμμάτων να βρεθούν οι επιδράσεις του λιθίου στα ινίδια κολλαγόνου στο επίπεδο περίπου των 2 nm.

Θα αναφερθούν οι παρατηρήσεις από την οπτική σύγκριση των υποδειγμάτων θετικής χρώσης των ινιδίων κολλαγόνου από τα πειραματόζωα που δέχθηκαν λίθιο σε διάφορες αγωγές και αυτών των μαρτύρων αντίστοιχης ηλικίας. Κατά την οπτική αυτή σύγκριση γίνεται έλεγχος για την ύπαρξη της περιοδικότητας,  $D$ , κατά μήκος του όξονα των ινιδίων. Ο έλεγχος αυτός δίνει πληροφορίες για την ύπαρξη αλλοιώσεων στον προσανατολισμό των μορίων μέσα στα ινίδια κολλαγόνου και επομένως έμεσα και για τη διατήρηση ή όχι των υδρόφοβων και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων.

Επίσης θα αναφερθούν αναλυτικά οι παρατηρήσεις που έγιναν κατά την ανάλυση των υποδειγμάτων θετικής χρώσης ινιδίων κολλαγόνου. Όπως έχει αναφερθεί κατά την ανάλυση αυτή γίνεται έλεγχος για την



ύπαρξη όλων των κορυφών σε μία περίοδο και επίσης ελέγχεται αν αυτές είναι μετατοπισμένες και αν έχουν την ίδια ένταση με τις αντίστοιχες των μαρτύρων. Έτσι η μελέτη αυτή ανιχνεύει σε υπερμικροσκοπικό επίπεδο αν το λίθιο προκαλεί αλλοιώσεις στη πρωτοταγή δομή του κολλαγόνου καθώς και στη διάταξη των μορίων του σε δύο διαστάσεις.

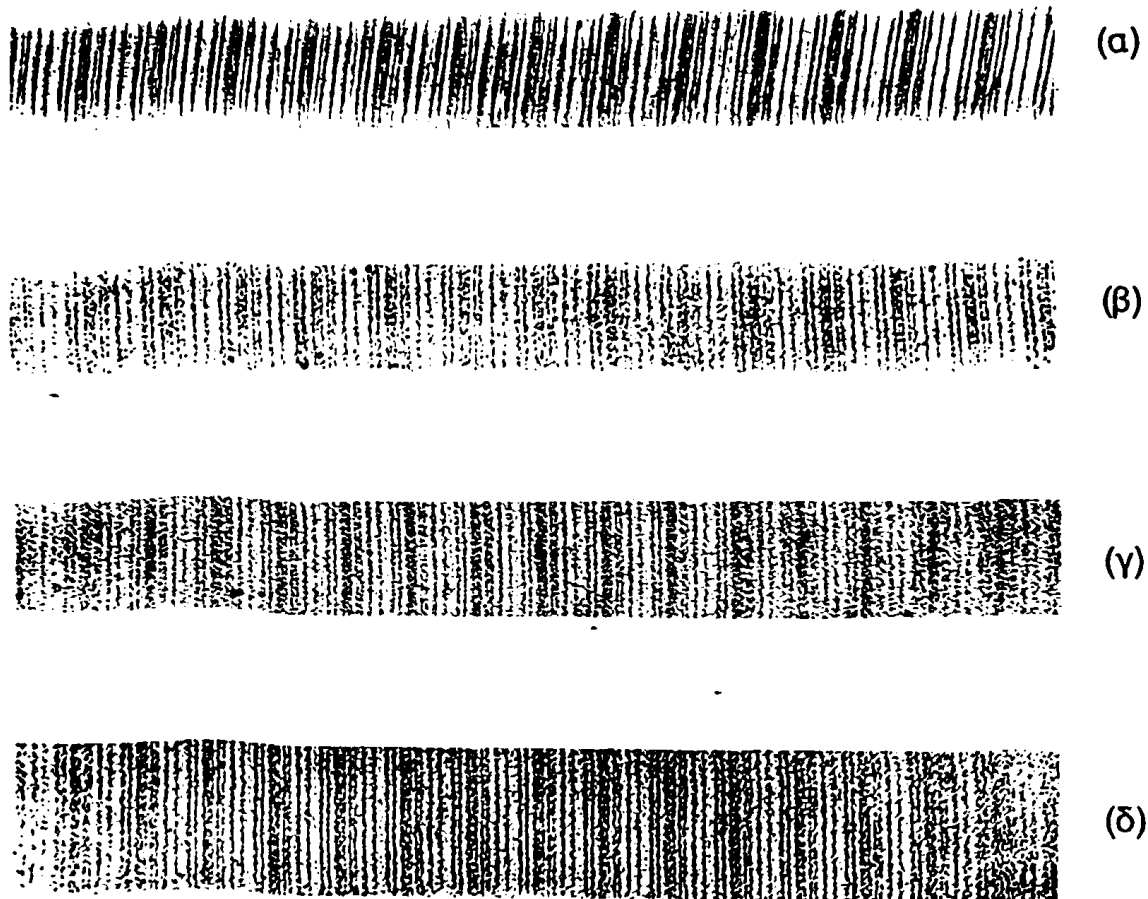
## 6.2 Οπτική σύγκριση των υποδειγμάτων θετικής χρώσης των ινιδίων των πειραματοζώων που δέχθηκαν λίθιο με αυτά των μαρτύρων

Για να γίνει η σύγκριση των υποδειγμάτων των ινιδίων μεταξύ των πειραματοζώων και των μαρτύρων χρησιμοποιήθηκαν φωτογραφίες με μεγάλη μεγένθυση σε περιοχές παράλληλες με τα ινίδια κολλαγόνου.

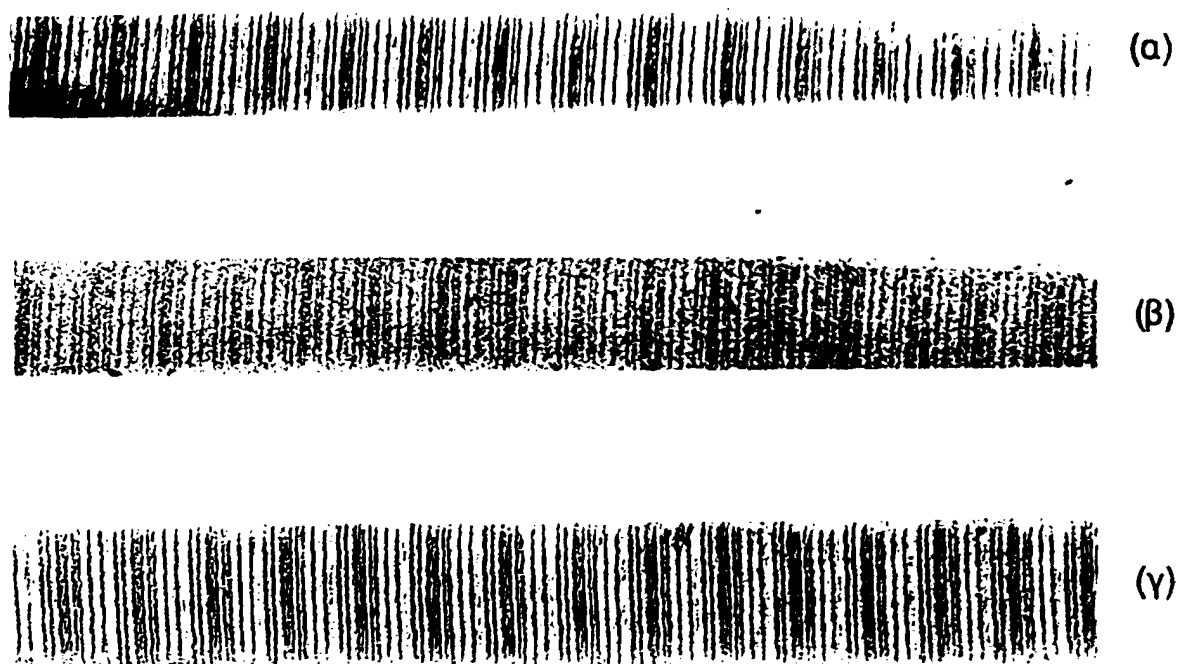
Στο σχήμα 6.1 υποδείγματα από τα πειραματόζωα που δέχθηκαν για 1- μήνα καθημερινή δόση με 0,7, 1,5 και 6 meq Li/Kg συγκρίνονται με ένα υπόδειγμα φυσιολογικού ινιδίου από τους μάρτυρες. Επίσης στο σχήμα 6.2 υποδείγματα από τα πειραματόζωα που δέχθηκαν για 1- εβδομάδα καθημερινή δόση με 0,7 και 1,5 meq Li/Kg συγκρίνονται με ένα υπόδειγμα φυσιολογικού ινιδίου από τους μάρτυρες. Από τις συγκρίσεις αυτές παρατηρούμε ότι η περιοδικότητα D κατά μήκος του άξονα των ινιδίων παραμένει σε όλες τις περιπτώσεις, ακόμα και στα πειραματόζωα που δέχθηκαν για 1- μήνα την μεγάλη καθημερινή δόση των 6 meq Li/Kg.

Η ύπαρξη αυτής της περιοδικότητας σημαίνει ότι τα μόρια μέσα σε κάθε ινίδιο είναι παράλληλα μεταξύ τους και παράλληλα με τον άξονα του ινιδίου και επίσης είναι μετατοπισμένα έτσι ώστε η μετατόπιση μεταξύ δύο μορίων να είναι ακέραιο πολλαπλάσιο της μονάδας D (Hulmes *et al.*, 1973). Με άλλα λόγια το λίθιο δεν φαίνεται να επηρεάζει τον προσανατολισμό των μορίων κολλαγόνου μέσα σε ένα ινίδιο κατά μήκος του άξονά του.





Σχήμα 6.1: Υποδείγματα θετικής χρώσης ινιδίων κολλαγόνου από τα πειραματόζωα που δέχθηκαν για 1- μήνα καθημερινή δόση με 0,7 mg Li/Kg (α), 1,5 mg Li/Kg (β) και 6 mg Li/Kg (γ) και θυσιάστηκαν 1- μήνα μετά την τελευταία ένεση. Τα υποδείγματα αυτά συγκρίνονται με υπόδειγμα φυσιολογικού ινιδίου από τους μάρτυρες (δ). Όλα τα υποδείγματα είναι στην ίδια μεγένθυση. (  $\times 176.000$ ).



Σχήμα 6.2: Υποδείγματα θετικής χρώσης ινιδίων κολλαγόνου από τα πειραματόζωα που δέχθηκαν για 1- εβδομάδα καθημερινή δόση με 0,7mg Li/Kg (α) και 1,5 mg Li/Kg (β) και θυσιάστηκαν 1- εβδομάδα μετά την τελευταία ένεση. Τα υποδείγματα αυτά συγκρίνονται με υπόδειγμα φυσιολογικού ινιδίου από τους μάρτυρες (γ). Όλα τα υποδείγματα είναι στην ίδια μεγέθυνση. ( x 176.000).



### 6.3 Ανάλυση σε υποδείγματα θετικής χρώσης ινιδίων κολλαγόνου από τους μάρτυρες

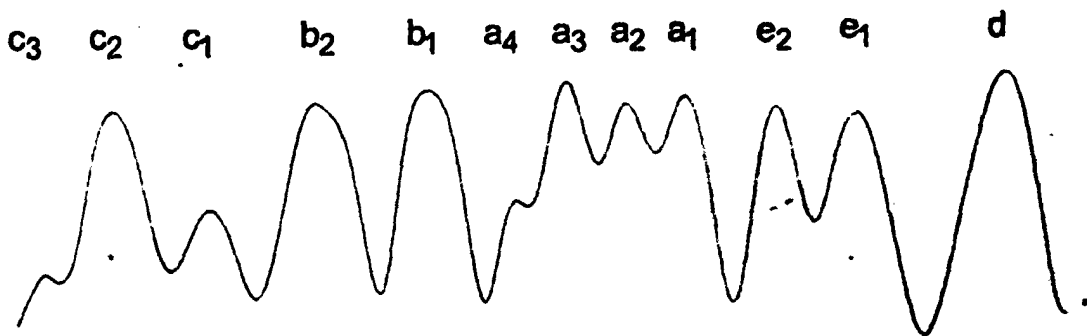
Εγινε επεξεργασία σε ινίδια κολλαγόνου στους μάρτυρες και για κάθε ηλικία βρέθηκε μία καμπύλη από τον μέσο όρο της πυκνομετρίας σε πολλές περιόδους. Η καμπύλη αυτή για κάθε περίπτωση εκφράζει την πιθανότερη κατανομή της πυκνότητας σε μία περίοδο. Με άλλα λόγια η καμπύλη αυτή εκφράζει την πιθανότερη κατανομή των φορτισμένων αμινοξέων του κολλαγόνου ή των φορτίων μέσα σε μία περίοδο, αφού οι σκούρες ταινίες στο υπόδειγμα θετικής χρώσης ινιδίων κολλαγόνου οφείλονται στις αλληλεπιδράσεις των φορτισμένων αμινοξέων με τα μεταλλικά ιόντα της χρώσης.

Στην καμπύλη της πιθανότερης κατανομής των φορτίων σε μία περίοδο μπορεί να υπάρχουν μέχρι 12 κορυφές. Η κάθε μία από τις κορυφές αυτές, όπως έχει αναφερθεί, αντιστοιχεί σε μία από τις 12 σκούρες ταινίες που εμφανίζονται σε μια περίοδο στο υπόδειγμα θετικής χρώσης του ινιδίου.

Οι καμπύλες του μέσου όρου της κατανομής των φορτίων σε μία περίοδο στους μάρτυρες, όπως προκύπτουν από την μικροπυκνομετρία, εμφανίζουν και τις 12 χαρακτηριστικές κορυφές. Αυτό παρατηρείται σε όλους τους μάρτυρες ανεξάρτητα από την ηλικία τους. Άρα η διακριτική ικανότητα του συστήματος είναι πολύ καλή, αφού διακρίνονται όλες οι κορυφές σε κάθε περίοδο.

Στο σχήμα 6.3 φαίνεται η καμπύλη του μέσου όρου της κατανομής των φορτίων σε μια περίοδο στους μάρτυρες ηλικίας 33- εβδομάδων. Πράγματι στην καμπύλη αυτή παρατηρούνται και οι 12 κορυφές. Στο σχήμα φαίνεται και η αντιστοιχία των κορυφών με τις 12 χαρακτηριστικές ταινίες του υποδείγματος, ακολουθώντας την κλασική ονομασία (Hodge and Schmitt, 1960).





Σχήμα 6.3: Η καμπύλη του μέσου όρου της κατανομής των φορτίων σε μία περίοδο D στους μάρτυρες ηλικίας 33- εβδομάδων. Στο σχήμα φαίνεται και η αντιστοιχία των 12 κορυφών της καμπύλης με τις 12 σκούρες ταινίες που εμφανίζονται σε μια περίοδο στο υπόδειγμα θετικής χρώσης ινιδίου κολλαγόνου με την κλασική ονομασία.

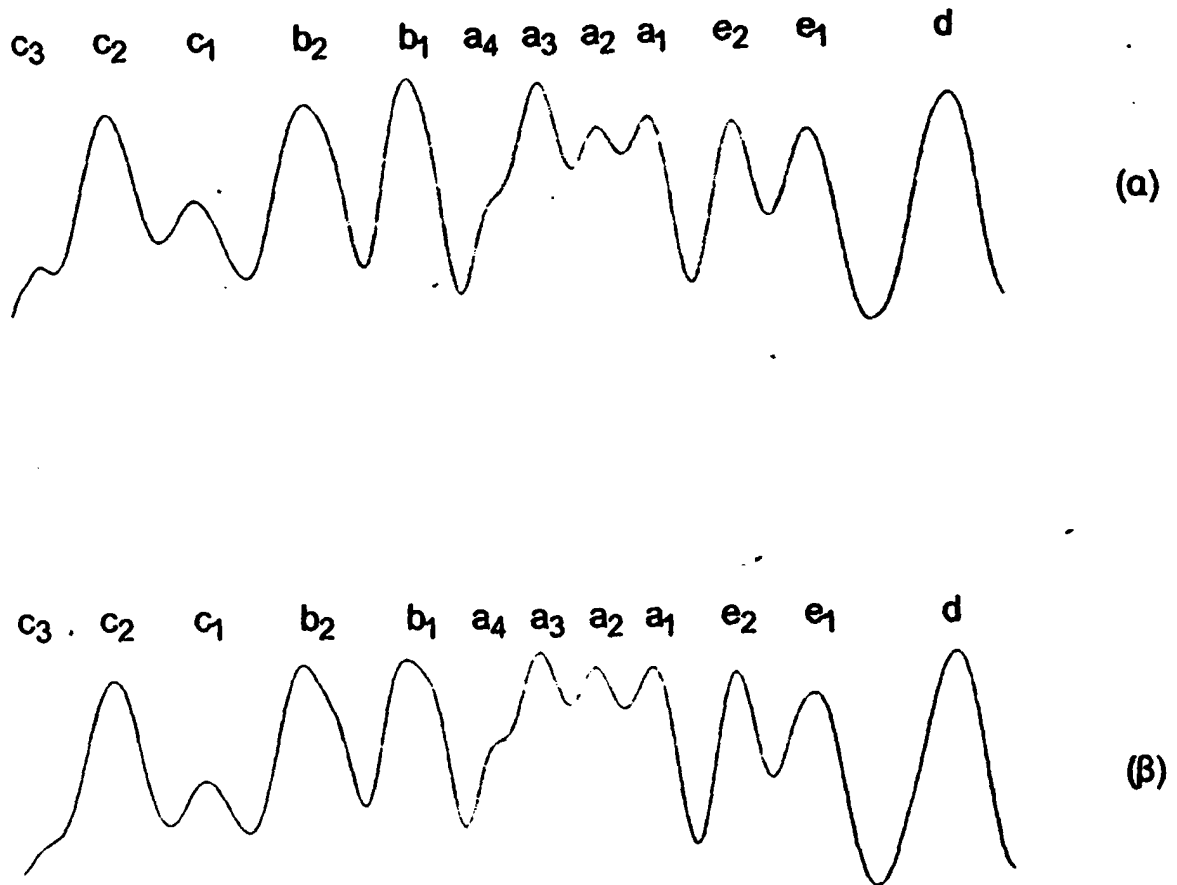
#### 6.4 Ανάλυση σε υποδείγματα θετικής χρώσης ινιδίων κολλαγόνου από τα πειραματόζωα που δέχθηκαν λίθιο

Εγινε ανάλυση σε υποδείγματα θετικής χρώσης ινιδίων κολλαγόνου από τα πειραματόζωα που δέχθηκαν για 1- μήνα καθημερινή δόση με 0,7 meq Li/Kg, 1,5 meq Li/Kg και 6 meq Li/kg και θυσιάστηκαν διάφορους χρόνους μετά την τελευταία ένεση. Επίσης έγινε ανάλυση υποδειγμάτων θετικής χρώσης ινιδίων κολλαγόνου από τα πειραματόζωα που δέχθηκαν για 1- ή για 2- εβδομάδες καθημερινή δόση με 0,7 meq Li/Kg ή με 1,5 meq Li/Kg.

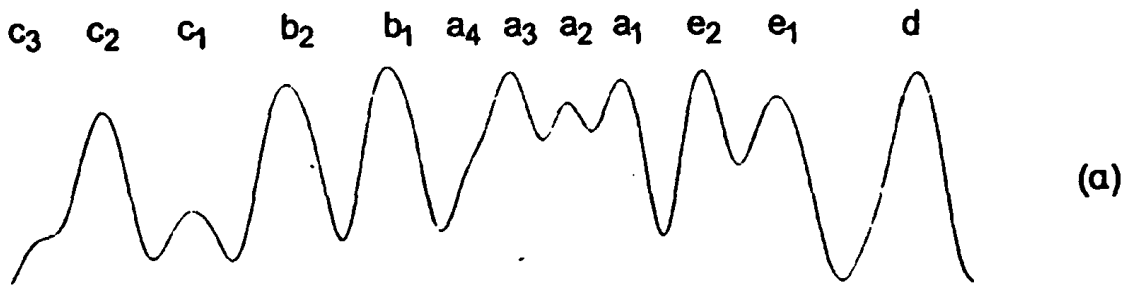
Όπως και στους μάρτυρες, σε κάθε περίπτωση από την επεξεργασία των υποδειγμάτων προκύπτει μια καμπύλη που περιγράφει τον μέσο όρο της κατανομής της πυκνότητας σε μια περίοδο D ή με άλλα λόγια μια καμπύλη της κατανομής των φορτίων σε μια περίοδο. Σε πολλές περιπτώσεις οι καμπύλες αυτές δεν εμφανίζουν και τις 12 χαρακτηριστικές κορυφές, όπως συμβαίνει στους μάρτυρες.

Στα σχήματα 6.4 και 6.5 φαίνονται καμπύλες του μέσου όρου της κατανομής των φορτίων σε διάφορες ομάδες πειραματοζώων. Στο σχήμα 6.4 οι καμπύλες είναι από την ομάδα των πειραματοζώων που δέχθηκαν για 1- μήνα καθημερινή δόση με 6 meq Li/Kg και θυσιάστηκαν 1- μέρα (α) και 6- μήνες (β) μετά την τελευταία ένεση. Στο σχήμα 6.5 οι καμπύλες είναι από την ομάδα των πειραματοζώων που δέχθηκαν για 1- μήνα καθημερινή δόση με 0,7 meq Li/Kg και θυσιάστηκαν 1- μέρα (α) και 6- μήνες (β) μετά την τελευταία ένεση. Πράγματι στις καμπύλες αυτές παρατηρούμε ότι η κορυφή  $a_4$  λείπει εντελώς (σχήμα 6.5(α)) ή δεν εμφανίζεται αρκετά έντονα (σχήματα 6.4 και 6.5(β)). Επίσης σε μερικές ομάδες εμφανίζονται μόλις ίχη από την κορυφή  $c_3$ , όπως στο σχήμα 6.4(β).

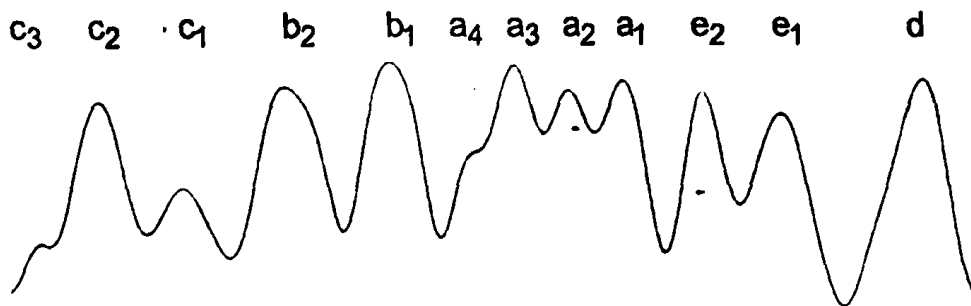




Σχήμα 6.4: Οι καμπύλες του μέσου όρου της κατανομής των φορτίων στις ομάδες των πειραματοζώων που δέχθηκαν για 1- μήνα καθημερινή δόση με 6 mg Li/Kg και θυσιάστηκαν 1- μέρα (α) και 6- μήνες (β) μετά την τελευταία ένεση. Στο σχήμα φαίνεται και η αντιστοιχία των κορυφών με τις σκούρες ταινίες στο υπόδειγμα θετικής χρώσης ινιδίου κολλαγόνου. Τα ονόματα των ταινιών ακολουθούν την κλασική ονοματολογία, όπως έχει προταθεί από τους Hodge and Schmitt (1960). Και στις δύο καμπύλες η κορυφή  $a_4$  δεν εμφανίζεται όπως στους μάρτυρες.



(a)



(β)

Σχήμα 6.5: Οι καμπύλες του μέσου όρου της κατανομής των φορτίων στις ομάδες των πειραματοζώων που δέχθηκαν για 1- μήνα καθημερινή δόση με 0,7 mg Li/Kg και θυσιάστηκαν 1- μέρα (α) και 6- μήνες (β) μετά την τελευταία ένεση. Στο σχήμα φαίνεται και η αντιστοιχία των κορυφών με τις σκούρες ταινίες στο υπόδειγμα θετικής χρώσης ινιδίου κολλαγόνου με την συνηθισμένη ονοματολογία.

(α) Η κορυφή  $a_4$  λείπει εντελώς. (β) Η κορυφή  $a_4$  δεν σχηματίζεται καθαρά.

S



Περισσότερα συμπεράσματα μπορούν να προέρθουν από τη στατιστική σύγκριση των καμπυλών του μέσου όρου της κατανομής των φορτίων μεταξύ των πειραματοζώων μιας ομάδας και των αντίστοιχων μαρτύρων. Από τη σύγκριση αυτή μπορούμε να ελέγξουμε στις ομάδες των ζώων που δέχθηκαν λίθιο αν οι κορυφές έχουν την ίδια ένταση ή αν είναι μετατοπισμένες σε σχέση με τις αντίστοιχες των μαρτύρων.

Στα σχήματα 6.6, και 6.7 γίνεται σύγκριση των καμπυλών από τους μάρτυρες και των καμπυλών από τα πειραματόζωα που δέχθηκαν καθημερινή ένεση για 1- μήνα με τη μεγάλη δόση των 6 meq Li/Kg, ή με τη μικρή δόση των 0,7 meq Li/kg, και θυσιάστηκαν 1- μέρα, 1-, 2- και 6- μήνες μετά το τέλος των ενέσεων. Επίσης στο σχήμα 6.8 γίνεται σύγκριση των καμπυλών από τους μάρτυρες και των καμπυλών από τα πειραματόζωα που δέχθηκαν καθημερινή ένεση λιθίου για το μικρό διάστημα της 1- εβδομάδας με την κοινή κλινική δόση των 1,5 meq Li/Kg, ή με την μικρή δόση των 0,7 meq Li/kg και θυσιάστηκαν 1- εβδομάδα μετά το τέλος της αγωγής.

Από τις συγκρίσεις των καμπυλών παρατηρείται ότι όταν οι ενέσεις διαρκούν 1- μήνα σε όλες τις περιπτώσεις και ανεξάρτητα από τη δόση η κορυφή  $a_4$  δεν σχηματίζεται τόσο καθαρά όσο στους μάρτυρες. Στα πειραματόζωα όμως που δέχθηκαν λίθιο για μικρό διάστημα με την μικρή ή την κοινή κλινική δόση η κορυφή  $a_4$  σχηματίζεται αρκετά καθαρά.

Εκτός από την κορυφή  $a_4$  σε μερικές περιπτώσεις και η κορυφή  $c_3$  δεν σχηματίζεται τόσο καθαρά όσο στους μάρτυρες. Για παράδειγμα αυτό παρατηρείται στους 2- και στους 6- μήνες μετά το τέλος της αγωγής των 6 meq Li/Kg για 1- μήνα (βλέπε σχήματα 6.6(γ) και 6.6(δ)).

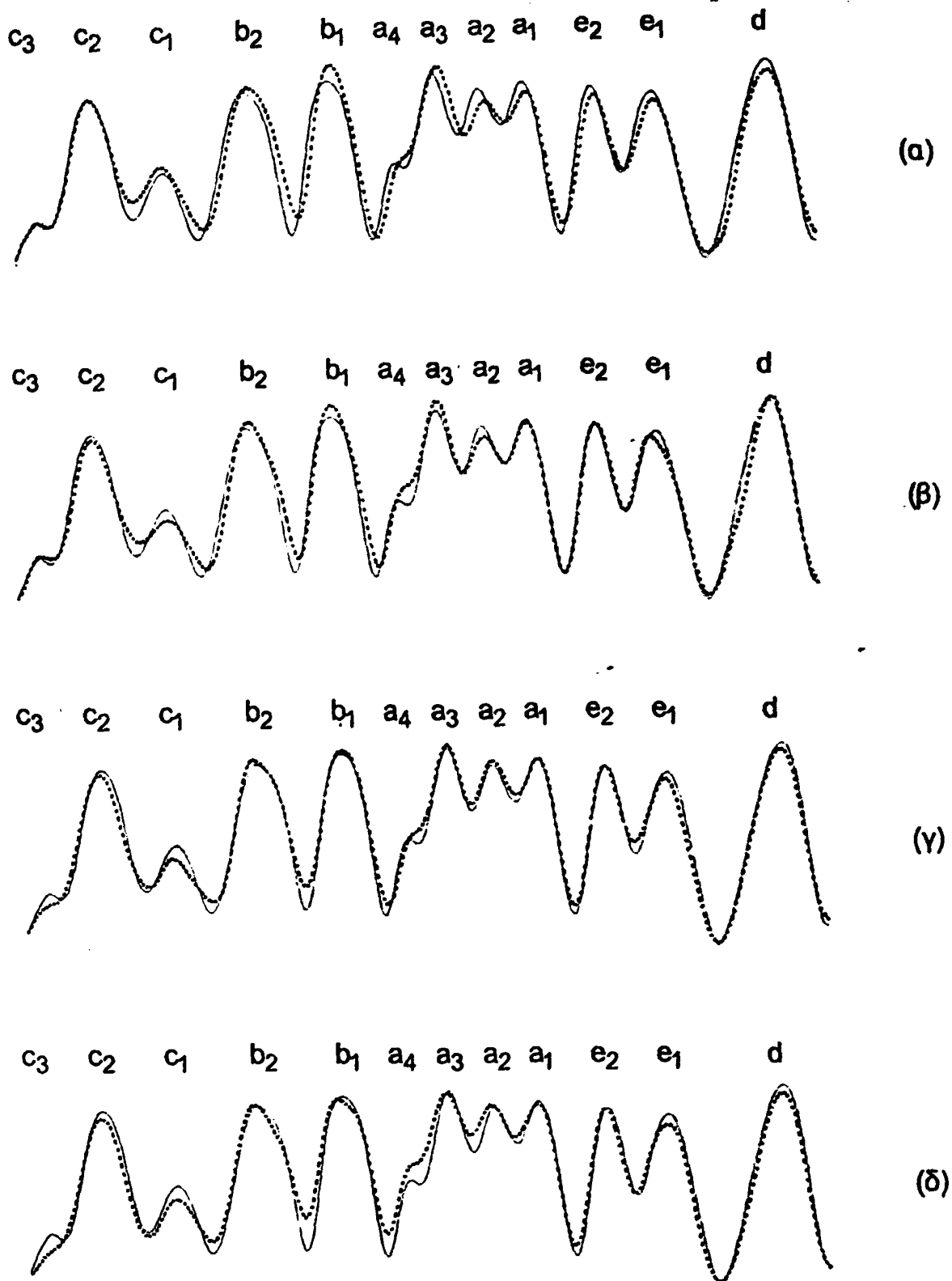
Στα φυσιολογικά ινίδια οι κορυφές  $a_4$  και  $c_3$  είναι οι λιγότερο έντονες από τις 12 κορυφές σε μια περίοδο D. Αν λοιπόν για κάποιο λόγο μειωθεί η διακριτική ικανότητα οι πρώτες από τις κορυφές που θα επηρεαστούν θα είναι η  $a_4$  και η  $c_3$ . Ο μη καλός σχηματισμός των κορυφών αυτών στις περισσότερες ομάδες πειραματοζώων που δέχονται λίθιο, είναι πιθανόν να οφείλεται σε μειωμένη διακριτική ικανότητα που προκαλείται από το λίθιο στα δείγματα. Ίσως, παρουσία λιθίου το βιολογικό υλικό που περιβάλλει το κολλαγόνο να υφίσταται κάποια

συμπύκνωση αποτέλεσμα της οποίας είναι η μειωμένη διακριτική ικανότητα που παρατηρείται στα δείγματα κολλαγόνου όταν εξετάζονται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Αυτό έχει επίσης παρατηρηθεί στο κολλαγόνο από ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (Tzaphlidou *et al.*, 1991a) καθώς και σε κολλαγόνο από ιστό που έχει δεχθεί  $\gamma$ - ακτινοβολία (Tzaphlidou *et al.*, 1991b).

Οι υπόλοιπες κορυφές, εκτός από την  $a_4$  και την  $c_3$ , εμφανίζονται καθαρά στις καμπύλες του μέσου όρου της κατανομής της πυκνότητας σε όλες τις ομάδες των πειραματοζώων, ανεξάρτητα από τη δόση και από τη διάρκεια που δέχονται το λίθιο. Σε μερικές περιπτώσεις όμως κάποιες από τις κορυφές αυτές εμφανίζονται μετατοπισμένες σε σχέση με τις αντίστοιχες των μαρτύρων. Για παράδειγμα στα πειραματοζώα που δέχθηκαν την μεγάλη δόση για 1- μήνα και θυσιάστηκαν 1- μέρα μετά την τελευταία ένεση (σχήμα 6.6(a)) οι  $a$  και οι  $b$  κορυφές φαίνεται να είναι μετατοπισμένες σε σχέση με τις αντίστοιχες των μαρτύρων. Όμως, οι μετατοπίσεις αυτές δεν εμφανίζονται σε όλες τις περιπτώσεις και έτσι δεν μπορούν να αξιολογηθούν. Επίσης δεν υπάρχει κάποια αξιόλογη διαφορά στην ένταση των κορυφών. Αυτό δηλώνει ότι το λίθιο δεν έχει δεσμεύσει φορτισμένα αμινοξέα αλληλεπιδρώντας με αυτά ηλεκτροστατικά.

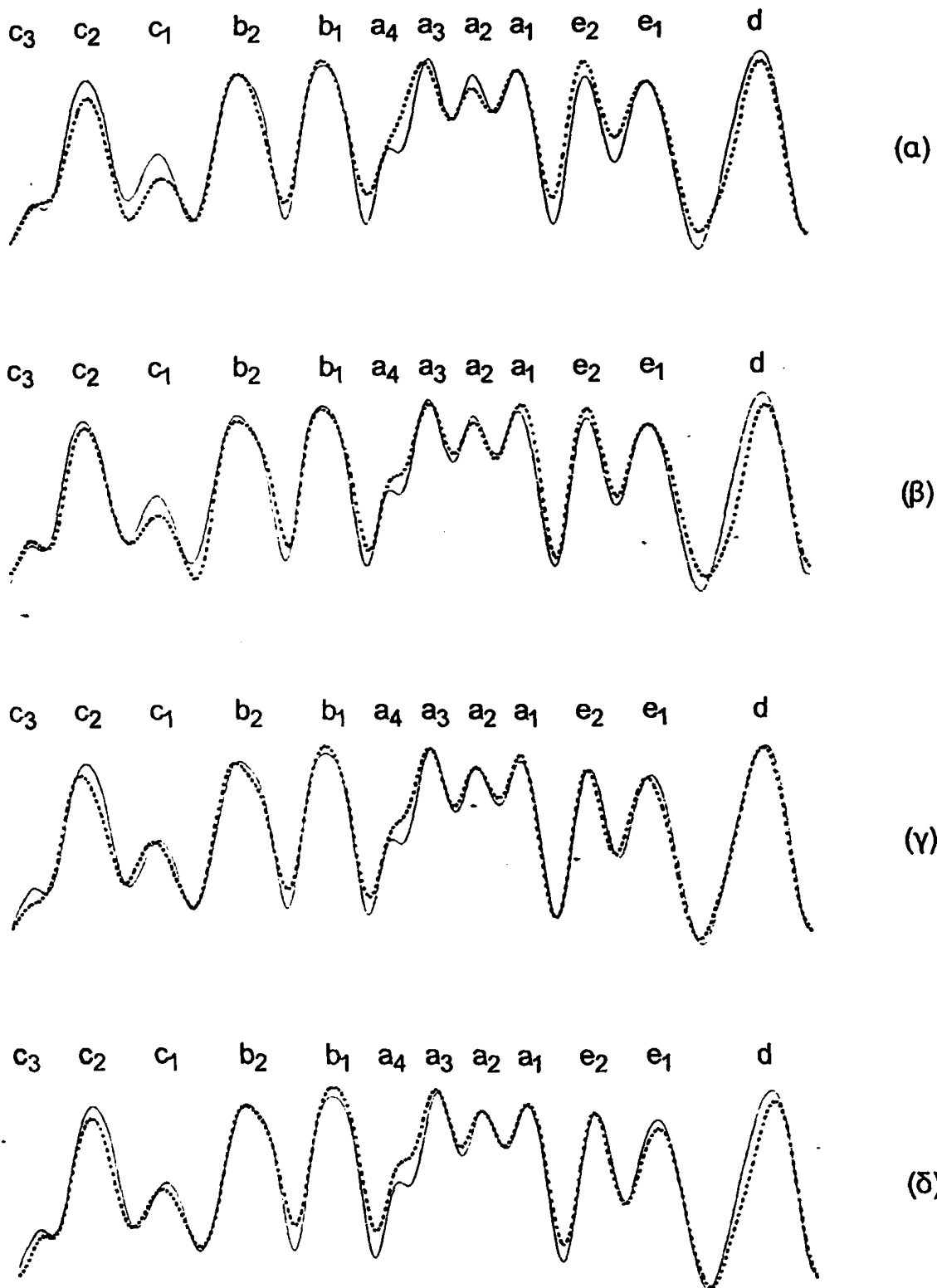
Γενικά, εκτός από το γεγονός ότι στα υποδείγματα θετικής χρώσης προερχόμενα από πειραματοζώα που δέχθηκαν λίθιο έχουμε μειωμένη διακριτική ικανότητα σε σχέση με τους μάρτυρες, το λίθιο δεν φαίνεται να έχει κάποια επίδραση στην κατανομή των φορτισμένων αμινοξέων του κολλαγόνου όπως έχουν οι χρώσεις ή οι σταθεροποιητές. Αν παρατηρήσουμε τα σχήματα 6.6 - 6.8 θα λέγαμε ότι η καμπύλη με λίθιο είναι σχεδόν όμοια με εκείνη των μαρτύρων. Αυτό ίσως δηλώνει ότι στο στάδιο της οργάνωσης των ινιδίων από τα μόρια κολλαγόνου το λίθιο δεν δείχνει να παρεμβαίνει. Προφανώς έχει δράσει σε κάποιο προηγούμενο στάδιο της βιοσύνθεσης του κολλαγόνου προκαλώντας έτσι τις παρατηρούμενες αλλοιώσεις.





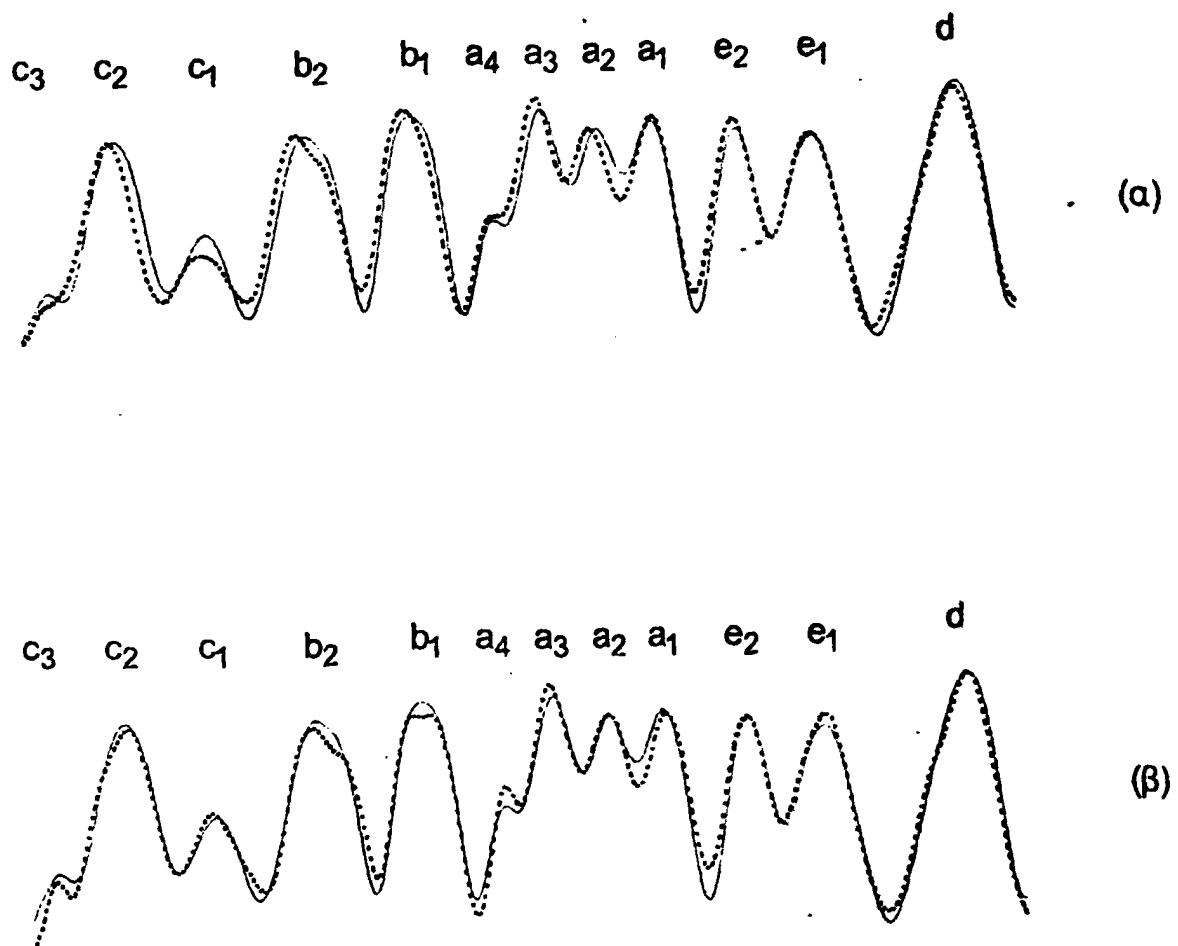
Σχήμα 6.6: Σύγκριση της καμπύλης του μέσου όρου της κατανομής των φορτίων σε μία περίοδο στους μάρτυρες με αυτές από τα πειραματόζωα που δέχθηκαν για 1- μήνα καθημερινή δόση με 6 mg Li/Kg και θυσιάστηκαν (α) 1- μέρα, (β) 1- μήνα, (γ) 2- μήνες και (δ) 6- μήνες μετά το τέλος της αγωγής. Σε κάθε περίπτωση η συνεχής γραμμή είναι η καμπύλη των μαρτύρων και η διακεκομμένη γραμμή είναι η καμπύλη των πειραματοζώων που δέχθηκαν λίθιο.





Σχήμα 6.7: Σύγκριση της καμπύλης του μέσου όρου της κατανομής των φορτίων σε μία περίοδο στους μάρτυρες με αυτές από τα πειραματόζωα που δέχθηκαν για 1- μήνα καθημερινή δόση με 0,7 meq Li/Kg και θυσιάστηκαν (α) 1- μέρα, (β) 1- μήνα, (γ) 2- μήνες και (δ) 6- μήνες μετά το τέλος της αγωγής. Σε κάθε περίπτωση η συνεχής γραμμή είναι η καμπύλη των μαρτύρων και η διακεκομμένη γραμμή είναι η καμπύλη των πειραματοζώων που δέχθηκαν λίθιο.





Σχήμα 6.8: Σύγκριση της καμπύλης του μέσου όρου της κατανομής των φορτίων σε μία περίοδο στους μάρτυρες με αυτές από τα πειραματόζωα που δέχθηκαν για 1-εβδομάδα καθημερινή δόση με 1,5 meq Li/Kg (α) ή 0,7 meq Li/kg (β) και θυσιάστηκαν 1-εβδομάδα μετά το τέλος της αγωγής. Σε κάθε περίπτωση η συνεχής γραμμή είναι η καμπύλη των μαρτύρων και η διακεκομμένη γραμμή είναι η καμπύλη των πειραματοζώων που δέχθηκαν λίθιο.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

### ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

#### 7.1 Συμπεράσματα και συζήτηση από την μελέτη της αρχιτεκτονικής των ινιδίων κολλαγόνου και από την μορφομετρική ανάλυση

Όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο 2, στη βιβλιογραφία αναφέρεται συχνά ότι σε ασθενείς στους οποίους χορηγείται λίθιο εμφανίζονται δερματολογικές αλλοιώσεις (Skoven and Thorman, 1979; Sedgwick, J.B. *et al.*, 1980; Lambert, D. *et al.*, 1982; Frenk, E., 1984; Albrecht, G., 1985).

Με την μελέτη αυτή φαίνεται καθαρά ότι σε ποντίκια που χορηγείται λίθιο με διάφορα δοσολογικά σχήματα εμφανίζονται δομικές αλλοιώσεις στα ινίδια του κολλαγόνου δέρματος. Οι δομικές αυτές αλλοιώσεις που παρατηρούνται από την εξέταση των δειγμάτων δέρματος στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο περιλαμβάνουν:

1) μείωση της μέσης τιμής της διαμέτρου των ινιδίων κολλαγόνου σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή από τους μάρτυρες.

2) σε εγκάρσιες τομές εμφάνιση ινιδίων με μεγάλο και ακανόνιστο σχήμα τα οποία πιθανόν να προέρχονται από αθροίσματα μικρότερων ινιδίων.

3) σε παράλληλες τομές εμφάνιση αλλοιώσεων στην αρχιτεκτονική διάταξη των ινιδίων. Έτσι συχνά υπάρχουν περιοχές όπου τα ινίδια έχουν τυχαία διάταξη. Σε άλλες περιοχές όπου διατηρείται μερικώς η παράλληλη διεύθυνση των ινιδίων εμφανίζονται ινίδια με κυματοειδή μορφή ή ινίδια που αλλάζουν διεύθυνση και φορά.



Οι αλλοιώσεις αυτές εμφανίζονται σε όλα τα δοσολογικά σχήματα που εφαρμόστηκαν: στην μεγάλη δόση των 6 meq Li/Kg, στην κοινή κλινική δόση των 1,5 meq Li/Kg και στην μικρή δόση των 0,7 meq Li/Kg όταν εφαρμόζονται για 1- μήνα, αλλά και όταν οι δύο μικρότερες δόσεις εφαρμόζονται στο μικρότερο διάστημα των 2- ή της 1- εβδομάδας.

Οι παραπάνω δομικές αλλοιώσεις εξαρτώνται από τη δόση και γίνονται εντονότερες με την αύξηση της δόσης. Έτσι για ίδια διάρκεια χορήγησης του λιθίου π.χ. 1- μήνα οι αλλοιώσεις είναι πιο έντονες στη μεγάλη δόση των 6 meq Li/Kg. Πράγματι στην περίπτωση αυτή η διάμετρος των ινιδίων μειώνεται περισσότερο από ότι στις άλλες περιπτώσεις ενώ οι αλλοιώσεις που αφορούν την αρχιτεκτονική διάταξη των ινιδίων καθώς και τα ινίδια με ακανόνιστο σχήμα εμφανίζονται πιο συχνά και είναι πιο έντονα.

Για την ίδια δόση όταν η διάρκεια αγωγής γίνεται μικρότερη οι αλλοιώσεις που παρατηρούνται στις εγκάρσιες τομές γίνονται λιγότερο έντονες. Έτσι με την κοινή κλινική δόση των 1,5 meq Li/Kg όταν η διάρκεια χορήγησης είναι μικρή ( 2- ή 1- εβδομάδα) η μείωση στην μέση διάμετρο των ινιδίων είναι πολύ μικρότερη από όταν η διάρκεια χορήγησης είναι μεγαλύτερη (1- μήνα). Το ίδιο συμβαίνει και στην μικρότερη δόση των 0,7 meq Li/Kg. Επίσης και για τις δύο παραπάνω δόσεις όταν η διάρκεια χορήγησης είναι μικρή δεν εμφανίζονται ινίδια με μεγάλο και ακανόνιστο σχήμα, κάτι που συμβαίνει όταν αυξηθεί η διάρκεια χορήγησης. Χαρακτηριστικό όμως είναι ότι οι αλλοιώσεις που παρατηρούνται στις παράλληλες τομές, δηλαδή στην αρχιτεκτονική διάταξη και μορφή των ινιδίων είναι αξιοσημειώτες και στην πιο μικρή δόση και διάρκεια χορήγησης. Θα μπορούσαμε λοιπόν να πούμε ότι οι αλλοιώσεις αυτές είναι πάντοτε έντονες.

Είναι ενδιαφέρον ότι οι παραπάνω δομικές αλλοιώσεις εμφανίζονται ακόμα και όταν το λίθιο χορηγείται σε πολύ μικρό διάστημα π.χ. για 1- εβδομάδα, ενώ η καθημερινή δόση παραμένει στα θεραπευτικά επίπεδα (1,5 meq Li/Kg) ή σε μικρότερα επίπεδα (0,7 meq Li/Kg). Αυτό επίσης έχει παρατηρηθεί και από τους McAuliffe και Olesen (1983), οι οποίοι αναφέρουν ότι όταν το λίθιο χορηγείται από το στόμα για το μικρό

διάστημα της 1- εβδομάδας μπορεί να εμφανιστούν σημαντικές αλλαγές στη δομή σε διάφορα τμήματα στα νεφρά αρουραίων.

Το λίθιο λοιπόν φαίνεται να δημιουργεί προβλήματα στο σχηματισμό και στη σταθεροποίηση των ινιδίων κολλαγόνου. Ο σχηματισμός των ινιδίων είναι πολύπλοκος και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως αναφέρεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 3. Είναι γνωστό ότι αρκετοί εξωτερικοί παράγοντες σχετίζονται στενά με το κολλαγόνο και επηρεάζουν την ανάπτυξη των ινιδίων (Charman, 1984). Ωστόσο άλλες μελέτες (Bard and Charman, 1973; Holmes and Charman, 1979) υποδεικνύουν ότι και κάποιοι εσωτερικοί παράγοντες επηρεάζουν την ανάπτυξη των ινιδίων, οι οποίοι δρουν με τον ίδιο τρόπο στην *in vivo* και *in vitro* ανασύνταξη των μορίων σε ινίδια. Απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να διερευνηθεί η σχέση των παραγόντων αυτών με την μείωση της διαμέτρου, με την εμφάνιση ινιδίων με μη φυσιολογικό σχήμα καθώς και με τις αλλοιώσεις στην διάταξη των ινιδίων που προέρχονται από την χορήγηση του λιθίου.

Οι Bornstein (1974) και Prockop *et al.*, (1976) υποδεικνύουν ότι ο σχηματισμός των ινιδίων εξαρτάται από την σύνθεση των κολλαγονούχων προδρόμων (precursors), η οποία συμβαίνει κάτω από πολυάριθμες τροποποιήσεις. Αυτές οι τροποποιήσεις περιλαμβάνουν και διάφορες βιοχημικές διαδικασίες. Μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί κανένα βιοχημικό πρόβλημα σε ιστούς που έχουν δεχθεί λίθιο. Οι Holak και Raisz (1979) μελετώντας την επίδραση του λιθίου στο μεταβολισμό των οστών σε καλλιέργειες οργάνων, αναφέρουν ότι το λίθιο δεν αναστέλλει την ενσωμάτωση της προλίνης σε κολλαγονούχες και σε μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες.

Στα αποτελέσματα της έρευνας αυτής, όπως αναφέρθηκε και πιο πριν, φαίνεται ότι η διάμετρος των ινιδίων κολλαγόνου στα πειραματόζωα που δέχθηκαν λίθιο είναι σημαντικά μικρότερη από την αντίστοιχη των μαρτύρων. Πολλοί παράγοντες είναι αυτοί που καθορίζουν την διάμετρο των ινιδίων. Στο δέρμα το κολλαγόνο τύπου I συνυπάρχει με το κολλαγόνο τύπου III το οποίο πιστεύεται ότι παίζει ρόλο στον καθορισμό της διαμέτρου των ινιδίων (Erstein, 1974; Lapierre *et al.*, 1977). Οι Fleischmajer *et al.* (1981) υποστηρίζουν ότι το κολλαγόνο τύπου III, όπου συχνά



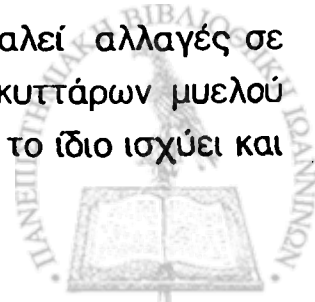
βρίσκεται στους ιστούς μαζί με το κολλαγόνο τύπου I, είναι η αιτία για στενότερα ινίδια στους ιστούς ενηλίκων.

Ενας άλλος παράγοντας που παίζει ρόλο στον καθορισμό της διαμέτρου των ινιδίων είναι η σχετική αναλογία των δύο τύπων κολλαγόνου που συνυπάρχουν στο δέρμα. Οι Byers *et al.*, (1979) σε μελέτες που έκαναν δείχνουν ότι η μείωση του ποσοστού του κολλαγόνου τύπου III στο δέρμα οδηγεί σε στενότερα ινίδια ή τουλάχιστον σε μια κυριαρχία του πληθυσμού των μικρότερων ινιδίων.

Πολλές μελέτες υποστηρίζουν επίσης ότι η διάμετρος των ινιδίων επηρεάζεται από τα αμινοτελικά και τα καρβοξυτελικά προπεπτιδία (τα άκρα δηλαδή του προκολλαγόνου) καθώς και από τον χρόνο που αυτά αποκόπτονται κατά τον σχηματισμό των ινιδίων από τα μόρια του προκολλαγόνου. Οι Lapiere και Nusges (1974) υποστηρίζουν ότι όταν υπάρχει αφθονία σε προκολλαγόνο που έχει άθικτα τα αμινοτελικά του άκρα και χωρίς τα καρβοξυτελικά προπεπτιδία τότε η διάμετρος τείνει να γίνει μικρότερη. Αν το λίθιο επιδρά στα άκρα των μορίων προκολλαγόνου ή επιδρά στο χρόνο αποκοπής των άκρων των μορίων προκολλαγόνου κατά τον σχηματισμό των ινιδίων απαιτεί περαιτέρω έρευνα.

Η αλληλεπίδραση μεταξύ των μορίων κολλαγόνου τύπου I και τύπου III μπορεί να επηρεάζει τη δομή των ινιδίων. Οι Waterhouse *et al.*, (1986) δείχνουν ότι το λίθιο δεν επιδρά στους τύπους του κολλαγόνου που συνθέτονται από κύτταρα μυελού των οστών ποντικών. Παρατήρησαν όμως ότι η σχετική αναλογία των διαφόρων τύπων μπορεί να διαφέρει από την αντίστοιχη των μαρτύρων. Αν αυτό ισχύει ή όχι και στην παρούσα μελέτη απαιτεί περαιτέρω έρευνα.

Επίσης αρκετές μη κολλαγονούχες εξωκυτταρικές συνιστώσες έχουν προταθεί σαν πιθανοί καθοριστικοί παράγοντες για την ανάπτυξη και την διάταξη των ινιδίων (Prockop *et al.*, 1976, Parry *et al.*, 1982). Οι παρατηρούμενες λοιπόν αλλοιώσεις στο κολλαγόνο μπορεί επίσης να οφείλονται σε ανωμαλίες στο μεταβολισμό αυτών των σινιστωσών. Οι Waterhouse *et al.* (1986) υποδεικνύουν ότι το λίθιο προκαλεί αλλαγές σε μη κολλαγονούχες συνιστώσες μέσα σε καλλιέργειες κυττάρων μυελού των οστών ποντικών. Χρειάζεται λοιπόν να ερευνηθεί αν το ίδιο ισχύει και στην παρούσα μελέτη στο δέρμα.



Αξίζει να σημειωθεί ότι σε όλες τις δόσεις οι παρατηρούμενες αλλοιώσεις παραμένουν ακόμα και 6- μήνες μετά το τέλος των ενέσεων. Αυτό ίσως σημαίνει ότι το λίθιο προκαλεί μόνιμες βλάβες στο κολλαγόνο δέρματος. Παρόλα αυτά πολλοί ερευνητές μιλούν για εξαφάνιση ή τουλάχιστον για επαναφορά στα πριν από την θεραπεία επίπεδα των ανωμαλιών που προκαλούνται από το λίθιο στο δέρμα των ασθενών, όταν διακόπτεται η χορήγηση του λιθίου (Skoven and Thormann, 1979; Frenk, 1984; Okrasinski, 1977; Srebrnik *et al.*, 1991).

Συνοψίζοντας, από την μελέτη με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο δειγμάτων δέρματος σε πειραματόζωα στα οποία χορηγήθηκε λίθιο παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλοιώσεις στα ινίδια κολλαγόνου. Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο το λίθιο προκαλεί αυτές τις αλλοιώσεις δεν είναι ακόμη πλήρως γνωστός. Η μελέτη του κολλαγόνου που αποτελεί κύριο συστατικό ιστών και οργάνων μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν βάση για την ερμηνεία των επιδράσεων του λιθίου στα διάφορα όργανα και ιστούς του ανθρώπινου σώματος και για την κατανόηση του μηχανισμού δράσης του.

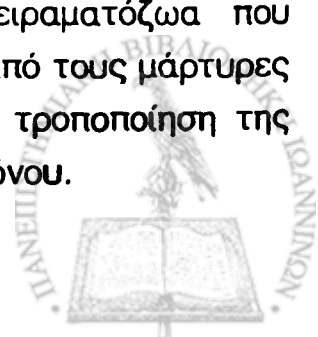


## 7.2 Συμπεράσματα και συζήτηση από την μελέτη της κατανομής των φορτίων κατά μήκος των ινιδίων κολλαγόνου

Όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο 3, στα ινίδια κολλαγόνου υπάρχει μια περιοδικότητα  $D$  κατά μήκος του άξονά τους. Η περιοδικότητα αυτή οφείλεται στο ότι τα μεγάλα μόρια κολλαγόνου διατάσσονται μέσα στο ινίδιο με την ίδια διεύθυνση και φορά και επιπλέον είναι προσανατολισμένα σχεδόν παράλληλα με τον άξονα του ινιδίου. Επίσης τα μόρια κολλαγόνου είναι μετατοπισμένα μεταξύ τους έτσι ώστε η μετατόπιση μεταξύ δύο μορίων να είναι ακέραιο πολλαπλάσιο μιας μονάδας  $D$  ( $=67\text{nm}$ ) (Hodge and Petruska, 1963; Hulmes *et al.*, 1973).

Από την μελέτη που έγινε σε υποδείγματα θετικής χρώσης ινιδίων κολλαγόνου στα πειραματόζωα που δέχθηκαν λίθιο παρατηρήθηκε ότι η περιοδικότητα  $D$  κατά μήκος του άξονα του ινιδίου παραμένει. Αυτό σημαίνει ότι το λίθιο δεν επηρεάζει τον φυσιολογικό προσανατολισμό των μορίων κολλαγόνου μέσα σ' ένα ινίδιο.

Όταν ινίδια κολλαγόνου χρωματιστούν θετικά με διαλύματα βαρέων μετάλλων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σχηματίζεται ένα υπόδειγμα στο οποίο μπορούμε να διακρίνουμε μέχρι 12 σκούρες ταινίες σε κάθε περίοδο  $D$  (Charman, 1974). Από την ανάλυση των υποδειγμάτων θετικής χρώσης, με την μέθοδο που αναπτύχθηκε στην εργασία αυτή, προκύπτει μια καμπύλη για την κατανομή της πυκνότητας σε μια περίοδο  $D$  κατά μήκος του άξονα του ινιδίου. Σε φυσιολογικά ινίδια, στην καμπύλη αυτή διακρίνουμε 12 κορυφές που αντιστοιχούν, όπως έχει αναφερθεί στις 12 χαρακτηριστικές ταινίες του υποδείγματος. Καθώς είναι γνωστό ότι οι 12 σκούρες ταινίες του υποδείγματος οφείλονται στις αλληλεπιδράσεις των μεταλλικών ιόντων της χρώσης με τα φορτισμένα αμινοξέα του κολλαγόνου (Hodge and Schmitt, 1960; Kuhn and Zimmer, 1961) γίνεται κατανοητό ότι οι καμπύλες που προκύπτουν από την ανάλυση των υποδειγμάτων δείχνουν την κατανομή των φορτίων σε μια περίοδο  $D$ . Επομένως η μελέτη των καμπυλών αυτών στα πειραματόζωα που δέχθηκαν λίθιο και η σύγκρισή τους με τις αντίστοιχες από τους μάρτυρες δίνουν πληροφορίες για την επίδραση του λιθίου στην τροποποίηση της κατανομής των φορτίων κατά μήκος των ινιδίων κολλαγόνου.





Από την σύγκριση των καμπυλών του μέσου όρου της κατανομής των φορτίων σε μια περίοδο D μεταξύ των πειραματοζώνων σε κάθε περίπτωση και των αντίστοιχων μαρτύρων παρατηρήθηκαν τα εξής:

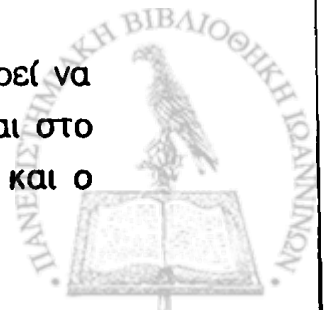
1) Η κορυφή  $a_4$  δεν σχηματίζεται καθόλου ή δεν σχηματίζεται τόσο καθαρά όσο στους μάρτυρες. Σε μερικές περιπτώσεις η κορυφή  $c_3$  δεν σχηματίζεται τόσο καθαρά όσο στους μάρτυρες.

2) Σε ελάχιστες περιπτώσεις κάποιες κορυφές εμφανίζονται μετατοπισμένες σε σχέση με τις αντίστοιχες των μαρτύρων, οι οποίες όμως δεν μπορεί να αξιολογηθούν.

Οι αλλαγές που παρατηρούνται κατά τη σύγκριση των καμπυλών της κατανομής φορτίων σε μια περίοδο D γίνονται λιγότερο έντονες και μερικές εξαφανίζονται όταν μικραίνει η διάρκεια αγωγής. Έτσι για την κοινή κλινική δόση των 1,5 mg Li/Kg και για την μικρή δόση των 0,7 mg Li/Kg όταν το λίθιο χορηγείται για 1- ή 2- εβδομάδες οι κορυφές  $a_4$  και  $c_3$  σχηματίζονται αρκετά καθαρά.

Στο υπόδειγμα θετικής χρώσης των ινιδίων κολλαγόνου οι τέσσερις α ταινίες είναι πολύ κοντά η μία στην άλλη, ενώ οι πιο ασθενείς ταινίες είναι η  $a_4$  και η  $c_3$ . Οι ταινίες λοιπόν αυτές είναι μια χρήσιμη ένδειξη για την διακριτική ικανότητα του υποδείγματος. Έτσι, ο μη καλός σχηματισμός των κορυφών  $a_4$  και  $c_3$  που παρατηρείται κατά την επεξεργασία των υποδειγμάτων θετικής χρώσης των ινιδίων δηλώνει ότι το λίθιο προκαλεί μειωμένη διακριτική ικανότητα στα υποδείγματα. Ίσως παρουσία του λιθίου το βιολογικό υλικό που περιβάλλει το κολλαγόνο να γίνεται πιο συμπαγές αποτέλεσμα του οποίου να είναι η μειωμένη διακριτική ικανότητα που παρατηρείται στα δείγματα κολλαγόνου όταν εξετάζονται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Αυτό έχει παρατηρηθεί και σε υποδείγματα ινιδίων κολλαγόνου δέρματος από ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (Tzaphlidou, 1991) όπως και σε υποδείγματα από κολλαγόνο δέρματος ποντικών που δέχθηκαν γ - ακτινοβολία (Tzaphlidou *et al.*, 1991).

Καλύτερη διερεύνηση του υποδείγματος θετικής χρώσης μπορεί να γίνει αν είναι γνωστή η αναλογία του κολλαγόνου τύπου I/III μια και στο δέρμα από νεαρά ζώα υπάρχουν δύο τύποι κολλαγόνου, ο τύπος I και ο



τύπος III (Epstein 1974; Laurain *et al.*, 1980). Με την παρούσα μελέτη δεν διαχωρίζονται οι δύο αυτοί τύποι. Αυτό σημαίνει ότι σε κάθε περίπτωση στην καμπύλη του μέσου όρου της κατανομής της πυκνότητας μπορεί να συνεισφέρουν και οι δύο τύποι κολλαγόνου χωρίς να είναι κάθε φορά γνωστή η αναλογία με την οποία συμμετέχουν.

Για κάθε έναν από τους δύο αυτούς τύπους κολλαγόνου υπάρχουν κατάλληλες χρωστικές με τις οποίες εντοπίζεται ο συγκεκριμένος τύπος στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Μετά λοιπόν τον εντοπισμό του συγκεκριμένου τύπου στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και την λήψη φωτογραφιών σε υποδείγματα θετικής χρώσης του τύπου αυτού, μπορεί μέσω της μεθόδου που αναπτύχθηκε στην εργασία αυτή να βρεθεί για τον συγκεκριμένο τύπο η καμπύλη του μέσου όρου της κατανομής της πυκνότητας και άρα της κατανομής των φορτίων κατά μήκος μιας περιόδου D. Συγκρίνοντας την καμπύλη αυτή με την αντίστοιχη καμπύλη του ίδιου τύπου από τους μάρτυρες θα μπόρέσει να ειπωθεί με βεβαιότητα αν πράγματι και σε ποιον από τους δύο τύπους κολλαγόνου το λίθιο τροποποιεί την κατανομή των φορτίων κατά μήκος των ινιδίων κολλαγόνου και ιδιαίτερα σε ποιο τμήμα του ινιδίου ή του μορίου συμβαίνουν οι αλλαγές.

Για το κολλαγόνο τύπου I και III η αλληλουχία των αμινοξέων κατά μήκος του άξονα του ινιδίου είναι γνωστή (Fietzek and Kuhn, 1976; Charman *et al.*, 1981; Weiss and Jayson, 1982). Γνωρίζοντας λοιπόν την αλληλουχία των αμινοξέων και την δομή του ινιδίου και του μορίου κολλαγόνου μπορεί να βρεθεί για κάθε έναν από τους δύο παραπάνω τύπους κολλαγόνου μια καμπύλη που θα εκφράζει την θεωρητική κατανομή των φορτισμένων αμινοξέων κατά μήκος του άξονα του ινιδίου σε μια περίοδο D. Στη συνέχεια μέσω των προγραμμάτων που αναπτύχθηκαν στην εργασία αυτή μπορεί να γίνει σύγκριση της θεωρητικής αυτής καμπύλης με την καμπύλη του μέσου όρου της κατανομής των φορτίων σε μια περίοδο D για τον ίδιο τύπο που παίρνουμε από τα πειραματικά δεδομένα. Η σύγκριση αυτή θα δώσει περισσότερες λεπτομέρειες για την ύπαρξη ή όχι τροποποιήσεων στην κατανομή των φορτισμένων αμινοξέων στα ινίδια κολλαγόνου που έχουν δεχθεί λίθιο.



Σε όλες τις περιπτώσεις φαίνεται η καμπύλη κατόπιν αγωγής με λίθιο να είναι σχεδόν όμοια με εκείνη των μαρτύρων. Αυτό ίσως δηλώνει ότι το λίθιο δεν πρέπει να παρεμβαίνει στο στάδιο της ανασύνταξης των ινιδίων από τα μόρια κολλαγόνου. Προφανώς το λίθιο έχει δράσει σε κάποιο προηγούμενο στάδιο της βιοσύνθεσης του κολλαγόνου προκαλώντας τις παρατηρούμενες αλλοιώσεις.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το λίθιο χρησιμοποιείται ευρέως στην ψυχιατρική κυρίως για τη θεραπεία και την προφύλαξη από τις μανιακές και καταθλιπτικές διαταραχές. Παρά τις θετικές του επιδράσεις συχνό έχουν αναφερθεί και πολλές παρενέργειες σε διάφορα όργανα του ανθρώπινου οργανισμού.

Ο ακριβής μηχανισμός της δράσης του λιθίου δεν είναι ακόμα γνωστός. Η παρούσα εργασία επιδιώκει να προσφέρει πληροφορίες χρήσιμες για την κατανόηση του τρόπου δράσης του λιθίου. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε η επίδραση του λιθίου στο κολλαγόνο δέρματος που είναι βασικό συστατικό των ιστών και των οργάνων του σώματος. Σε πειραματόζωα (Swiss Albino mice) χορηγήθηκε λίθιο με διάφορα δοσολογικά σχήματα και εξετάστηκε με τη βοήθεια ηλεκτρονικής μικροσκοπίας η δομή των ινιδίων κολλαγόνου δέρματος σε διάφορους χρόνους μετά το τέλος χορήγησης του λιθίου.

Στα πειραματόζωα που δέχθηκαν για 1- μήνα 0,7- ή 1,5- ή 6- mg/kg βάρους του ζώου και θυσιάστηκαν 1- μέρα, 1-, 2- και 6- μήνες μετά την τελευταία ένεση, παρατηρήθηκαν σημαντικές δομικές αλλοιώσεις στο κολλαγόνο. Με την πρώτη δόση, όπου είναι η κοινή κλινική δόση, αν και υπήρχαν περιοχές όπου τα ινίδια είχαν φυσιολογική διευθέτηση, σε πολλές περιοχές τα ινίδια είχαν χάσει εντελώς τον παράλληλο προσανατολισμό τους, ενώ σε άλλες συνυπάρχουν ινίδια με φυσιολογική και μη φυσιολογική διάταξη. Το φαινόμενο αυτό εμφανίζεται και στην μεγαλύτερη και στην μικρότερη δόση και μάλιστα γίνεται εντονότερο όσο αυξάνει η δόση. Και στις 3 δόσεις εμφανίζονται περιοχές όπου η παράλληλη διάταξη διακόπτεται από ινίδια που αλλάζουν διεύθυνση και φορά (ινίδια με hairpin loop), ενώ σε άλλες περιοχές εμφανίζονται ινίδια με κυματοειδή μορφή.

Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις η μέση διάμετρος των ινιδίων κολλαγόνου είναι σημαντικά μικρότερη από αυτή των αντίστοιχων μαρτύρων. Επίσης τα ινίδια παρουσιάζουν μια μεγαλύτερη διακύμανση στη διάμετρο σε σχέση με αυτή των αντίστοιχων μαρτύρων. Σε εγκάρσιες τομές εμφανίζονται ινίδια με μεγάλο και ακανόνιστο σχήμα, τα οποία

πρέπει να προέρχονται από αθροίσματα μικρότερων ινιδίων. Τα ινίδια αυτά αποτελούν περίπου το (10 - 22)% του ολικού πληθυσμού.

Στα πειραματόζωα που χορηγείται η κοινή κλινική δόση των 1,5 meq Li/Kg για μικρότερο διάστημα, 1-, ή 2- εβδομάδες, και στα πειραματόζωα που χορηγείται η μικρή δόση των 0,7 meq Li/Kg για το μικρό διάστημα της 1- εβδομάδας, εξακολουθούν να υπάρχουν όλες οι προαναφερόμενες αλλοιώσεις που αφορούν την οργάνωση και τη διάταξη των ινιδίων. Ωστόσο στις περιπτώσεις αυτές, όπου η διάρκεια χορήγησης είναι μικρή, στις εγκάρσιες τομές η εικόνα δεν είναι τόσο δραματική, αφού δεν υπάρχει μεγάλη διακύμανση στη διάμετρο των ινιδίων και δεν εμφανίζονται αθροίσματα ινιδίων. Ακόμα, αν και η μέση διάμετρος των ινιδίων εξακολουθεί να παραμένει μικρότερη από αυτή των αντίστοιχων μαρτύρων, παρόλα αυτά η μείωση δεν είναι τόσο έντονη όσο στα πειραματόζωα που δέχθηκαν το λίθιο σε μεγαλύτερο διάστημα.

Επίσης στην εργασία αυτή αναπτύχθηκε μια μέθοδος για την εύρεση της κατανομής των φορτισμένων αμινοξέων κατά μήκος του άξονα των ινιδίων κολλαγόνου και στη συνέχεια για τη σύγκριση δύο τέτοιων κατανομών από πειραματικά δεδομένα. Με την μέθοδο αυτή μπορούμε να εντοπίσουμε σε ποιο ακριβώς σημείο του ινιδίου ή ακόμα και του μορίου κολλαγόνου υπάρχουν ανωμαλίες προερχόμενες από κάποιον παράγοντα.

Η παραπάνω τεχνική εφαρμόστηκε στα ινίδια των πειραματοζώων που δέχθηκαν λίθιο με διάφορα δοσολογικά σχήματα και έγινε σύγκριση σε κάθε περίπτωση της κατανομής από τα πειραματόζωα με αυτήν από τους αντίστοιχους μάρτυρες. Από τη μελέτη αυτή παρατηρήθηκε ότι: 1) η περιοδικότητα D παραμένει σε όλες τις περιπτώσεις, 2) υπάρχει μειωμένη διακριτική ικανότητα σε σχέση με τους μάρτυρες, 3) η καμπύλη κατανομής των φορτίων ύστερα από αγωγή με λίθιο σε όλες τις περιπτώσεις δεν παρουσιάζει σημαντικές διαφορές από εκείνη των μαρτύρων δηλώνοντας έτσι ότι το λίθιο ίσως δεν παρεμβαίνει στο στάδιο σχηματισμού των ινιδίων από τα μόρια κολλαγόνου.



## SYMMARY

Lithium is a usual drug in the treatment and prophylaxis of manic - depressive disorders. Many studies on its side effects on various tissues or organs of the body have been publised.

The exact mechanism of lithium action remains unknown. The aim of the present work is to seek information for understanding the action mechanisms of lithium. So, the effects of lithium on collagen, which is one of the major components of tissue and organs, was studied. The structure of mouse skin collagen fibrils after different lithium treatments was studied by electron microscopy.

Animals (Swiss Albino mice) were injected intraperitonealy with lithium chloride at doses 0.7-, 1.5-, and 6- meq Li/Kg of body weight. These animals were sacrificed 1- day, 1-, 2- and 6- months after the end of 30 consecutive days experimental period. With all dose although there were areas with normal collagen fibrils there were regions where the characteristic parrallel packing of fibrils was lost completely or it was preserved for a part of the area. These alterations become more serious when the dose is increased. Also, in some regions the normal parallel packing was interrupted by fibrils forming a "hairpin loop" and in some others helical twisting was apparent.

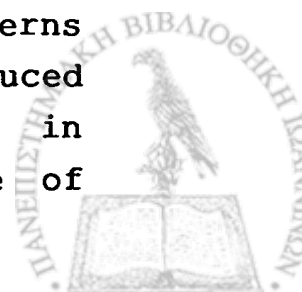
In all cases, lithium treated collagen fibrils had a marked decrease in mean diameter compared to normal with a high variability in width. Also, many clusters of abnormal fibrils where found when viewed in cross - sections. These abnormal large

fibrils have an irregular outline deviated from an ideal circular or elliptical profile. These fibrils constituted approximately (10 - 22) per cent of the whole population.

Some other animals were injected intraperitoneally with lithium chloride at the common clinically dose of 1.5 meq Li/Kg of body weight for 1- and 2- weeks, or at a lower dose of 0.7 meq Li/Kg of body weight for 1- week. Shorter experimental periods (1-, or 2-weeks) lead to the same features concerning collagen disorganization as with longer experimental period (30 days). However, in short lithium treatment the view in the cross sections is not so dramatical. In other words, there is no high variability in fibril width and the clusters are no anymore observed. Also, although fibrils are smaller than the control, the decrease in mean diameter is not so pronounced as with longer treatment.

In this work a new method is described to compare two experimental sets of data i.e. collagen structural data obtained by electron microscopy. In this respect, collagen provides a valuable model system, firstly for studying the mechanisms of various treatments on a protein, and secondly for detecting and locating the alterations in collagen fibril structure produced by a treatment or disorder.

This method was applied in mouse skin collagen fibrils treated with lithium. In all cases, the normal banding periodicity retains indicating that lithium does not disturb the normal axial relationships between molecules in such fibrils. However the resolution of the staining patterns from lithium treated collagen fibrils is reduced compared with the normal pattern. This decrease in resolution becomes more pronounced when the time of



treatment increases. This is possibly because lithium fibrils might be more compact than the normal ones and, drying on the grid, give thicker specimens in which lower resolutions are attainable. In general, the lithium distribution is similar to normal indicating that lithium is not affecting the stage where collagen molecules are assembled into fibrils but into a previous biosynthesis stage.





## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

Το παρακάτω πρόγραμμα δημιουργήθηκε για την τροποποίηση των αρχείων, που δημιουργούνται από το πρόγραμμα IPPLUS, έτσι ώστε να είναι δυνατή η επεξεργασία τους από γλώσσες προγραμματισμού. Τα αρχεία αυτά περιέχουν τα δεδομένα για την κατανομή των φορτίων κατά μήκος του άξονα των ινιδίων κολλαγόνου.

PROGRAM CORRECTION;

USES CRT;

TYPE RANGE1 = ARRAY[1..120] OF STRING;  
RANGE2 = ARRAY[1..120] OF INTEGER;  
STR = STRING[40];

VAR I, N, NUM, T, CODE :INTEGER;  
IPDATA1, IPDATA2 :RANGE1;  
X, FILENAME :STRING;  
DATAFILE :TEXT;  
CORDATA :RANGE2;  
E :0..1;  
B :BOOLEAN;  
EPILOGH :CHAR;

PROCEDURE READDATA;

VAR FILEFIRST :STR;



```
FUNCTION EXIST(FILENAME :STR) :BOOLEAN;
```

```
VAR F :FILE;
```

```
BEGIN
```

```
  ASSIGN(F,FILENAME);
```

```
  {$I-} RESET(F) {$I+};
```

```
  EXIST:=(IORESULT=0);
```

```
END;
```

```
BEGIN
```

```
  E:=0;
```

```
  WRITELN('GIVE THE FILE NAME FOR CHANGING ');
```

```
  READLN(FILEFIRST);
```

```
  FILENAME:='A:\' + FILEFIRST;
```

```
  IF NOT EXIST(FILENAME) THEN WRITELN('File not Found ')
  ELSE
```

```
    BEGIN
```

```
      BEGIN
```

```
        ASSIGN(DATAFILE,FILENAME);
```

```
        RESET(DATAFILE);
```

```
        READLN(DATAFILE,X);
```

```
        I:=1;
```

```
        IPDATA1[I]:=X;
```

```
        WHILE NOT EOF(DATAFILE) DO
```

```
          BEGIN
```

```
            READLN(DATAFILE,X);
```

```
            I:=I+1;
```

```
            IPDATA1[I]:=X;
```

```
          END;
```

```
        CLOSE(DATAFILE);
```

```
        N:=I;
```

```
        E:=1;
```

```
        WRITELN('The Data of ',FILENAME,' have read ');
```

```
        WRITELN;
```

```
      END;
```

```
    END;
```



```
PROCEDURE CORRECTDATA;
```

```
BEGIN
```

```
  I:=1;
```

```
  WHILE I+11<=N DO
```

```
    BEGIN
```

```
      IPDATA2[I]:=COPY(IPDATA1[I+11],17,4);
```

```
      VAL(IPDATA2[I],T,CODE);
```

```
      CORDATA[I]:=T;
```

```
      I:=I+1;
```

```
    END;
```

```
  WRITELN('CORDATA');
```

```
  FOR I:=1 TO N-11 DO WRITE(CORDATA[I]:4);
```

```
  WRITELN;
```

```
END;
```

```
PROCEDURE WRITEDATA;
```

```
VAR FILEFIRST : STR;
```

```
BEGIN
```

```
  WRITELN('GIVE THE FILE NAME FOR THE CORRECTION DATA ');
```

```
  READLN(FILEFIRST);
```

```
  FILENAME:='A:\' + FILEFIRST;
```

```
  ASSIGN(DATAFILE,FILENAME);
```

```
  REWRITE(DATAFILE);
```

```
  FOR I:=1 TO N-11 DO
```

```
    BEGIN
```

```
      T:=CORDATA[I];
```

```
      WRITELN(DATAFILE,T);
```

```
    END;
```

```
  CLOSE(DATAFILE);
```



```
WRITELN('The Data have written in ',FILENAME);  
WRITELN;  
END;
```

```
BEGIN  
CLRSCR;  
B:=TRUE;  
WHILE B DO  
  BEGIN  
    WRITELN('Do you want to CORRECT a IPPLUS FILE ?');  
    WRITE('GIVE Y OR N : ');  
    READLN(EPILOGH);  
    IF (EPILOGH='Y') OR (EPILOGH='y') THEN  
      BEGIN  
        READDATA;  
        IF E=1 THEN  
          BEGIN  
            CORRECTDATA;  
            WRITEDATA;  
          END;  
        END  
      ELSE B:=FALSE;  
    END;  
  END.  
END.
```



## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

Το παρακάτω πρόγραμμα δημιουργήθηκε για να βρίσκει την καμπύλη του μέσου όρου της κατανομής των φορτίων κατά μήκος του άξονα των ινιδίων κολλαγόνου και για να συγκρίνει καμπύλες κατανομής φορτίων. Το πρόγραμμα χρησιμοποιεί την μεθοδολογία που αναφέρεται αναλυτικά στην παράγραφο 4.7.3, για την εύρεση της καμπύλης του μέσου όρου της κατανομής των φορτίων. Για την σύγκριση καμπυλών κατανομής φορτίων το πρόγραμμα χρησιμοποιεί την μεθοδολογία της παραγράφου 4.7.4.

PROGRAM DENSITY;

Uses Crt;

TYPE RANGE2 = ARRAY[1..200,1..30] OF REAL;  
RANGE = ARRAY[1..200] OF REAL;

Var C : BOOLEAN;  
CHOISE1 : CHAR;  
E : 0..1;  
ARRAYDATA : RANGE2;  
TOTAL,MEAN,START,FIRST,TEMPDATA : RANGE;

PROCEDURE MEANSET;

VAR B : BOOLEAN;  
EPILOGH : CHAR;  
J,NDIV,NT,A : INTEGER;  
NUM,K : 0..20;  
NUMBER : 0..20;  
IER : 0..1;



```
PROCEDURE READDATA;
```

```
TYPE STR = STRING[40];
```

```
Var DATAFILE           :TEXT;
    FILENAME,FILEFIRST :STR;
    I                   :INTEGER;
    X                   :REAL;
```

```
FUNCTION EXIST (FILENAME :STR) :BOOLEAN;
```

```
VAR F :FILE;
```

```
BEGIN
```

```
  ASSIGN(F,FILENAME);
```

```
  {$I-} RESET(F) {$I+};
```

```
  EXIST:=(IOresult=0);
```

```
END;
```

```
BEGIN
```

```
  E:=0;
```

```
  WRITE('Give the File name : '); READLN(FILEFIRST);
```

```
  FILENAME:='A:\' + FILEFIRST;
```

```
  IF NOT EXIST(FILENAME) THEN WRITELN ('File not Found')
```

```
  ELSE
```

```
    BEGIN
```

```
      E:=1;
```

```
      ASSIGN(DATAFILE,FILENAME);
```

```
      RESET(DATAFILE);
```

```
      READLN(DATAFILE,X);
```

```
      I:=1;
```

```
      START[I]:=X;
```

```
      WHILE NOT EOF(DATAFILE) DO
```

```
        BEGIN
```

```
          READLN(DATAFILE,X);
```

```
          I:=I+1;
```

```
          START[I]:=X;
```



```

END;
CLOSE(DATAFILE);
NDIV:=I;
WRITELN;
WRITELN('START');
FOR I:=1 TO NDIV DO WRITE(START[I]:4:0);
WRITELN;
WRITELN('The Data of File ',FILENAME,' have read. ');
WRITELN;
END;
END;

```

```

PROCEDURE CUBICSPLINE;

```

```

TYPE RANGE3 = ARRAY[1..200] OF REAL;

```

```

VAR I, IPOS :INTEGER;
    POS, T, Q1, Q2, Q3, RNDIV, RI :REAL;
    D, F, A, B, C :RANGE3;

```

```

BEGIN

```

```

FOR I:=2 TO NDIV DO

```

```

BEGIN

```

```

D[I]:=START[I]-START[I-1];

```

```

END;

```

```

F[1]:=3*D[2];

```

```

FOR I:=2 TO NDIV-1 DO F[I]:=3*(D[I] + D[I+1]);

```

```

F[NDIV]:=3 * D[NDIV];

```

```

FOR I:=2 TO NDIV DO A[I] :=1;

```

```

FOR I:=1 TO NDIV-1 DO C[I]:=1;

```

```

B[1]:=2;

```

```

FOR I:=2 TO NDIV-1 DO B[I]:=4;

```



```

B[NDIV]:=2;

IER:=0;
I:=2;
WHILE (IER=0) AND (I<=NDIV) DO
BEGIN
  IF B[I-1]=0.0 THEN IER:=1
  ELSE
    BEGIN
      A[I]:=A[I]/B[I-1];
      B[I]:=B[I]-A[I] * C[I-1];
    END;
  I:=I+1;
END;

IF B[NDIV]=0.0 THEN IER:=1;

IF IER<>0 THEN
BEGIN
  WRITELN('THESE DATA CAN NOT BEEN USED');
  WRITELN('GIVE THE NEXT SET OF DATA ');
  READLN;
END
ELSE
BEGIN
  FOR I:=2 TO NDIV DO F[I]:=F[I] - A[I] * F[I-1];
  F[NDIV]:=F[NDIV]/B[NDIV];
  FOR I:=NDIV-1 DOWNTO 1 DO F[I]:=(F[I] - C[I] * F[I+1])/B[I];

  NT:=120;
  TEMPDATA[1]:=START[1];
  FOR I:=2 TO NT-1 DO
  BEGIN
    RI:=INT(I-1);
    RNDIV:=INT(NDIV-1);
    POS:=(RI * RNDIV)/(NT-1) +1.0;
    IPOS:=TRUNC(POS);
    T:=POS - IPOS;

```





```

Q1:=T * START[IPOS+1];
Q2:=(1-T) * START[IPOS];
Q3:=T*(1-T)*((F[IPOS]-D[IPOS+1])*(1-T)-(F[IPOS+1]-D[IPOS+1])*T);
TEMPDATA[I]:=Q1 + Q2 + Q3;
END;
TEMPDATA[NT]:=START[NDIV];
WRITELN('NOW THE DATA ARE ',NT);
WRITELN;
END;
END;

```

```

PROCEDURE WRITEDATA(VAR DATA :RANGE);

```

```

TYPE STR = STRING[40];

```

```

Var DATAFILE : TEXT;
    FILENAME : STR;
    X          : REAL;
    I          : INTEGER;

```

```

BEGIN

```

```

WRITELN;
WRITE(' Give the file name : '); READLN(FILENAME);
ASSIGN(DATAFILE,FILENAME);
REWRITE(DATAFILE);
FOR I:=1 TO NT DO
BEGIN
X:=DATA[I];
WRITELN(DATAFILE,X);
END;
CLOSE(DATAFILE);
WRITE(' All data have been written '); READLN;
END;

```



PROCEDURE COMPAIRE;

Var KAT, ITOP : -10..10;  
 L : INTEGER;  
 TOPRES, X, ADD, SUMRES, TOPX, TOPADD : REAL;

PROCEDURE LEASTSQUARE;

Var SUMX, SUMY, SUMXX, SUMXY, FACTOR :REAL;  
 N :INTEGER;

BEGIN

SUMX:=0.0;  
 SUMY:=0.0;  
 SUMXX:=0.0;  
 SUMXY:=0.0;

FOR N:=1 TO NT DO

BEGIN

SUMX:=SUMX + TEMPDATA[N];  
 SUMY:=SUMY + FIRST[N];  
 SUMXX:=SUMXX + SQR(TEMPDATA[N]);  
 SUMXY:=SUMXY + TEMPDATA[N] \* FIRST[N];  
 END;

FACTOR:=NT \* SUMXX - SQR(SUMX);  
 X:=(NT \* SUMXY - SUMX \* SUMY)/FACTOR;  
 ADD:=(SUMY \* SUMXX - SUMX \* SUMXY)/FACTOR;



```

SUMRES:=0.0;
FOR N:=1 TO NT DO
  BEGIN
    SUMRES:=SUMRES + SQR(ABS(FIRST[N]-TEMPDATA[N]*X-ADD));
  END;
END;

```

```

PROCEDURE ROTATE;

```

```

Var COUNT      :INTEGER;
    I, N        :INTEGER;

```

```

BEGIN
  COUNT:=0;
  FOR N:=1 TO NT DO
    BEGIN
      IF N+KAT <= 0 THEN I:=NT+N+KAT;
      IF (N+KAT > 0) AND (N+KAT <= NT) THEN I:=N+KAT;
      IF N+KAT > NT THEN
        BEGIN
          COUNT:=COUNT + 1;
          I:=COUNT;
        END;
      TEMPDATA[N]:=ARRAYDATA[I,NUM];
    END;
  END;
END;

```



```

BEGIN
TOPRES:=0.1E+20;
FOR KAT:=-10 TO 10 DO
  BEGIN
  ROTATE;
  LEASTSQUARE;
  IF SUMRES <= TOPRES THEN
  BEGIN
  TOPRES:=SUMRES;
  TOPX:=X;
  TOPADD:=ADD;
  ITOP:=KAT;
  END;
  END;
WRITE('ITOP ');WRITELN(ITOP);
KAT:=ITOP;
ROTATE;
FOR L:=1 TO NT DO TEMPDATA[L]:=TEMPDATA[L] * TOPX + TOPADD;
END;

```

```

BEGIN
FOR J:=1 TO 200 DO
  BEGIN
  MEAN[J]:=0.0;
  TOTAL[J]:=0.0;
  FIRST[J]:=0.0;
  TEMPDATA[J]:=0.0;
  FOR A:=1 TO 30 DO ARRAYDATA[J,A]:=0.0
  END;
  B:=TRUE;
  NUMBER:=0;
  WHILE B DO
  BEGIN
  WRITELN('Do you want to read a new DATA FILE of set?');

```



```

WRITE('Give Y or N : ');
READLN(EPILOGH);
IF (EPILOGH='Y') or (EPILOGH='y') THEN
  BEGIN
    READDATA;
    IF E=1 THEN
      BEGIN
        CUBICSPLINE;
        IF IER=0 THEN
          BEGIN
            NUMBER:=NUMBER+1;
            FOR J:=1 TO NT DO ARRAYDATA[J,NUMBER]:=TEMPDATA[J];
          END;
        END;
      END
    ELSE B:=FALSE
  END;
FOR J:=1 TO NT DO
  BEGIN
    FIRST[J]:=ARRAYDATA[J,1];
    TOTAL[J]:=ARRAYDATA[J,1];
  END;

```

```

WRITELN('ARRAYDATA');
NUM:=0;
FOR J:=1 TO NT DO
  BEGIN
    NUM:=NUM+1;
    IF NUM<20 THEN
      BEGIN
        FOR K:=1 TO NUMBER DO WRITE(ARRAYDATA[J,K]:4:0);
        WRITELN;
      END;
    IF NUM=20 THEN
      BEGIN
        FOR K:=1 TO NUMBER DO WRITE(ARRAYDATA[J,K]:4:0);
        WRITELN;

```



```
READLN;  
NUM:=0;  
END;  
END;
```

```
FOR NUM:=2 TO NUMBER DO
```

```
  BEGIN
```

```
    COMPAIRE;
```

```
    FOR J:=1 TO NT DO TOTAL[J]:=TOTAL[J] + TEMPDATA[J];
```

```
  END;
```

```
  WRITELN;
```

```
  WRITELN('Do you want to find the MEAN DATA of this SET ? ');
```

```
  WRITE('Give Y or N : ');READLN(EPILOGH);
```

```
  IF (EPILOGH='Y') OR (EPILOGH='y') THEN
```

```
  BEGIN
```

```
    WRITELN('MEAN');
```

```
    FOR J:=1 TO NT DO
```

```
      BEGIN
```

```
        MEAN[J]:=TOTAL[J]/NUMBER;
```

```
        WRITE(MEAN[J]:4:0);
```

```
      END;
```

```
    WRITELN('Write the MEAN DATA of this SET in a DATA FILE ');
```

```
    WRITEDATA(MEAN);
```

```
  END
```

```
  ELSE
```

```
  BEGIN
```

```
    WRITELN('Write the NEW DATA of second trace in a DATA FILE');
```

```
    WRITEDATA(TEMPDATA);
```

```
  END;
```

```
END;
```



```
BEGIN
CLRSCR;
C:=TRUE;
WHILE C DO
BEGIN
CLRSCR;
WRITELN('Do you want to read a new DATA SET?');
WRITE('Give Y or N : '); READLN(CHOISE1);WRITELN;
IF (CHOISE1='Y') OR (CHOISE1='y') THEN
BEGIN
MEANSET;
END
ELSE C:=FALSE;
END;
END.
```



### ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3

Το παρακάτω πρόγραμμα δημιουργήθηκε για την εξομάλυνση των καμπυλών της κατανομής των φορτίων κατά μήκος του άξονα των ινιδίων κολλαγόνου. Για την εξομάλυνση των καμπυλών το πρόγραμμα χρησιμοποιεί τη συνάρτηση cubic spline και περιγράφει τις καμπύλες με 1000 σημεία, ενώ αρχικά περιγράφονταν με 120 σημεία.

```
PROGRAM SMOOTHING;
```

```
USES CRT;
```

```
TYPE RANGE = ARRAY[1..1000] OF REAL;  
STR = STRING[40];
```

```
VAR I, N, IER, J, IPOS, NT           :INTEGER;  
    D, TEMPDATA, F, A, B, C, Q      :RANGE;  
    DATAFILE                        :TEXT;  
    FILENAME                          :STR;  
    X, POS, T, Q1, Q2, Q3, RJ, RN    :REAL;
```

```
BEGIN
```

```
  CLRSCR;
```

```
  WRITELN('GIVE THE FILE NAME ');
```

```
  READLN(FILENAME);
```

```
  ASSIGN(DATAFILE,FILENAME);
```

```
  RESET(DATAFILE);
```

```
  READLN(DATAFILE,X);
```

```
  I:=1;
```

```
  TEMPDATA[I]:=X;
```

```
  WHILE NOT EOF(DATAFILE) DO
```

```
  BEGIN
```

```
    READLN(DATAFILE,X);
```





```

I:=I+1;
TEMPDATA[I]:=X;
END;
CLOSE(DATAFILE);
N:=I;
WRITELN('TEMPDATA');
FOR I:=1 TO N DO WRITE(TEMPDATA[I]:4:0);
WRITELN;
READLN;

```

```

WRITELN('D ');
FOR I:=2 TO N DO
BEGIN
D[I]:=TEMPDATA[I] - TEMPDATA[I-1];
WRITE(D[I]:4:0);
END;
WRITELN;
READLN;

```

```

F[1]:=3*D[2];
FOR I:=2 TO N-1 DO F[I]:=3*(D[I] + D[I+1]);
F[N]:=3*D[N];
WRITE('F ');
FOR I:=1 TO N DO WRITE(F[I]:4:0);
WRITELN;
READLN;

```

```

FOR I:=2 TO N DO A[I]:=1;
FOR I:=1 TO N-1 DO C[I]:=1;
B[1]:=2;
FOR I:=2 TO N-1 DO B[I]:=4;
B[N]:=2;
WRITELN(' A');
FOR I:=2 TO N DO WRITE(A[I]:4:0);
WRITELN;
WRITELN('B ');
FOR I:=1 TO N DO WRITE(B[I]:4:0);
WRITELN;

```



```

WRITELN(' C ');
FOR I:=1 TO N-1 DO WRITE(C[I]:4:0);
WRITELN;
READLN;

IER:=0;
J:=2;
WHILE (IER=0) AND (J<=N) DO
BEGIN
  IF B[J-1]=0.0 THEN IER:=1
  ELSE
    BEGIN
      A[J]:=A[J]/B[J-1];
      B[J]:=B[J] - A[J] * C[J-1];
    END;
  J:=J+1;
END;

IF B[N]=0.0 THEN IER:=1;

IF IER=0.0 THEN
BEGIN
  FOR J:=2 TO N DO
  BEGIN
    F[J]:=F[J] - A[J] * F[J-1];
  END;
  F[N]:=F[N]/B[N];
  FOR J:=N-1 DOWNTO 1 DO F[J]:= (F[J] - C[J] * F[J+1])/B[J];
  WRITELN('F ');
  FOR J:=1 TO N DO WRITE(F[J]:7:3);
  READLN;

  NT:=1000;
  WRITELN('Q');
  Q[1]:=TEMPDATA[1];WRITE(Q[1]:6:2);
  FOR J:=2 TO NT-1 DO
  BEGIN

```



```

RJ:=INT(J-1);
RN:=INT(N-1);
POS:=(RJ * RN)/(NT - 1.0) + 1.0;
IPOS:=TRUNC(POS);
T:=POS - IPOS;
Q1:=T*TEMPDATA[IPOS+1];
Q2:=(1-T)*TEMPDATA[IPOS];

Q3:=T*(1-T)*((F[IPOS]-D[IPOS+1])*(1-T)-(F[IPOS+1]-D[IPOS+1])*T);
Q[J]:=(Q1 + Q2 + Q3);
WRITE(Q[J]:6:2);
END;
Q[NT]:=TEMPDATA[N];WRITE(Q[NT]:6:2);
_READLN;
END;

WRITELN('GIVE THE FILE NAME FOR Q ');
READLN(FILENAME);
ASSIGN(DATAFILE,FILENAME);
REWRITE(DATAFILE);
FOR I:=1 TO NT DO
BEGIN
X:=Q[I];
WRITELN(DATAFILE,X);
END;
CLOSE(DATAFILE);

END.

```



#### ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4

Στο παράρτημα αυτό δίδονται δύο πίνακες μορφομετρικής ανάλυσης ένας από τους μάρτυρες και ένας από τα πειραματόζωα που δέχθηκαν λίθιο. Από τους πίνακες αυτούς φαίνεται ότι δεν υπάρχουν διαφορές στη μέση τιμή και τυπική απόκλιση μεταξύ των πειραματοζώων της ίδιας ομάδας.

Πίνακας 1: Μέση τιμή και τυπική απόκλιση της διαμέτρου των ινιδίων κολλαγόνου για κάθε έναν από τους μάρτυρες που θυσιάστηκαν σε ηλικία 33 εβδομάδων. Στην τελευταία γραμμή του πίνακα φαίνεται η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της διαμέτρου των ινιδίων στην ομάδα αυτή των μαρτύρων. Η τιμή αυτή υπολογίστηκε λαμβάνοντας όλες τις μετρήσεις και από τα 4 πειραματόζωα της ομάδας.

No	Μέση τιμή και τυπική απόκλιση της διαμέτρου των ινιδίων κολλαγόνου (nm)
1	109,8 ± 11,7
2	108,7 ± 10,9
3	108,7 ± 12,1
4	109,2 ± 11,2
Μέση τιμή και τυπική απόκλιση της διαμέτρου από όλα τα πειρ/ζωα	109,1 ± 11,5



Πίνακας 2: Μέση τιμή και τυπική απόκλιση της διαμέτρου των ινιδίων κολλαγόνου για κάθε ένα από τα πειραματόζωα που δέχθηκαν για 1 μήνα καθημερινή δόση με 6 mg/kg Li/Kg και θυσιάστηκαν 1- μέρα μετά την τελευταία ένεση. Στην τελευταία γραμμή του πίνακα φαίνεται η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της διαμέτρου των ινιδίων στην ομάδα αυτή των πειραματοζώων. Η τιμή αυτή υπολογίστηκε λαμβάνοντας όλες τις μετρήσεις και από τα 3 πειραματόζωα της ομάδας.

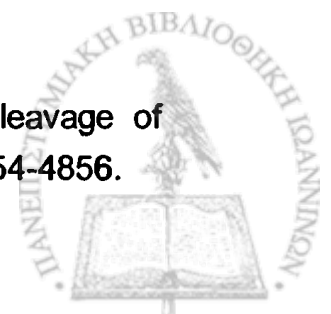
No	Μέση τιμή και τυπική απόκλιση της διαμέτρου των ινιδίων κολλαγόνου (nm)
1	96,7 ± 9,6
2	97,1 ± 11,5
3	96,9 ± 9,0
Μέση τιμή και τυπική απόκλιση της διαμέτρου από όλα τα πειρ/ζωα	96,9 ± 10,1

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

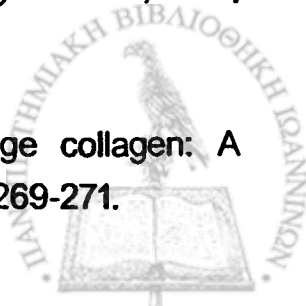
- Aguilar, J. H., Jacobs, H. G., Butler, W. T. and Cunningham, L. W., 1973. The distribution of carbohydrate groups in rat skin collagen. *J. Biol. Chem.*, **248**, 5106-5113.
- Albrecht, G., 1985. Undesirable skin reactions to lithium. *Hautarzt.*, **36**, 77-82.
- Aldoroty, N., and Le Vine, W. R., 1980. Dermatoses and lithium therapy. *Am. J. Psychiatry*, **137**, 870.
- Baastrup, P. C., Poulsen, J. C., Schou, M. and Thomsen, K., 1970. Prophylactic lithium: double blind discontinuation in manic-depressive and recurrent- depressive disorders. *The Lancet*, **15**, 326-330.
- Bahr, G. F., 1954. Osmium tetroxide and ruthenium tetroxide and their reactions with biologically important substances. Electron stains III. *Experimental Cell Research*, **7**, 457-479.
- Bahr, G. F., 1955. Continued studies about the fixation with osmium tetroxide. Electron Stains IV. *Experimental Cell Research*, **9**, 277-285.
- Bakris, G. L., Taylor, M. A., Mulopulos, G. P., and Wawezk, S., 1981. Lithium prophylaxis and the kidney. *J. Affect. Dis.*, **3**, 37-42.
- Baldin, J., Berggren, U., Heijer, A., and Mobacken, H., 1991. Erythema multiforme caused by lithium. *J. Am. Academy Dermatology*, **24**, 1015-1016.
- Balley, A. J., Peach, C. M. and Fowler, L. J., 1970. Chemistry of the collagen cross-links: isolation and characterization of two intermediate intermolecular cross-links in collagen. *Biochem. J.*, **117**, 819-831.
- Bard, J. B. L. and Chapman, J. A., 1968. Polymorphism in collagen fibrils precipitated at low pH. *Nature*, **219**, 1279-1280.
- Bard, J. B. L. and Chapman, J. A., 1973. Diameters of collagen fibrils grown in vitro. *Nature (Lond)*, **246**, 83-84.



- Barnes, M. J., Constable, B. J., Morton, L. F. and Royce P. M., 1974. Age-related variations in hydroxylation of lysine and proline in collagen. *Biochem. J.*, **139**, 461-468.
- Baron, M., Gershon, E. S., Rudy, V., Jonas, W. Z. and Buchsbaum, M., 1975. Lithium carbonate response in depression: prediction by unipolar/bipolar illness, average-evoked response, catechol-o-methyl transferase, and family history. *Archives of General Psychiatry*, **32**, 1107-1111.
- Bianchi, E., Conion, G. and Cifferi, A., 1966. The helix-coil transformation for tropocollagen solutions and its relationship to transformations involving the crystalline form of the protein. *Biopolymers*, **4**, 957-970.
- Birch, N. J. and Hullin, R. P., 1972. The distribution and binding of lithium following its long-term administration. *Life Sci.*, **11**, 1095-1099.
- Birch, N. J., Horsman, A., Hullin, R. P. and Nordin, B. E., 1977. Effects on bone of long-term lithium administration in man and the rat. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **4**, 649P.
- Birnbaum, J., Klandorf, H., Giuliano, A., and Van-Herle, A., 1988. Lithium stimulates the release of human parathyroid hormone in vitro. *J. Clin. Endocrinology and Metabolism*, **66**, 1187-1191.
- Bond, P. A., Brooks, B. A. and Judd, A., 1975. The distribution of lithium, sodium and magnesium in rat brain and plasma after various periods of administration of lithium in the diet. *Br. J. Pharmacol.*, **63**, 235-243.
- Bornstein, P. and Piez, K., 1966. The nature of the intramolecular cross-links in collagen. The separation and characterization of peptides from the cross-link region of rat skin collagen. *Biochemistry*, **5**, 3460-3473.
- Bornstein, P., 1969. The nature of a hydroxylamine-sensitive bond in collagen. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **36**, 957-964.
- Bornstein, P., and Balian, G., 1970. The specific nonenzymatic cleavage of bovine ribonuclease with hydroxylamine. *J. Biol. Chem.*, **245**, 4854-4856.



- Bornstein, P., 1970(a). Structure of  $\alpha_1$ -CB<sub>8</sub>, a large cyanogen bromide produced fragment from the  $\alpha_1$  chain of rat collagen: the nature of hydroxylamine-sensitive bond and composition of tryptic peptides. *Biochemistry*, **9**, 2408-2421.
- Bornstein, P., 1970(b). The cross-linking of collagen and elastin and its inhibition in osteolathyrism: is there a relation to the aging process? *Amer. J. Med.*, **49**, 429-435.
- Bornstein, P., 1974. The biosynthesis of collagen. *Ann. Rev. Biochem.*, **43**, 567-603.
- Bornstein, P. and Traub, W., 1979. The chemistry and biology of collagen. In: *The Proteins*, Newrath H. and Hill P.L. (eds), Vol. 4, Acad. Press, New York, p. 411.
- Bornstein P., and Byers, P. H., 1980. Collagen metabolism. The Upjohn Co., Washington.
- Bowden, J. K. and Chapman, J. A., 1972. The precipitation of segmented-long-spacing collagen by inorganic triphosphate and perdisulphate ions. *Conn. Tiss. Res.*, **1**, 109-208.
- Bowes, J. H., Cater, C. W. and Ellis, M. J., 1968. Determination of formaldehyde and glutaraldehyde bound to collagen by carbon-14 assay. *J. Am. Leath. Chem. Assoc.*, **60**, 275-285.
- Bowes, J. H. and Cater, C. W., 1968. The interaction of aldehydes with collagen. *Biochim. biophys. Acta*, **168**, 341-352.
- Brenner, S. and Horne, R. W., 1959. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim. biophys. Acta*, **34**, 103-110.
- Bruns, R. R., Trelstad, R. L. and Gross, J., 1973. Cartilage collagen: A staggered substructure in reconstituted fibrils. *Science*, **181**, 269-271.





- Bullock, G. R., 1984. The current status of fixation for electron microscopy: a review. *J. Microsc.*, **133**, 1-15.
- Bunney, W. E. jr., Goodwin, F. K., Davis, N. M., and Fawcett, J. A., 1968. A behavioral-biochemical study of lithium treatment. *Am. J. Psychiat.*, **125**, 499.
- Butler, W. T., 1969. The identity of a hydroxylamine-sensitive bond in the  $\alpha 1$  chain of rat skin collagen. *J. Biol. Chem.*, **244**, 3415-3417.
- Byers, P. H., Click, E. M., Harper, E. and Bornstein, P., 1975. Interchain disulfide bonds in procollagen are located in a large COOH-terminal domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.)*, **72**, 3009.
- Byers, P. H., Holbrook, K. A., Chandler, J. W. Bornstein, P. and Hall, J. G., 1978. Electron microscopy as an aid to diagnosis of disorders of the extracellular matrix: a new type of spondyloepiphyseal dysplasia. *Birth Defects: Original Article Series*, **14**, 221-232.
- Byers, P. H., Holbrook, K. A., McGillivray, B., MacLeod, P. M. and Lowry, R. B., 1979. Clinical and ultrastructural heterogeneity of type IV Ehlers-Danlos syndrome. *Hum. Genet.*, **47**, 141-150.
- Cade, J. F. J., 1949. Lithium salts in the treatment of psychotic excitement. *Med. J. Aust.*, **36**, 349-352.
- Callaway, C. L., Hendrie, H. C., and Luby, E. D., 1968. Cutaneous conditions observed in patients during treatment with lithium. *Am. J. Psychiatry*, **124**, 1124-1125.
- Cassel, J. M., 1966. Collagen aggregation phenomena. *Biopolymers*, **4**, 989-998.
- Carter, T. N., 1972. The relationship of lithium carbonate to proriasis. *Psychocomatics*, **13**, 325-327.
- Chapman, J. A., 1974. The staining pattern of collagen fibrils. An analysis of electron micrographs. *Connect. Tiss. Res.*, **2**, 137-150.



Chapman, J. A., and Hardcastle, R. A., 1974. The staining pattern of collagen fibrils. II. A comparison with patterns computer-generated from the amino acid sequence. *Connect. Tiss. Res.*, **2**, 151-159.

Chapman, J. A., Holmes, D. F., Meek, K. M. and Rattew, C. J., 1981. Electron-optical studies of collagen fibril assembly. In: 7th Aharon Katzir-Katchalsky Conference of structural aspects of recognition and assembly in biological macromolecules, Vol. 1, Nof. Ginossar, p. 387.

Chapman, J. A., 1984. Molecular organization in the collagen fibril. In : *Connective Tissue Matrix*, Hukins, D.W.L. (ed.), Macmillan, London, 89-132.

Chapman, J. A., Tzaphlidou, M., Meek, K. M. and Kadler, K. E., 1990. The collagen fibril-Amodel system for studying the staining and fixation of a protein. *Electron Microsc. Rev.*, **3**, 143-182.

Cooper, A., 1970. Thermodynamic studies of the assembly in vitro of native collagen fibrils. *Biochem. J.*, **118**, 355-365.

Coppen, A., Bishop, M. E., Bailey, J. E., Cattell, W. R., and Price, R. G., 1980. Renal function in lithium and non - lithium - treated patients with affective disorders. *Acta Psychiatr. Scand.*, **62**, 343-355.

Cox, R. W., Grant, R. A. and Horne, R. W., 1967. The structure and assembly of collagen fibrils. I. Native-collagen fibrils and their formation from tropocollagen. *Jl R. microscop. Soc.*, **87**, 123-142.

Daisley, H. and Hutchinson, G., 1992. Lithium therapy in alcoholism. *Lithium*, **3**, 239-243.

Davis, J. M. and Farm, J. E., 1971. Lithium. *Annual Review of Pharmacology*, **11**, 285-302.

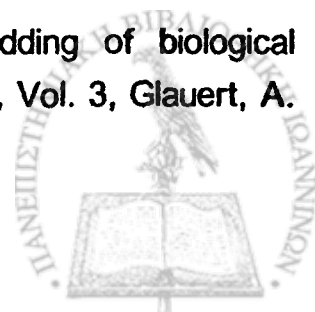
Deandrea, D., Walker, N., Mehlmauer, M. and White, K., 1982. Dermatological reactions to lithium: a critical review of the literature. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, **2**, 199-204.



- Doyle, B. B., Hulmes, D. J. S., Miller, A., Parry, D. A. D., Piez, K. A. and Woodhead-Galloway, J., 1974. A D-periodic narrow filament in collagen. *Proc. Roy. Soc. Lond. B.*, **186**, 67-74.
- Ebadi, M. S., Simmons, V. J., Hendricksons, M. J. and Lacy, P. S., 1974. Pharmacokinetics of lithium and its regional distribution in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.*, **27**, 324-329.
- Edelfors, S., 1975. Distribution of sodium, potassium and lithium in the brain of lithium-treated rats. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **37**, 387-396.
- English, J., Evan, A., Houghton, D. C. and Bennett, W. M., 1987. Cyclosporine-induced acute renal dysfunction in the rat. Evidence of arteriolar vasoconstriction with preservation of tubular function. *Transplantation*, **44**, 135-141.
- Epstein, E. H., Jr., 1974.  $[\alpha_1(\text{III})]_3$  Human skin collagen: release by pepsin digestion and preponderance in fetal life. *J. Biol. Chem.*, **249**, 3225-3231.
- Fairweather, R. B., Tanzer, M. L. and Gallop, P. M., 1972. Aldolhistidine, a new trifunctional collagen crosslink. *Bioch. Biophys. Res. Comm.*, **48**, 1311.
- Fessler, L. I., Morris, N. P. and Fessler, J. H., 1975. Procollagen- biological scission of amino and carboxyl extension peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.)*, **72**, 4905.
- Fessler, J. H. and Fessler, L. I., 1978. Biosynthesis of procollagen. *Annu. Rev. Biochem.*, **47**, 129-162.
- Fessler, L. I., Timpl, R. and Fessler, J. H., 1981. Assembly and processing of procollagen type III in chick embryo blood vessels. *J. Biol. Chem.*, **256**, 2531-2537.
- Fietzek, P. P. and Kuhn, K., 1976. The primary structure of collagen. *Int. Rev. Conn. Tiss. Res.*, **7**, 1-60.



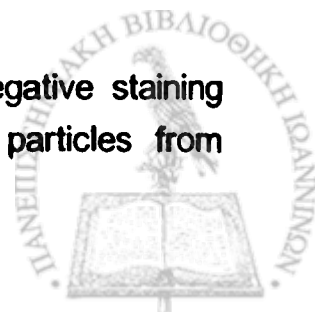
- Fieve, R. R., Platman, S. R., and Plutchik, R. R., 1968. The use of lithium in affective disorder. I. Acute endogenous depression. *Am. J. Psychiat.*, **125**, 487-491.
- Fleischmajer, R., Timpl, R., Tuderman, L., Raisher, L., Wiestner, M., Perlish, J. S. and Graves, P. N., 1981. Ultrastructural identification of extension aminopeptides of type I and III collagens in human skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 7360-7364.
- Foster, J.R., 1992. Use of lithium in elderly psychiatric patients: a review of the literature. *Lithium*, **3**, 77-93.
- Frazer, A., Secunda, S. K. and Mendels, J., 1972. A method for the determination of sodium, potassium, magnesium and lithium concentrations in erythrocytes. *Clin. Chim. Acta*, **36**, 499-509.
- Frenk, E., 1984. Inflammatory, verrucous, circumscribed hyperplasia of the skin during long-term lithium therapy. *Z-Hautkr.*, **59**, 97-100.
- Fung, B. M. and Wei, S. C., 1973. The effect of alcali and alkaline earth salts on the structure of hydrated collagen fibers as studied by deuterium NMR. *Biopolymers*, **12**, 1053-1062.
- Gallop, P. M., Blumenfeld, O. and Seifter, S., 1973. Structure and metabolism of connective tissue proteins. *Annu. Rev. Bioch.*, **41**, 617-672.
- Gay, S., and Miller, E. J., 1978. Collagen in the physiology and pathology of connective tissue. Gustav Fischer, Verlag, Stuggard, New York.
- Glaros, D., LoMonte, A. F., Ellis, K. J., Yasumura, S., Stoenner, R. W., and Cohn, S. H., 1986. *In vivo* measurement of lithium in the body by a neutron activation analysis technique. *Med. Phys.*, **13**, 45-49.
- Glauert, A. M., 1974. Fixation, dehydration and embedding of biological specimens. In: *Practical Methods in Electron Microscopy*, Vol. 3, Glauert, A. M. (ed.), North Holland, Amsterdam, 1-207.



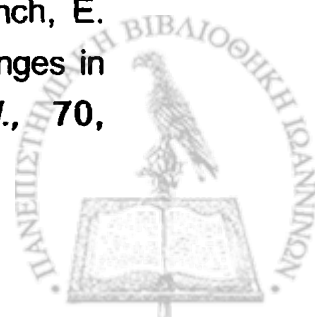
- Goodwin, F. K., Murphy, D. L., Dunner, D. L. and Bunney, W. E., 1972. Lithium response in unipolar versus bipolar depression. *American Journal of Psychiatry*, **129**, 44-47.
- Grant, M. E. and Prockop, D. J., 1972. The biosynthesis of collagen. *New Engl. J. Med.*, **286**, 194-195.
- Gross, E., and Witkop, B., 1961. Selective cleavage of methionyl peptide bonds in ribonuclease with cyanogen bromide. *J. Amer. Chem. Soc.*, **83**, 1510-1516.
- Groth, U., Prellwitz, W. and Jahnchen, E., 1974. Estimation of pharmacokinetic parameters of lithium from saliva and urine. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **16**, 490-498.
- Gupta, M. A., Gupta, A. K. and Haberman, H. F., 1987. Psoriasis and psychiatry: an update. *General Hospital Psychiatry*, **9**, 157-166.
- Gustavson, K. H., 1956. *The Chemistry and reactivity of collagen*, Chap. 9, Academic Press, New York.
- Habeeb, A. F. S. A. and Hiramoto, R., 1968. Reaction of proteins with glutaraldehyde. *Archs Biochem. Biophys.*, **126**, 16-26.
- Hake, T., 1965. Studies on the reactions of osmium tetroxide and potassium permanganate with amino acids, peptides, and proteins. *Laboratory Investigation*, **14**, 1208-1212.
- Hartigan, G. P., 1963. The use of lithium salts in affective disorders. *Brit. J. Psychiat.*, **109**, 810-814.
- Haschemeyer, R. and Myers, R., 1972. *Negative staining. In: Principles and Techniques of Electron Microscopy: Biological Applications*, Hayat, M. (ed.), Van Nostrand Reinhold, New York, Vol. 2, 101-147.
- Hayat, M. A., 1981. *Fixation for Electron Microscopy*, Academic Press, New York.



- Heurteaux, C., Baumann, N., Lachapelle, F., Wissocq, J. C., and Thellier, M., 1986. Lithium distribution in the brain of normal mice and of "Quaking" dysmyelinating mutants. *J. Neurochem.*, **46**, 1317-1321.
- Hitch, J. M., 1967. Acneiform eruptions induced by drugs and chemicals. *JAMA*, **200**, 879-880.
- Hodge, A. J. and Petruska, 1963. Recent studies with the electron microscope on ordered aggregates of the tropocollagen macromolecule. In: *Aspects of Protein Structure*, Ramachandram, G.N. (ed.), Academic Press, New York, pp. 289-334.
- Hodge, A. J. and Schmitt, F. O., 1960. The charge profile of the tropocollagen macromolecule and the packing arrangement in native-type collagen fibrils. *Proc. Natn. Acad. Sci., U.S.A.*, **46**, 186-197.
- Hofman, H., Fietzek, P. P. and Kuhn, K., 1978. The role of polar and hydrophobic interactions for the molecular packing of type I collagen: a three-dimensional evaluation of the amino acid sequence. *J. Mol. Biol.*, **125**, 137-165.
- Holak, H. M. and Raisz, L. G., 1979. Effect of lithium on bone metabolism in organ culture. *Endocrinology*, **104**, 908-911.
- Holbrook, K. A. and Byers, P. H., 1978. Ultrastructural characterization of several varieties of the Ehlers-Danlos syndrome. *Clin. Res.*, **26**, 570A.
- Holmes, D. F. and Chapman, J. A., 1979. Axial mass distributions of collagen fibrils grown in vitro. Results for the end regions of early fibrils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **87**, 993-999.
- Hopwood, D., 1972. Theoretical and practical aspects of glutaraldehyde fixation. *Histochem. J.*, **4**, 267-303.
- Horne, R. W. and Whittaker, V. P., 1962. The use of the negative staining method for the electron-microscopic study of subcellular particles from animal tissues. *Z. Zellforsch.*, **58**, 1-16.



- Hosemann, R., Dreissig, W. and Nemetschek, T., 1974. Schachtelalmstructure of the octafibrils in collagen. *J. Mol. Biol.*, **83**, 275-280.
- Housley, T., Tanzer, M. L., Henson, E. and Gallop, P. M., 1975. Collagen crosslinking: isolation of hydroxyaldohistidine, a naturally-occurring crosslink. *Bioch. Bioph. Res. Comm.*, **67**, 824-830.
- Hoxtell, E., and Dahl, M. V., 1975. Xerosis from lithium carbonate. *Arch. dermatol.*, **111**, 1073-1074.
- Hukins, D. W. L., 1984. *Connective tissue matrix*. Topics in molecular and structural biology. MacMillan Press. London and Basingstoke. pp 18-27.
- Hulmes, D. J. S., Miller, A., Parry, D. A. D., Piez, K. A. and Woodhead-Galloway, J., 1973. Analysis of the primary structure of collagen for the origins of molecular packing. *J. molec. Biol.*, **79**, 137-148.
- Huxley, H. E. and Zubay, G., 1960. Electron microscope observations on the structure of microsomal particles from *E. coli*. *J. molec. Biol.*, **2**, 10-18.
- Jarret, D. B., Serry, J., and Burrows, G. D., 1975. Lithium - induced tremor. *Med. J. Aust.*, **1**, 21.
- Jefferson, J. W., 1979. Lithium carbonate - induced hypothyroidism - its many faces. *J. Am. Med. Assoc.*, **242**, 271-272
- Johnson, G., 1974. Antidepressant effect of lithium. *Comprehensive Psychiatry*, **15**, 43-47.
- Jones, C. P., Cummings, C., Ball, J. and Beighton, P., 1984. Collagen defect of bone in osteogenesis imperfecta (type I). An electron microscopic study. *Clin. Orthop.*, **183**, 208-214.
- Jorgensen, F., Larsen, S., Spanager, B., Clansen, E., Tango, M., Brinch, E. and Brun, C., 1984. Kidney function and quantitative histological changes in patients on long-term lithium therapy. *Acta Psychiatr. Scand.*, **70**, 455-462.



- Kane, J. M., Quitkin, F. M., Rifkin, A., Ramos-Lorenzi, G. R., Nayak, D. D., Howard, A., 1982. Lithium carbonate and imipramine in the prophylaxis of unipolar and bipolar II illness. A prospective placebo-controlled comparison. *Archives of General Psychiatry*, 39, 1065-1069.
- Karnoil, I. G., Dalton, J., and Lader, M. H., 1978. Acute and chronic effects of lithium chloride on physiological and psychological measures in normals. *Psychopharmacology*, 57, 289-294.
- Khan, M. C., 1981. Lithium carbonate in the treatment of acute depressive illness. *Bibliotheca Psychiatrica*, 161, 244-248.
- Kohn, K. and Zimmer, E., 1961. Eigenschaften des Tropokollagen-Moleküls und deren Bedeutung für die Fibrillenbildung. *Z. Naturf.*, 16B, 648-658.
- Korn, A. H., Fearheller, S. H. and Filachione, E. M., 1972. Glutaraldehyde: nature of the reagent. *J. molec. Biol.*, 65, 525-529.
- Κουνάδη Ε., Τζαφλίδου Μ. και Γλάρος Δ., 1993. Επιδράσεις του λιθίου στη δομή των ινιδίων κολλαγόνου δέρματος ποντικών, 15<sup>0</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρίας Βιολογικών Επιστημών, Απρίλιος 1993, 76-78.
- Κουνάδη Ε., Τζαφλίδου Μ. και Γλάρος Δ., 1993. Μελέτη υποδείγματος θετικής χρώσης ινιδίων κολλαγόνου δέρματος ποντικών που δέχθηκαν αγωγή με λίθιο, 15<sup>0</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρίας Βιολογικών Επιστημών, Απρίλιος 1993, 79-80.
- Κουνάδη Ε., Τζαφλίδου Μ. και Γλάρος Δ., 1994. Μελέτη της δομής των ινιδίων κολλαγόνου δέρματος ποντικών μετά από αγωγή με λίθιο, 20<sup>0</sup> Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Μαΐος 1994, 41.
- Κουνάδη Ε., Τζαφλίδου Μ. και Γλάρος Δ., 1994. Επιδράσεις υψηλών δόσεων λιθίου στο κολλαγόνο δέρματος ποντικών, 16<sup>0</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρίας Βιολογικών Επιστημών, Μαΐος 1994, 5.34-5.35.





- Kounadi, E., Tzaphlidou, M. and Glaros, D., 1994. An electron microscopic study of collagen fibril structure after lithium treatment-I. The effect of different lithium doses on mouse skin collagen. *Micron*, 25, 233-240.
- Kropf, D., Muller - Verlinghausen, B., 1979. Changes in learning memory and mood during lithium treatment. *Acta Psychiatt. Scand.*, 59, 97-124.
- Kresyun, V. I., Aryaev, V. L. and Kostev, F. I., 1991. Chronic alcohol dependence: efficiency of lithium salts therapy. *Lithium*, 2, 163-166.
- Kuhn, K. and Zimmer, E., 1961. Eigenschaften des Tropocollagen-Molekuls und deren Bedeutung fur die Fibrillenbildung. *Z. Naturforsch.*, 16B, 648-658.
- Kuhnley, E. J., and Granoff, A. L., 1979. Exfoliative dermatitis during lithium treatment. *Am. J. Psychiatry*, 136, 1340-1341.
- Kurtin, S. B., 1973. Lithium carbonate dermatitis. *JAMA*, 223, 802.
- Kusumi, Y. A., 1971. A cutaneous side - effect of lithium: report of two cases. *Dis. Nerv. Syst.*, 32, 853-854.
- Lambert, D., Beer, F., Gisselman, R., Bouilly, D. and Chapuis, J. L., 1982. Cutaneous lesions due to lithium therapy. *Ann. Dermatol. Venereol.*, 109, 19-24.
- Lapiere, C. M. and Nusgens, B. V., 1974. Polymerization of procollagen in vitro. *Biochim. Biophys. Acta*, 342, 237-246.
- Lapiere, C. M., Nusgens, B. V. and Pierard, G. E., 1977. Interaction between collagen type I and type III in conditioning bundles organization. *Connect. Tiss. Res.*, 5, 21-29.
- Lazarus, G., and Gilgor, R., 1979. Psoriasis, polymorphonuclear leukocytes and lithium carbonate. *Arch. Dermatol.*, 115, 1183-1184.
- Leibovich, S. H. and Weiss, J. B., 1970. Electron microscope studies of the effects of endo- and exopeptidase digestion on tropocollagen: a novel



concept of the role of terminal regions in fibrillogenesis. *Bioch. Bioph. Acta*, **214**, 445-454.

Leontiou, I., Matthopoulos, D. P., Tzaphlidou, M. and Glaros, D., 1993. The effect of gamma irradiation on collagen fibril structure. *Micron*, **24**, 13-16.

Leung, M. K. K., Fessler, L. I., Greenberg, D. B. and Fessler, J. H., 1979. Separate amino and carboxyl procollagen peptidases in chick embryo tendon. *J. Biol. Chem.*, **254**, 224-232.

Lewis, J. L. and Winokur, G., 1982. The introduction of mania. A natural history study with controls. *Archives of General Psychiatry*, **38**, 303-330.

Linsenmayer, T. F., Fitch, J. M., Schmid, T. M., Zak, N. B., Gibney, E., Sanderson, R. D., and Mayne, R., 1983. Monoclonal antibodies against chicken type V collagen: production, specificity, and use for immunocytochemical localization in embryonic cornea and other organs. *J. Cell. Biol.*, **96**, 124-132.

Lippmann, S., Regan, W. and Manshadi, M., 1981. Plasma lithium stability and a comparison of flame photometry and atomic absorption spectrophotometry analysis. *Am. J. Psychiatry*, **138**, 1375-1377.

Liu, B., Harrell, R., Davis, R. H., Dresdem, M. H. and Spira, M., 1989. The effect of gamma irradiation on injectable human amnion collagen. *J. Biom. Mat. Res.*, **23**, 833-844.

Lowe, N. J. and Ridgway, H. B., 1978. Generalized pustular psoriasis precipitated by lithium carbonate. *Arch. Dermatol.*, **114**, 1788-1789.

Lydiard, R. B. and Gelenberg, A. J., 1982. Hazards and adverse effects of lithium. *Ann. Rev. Med.*, **33**, 327-344.

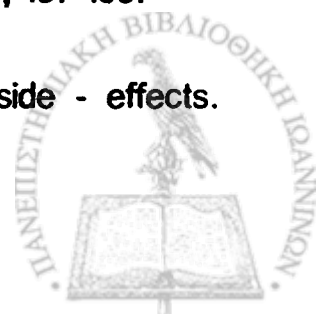
Luescher, M., Ruegg, M. and Schindler, P., 1974. Effect of hydration upon the thermal stability of tropocollagen and its dependence on the presence of neutral salts. *Biopolymers*, **13**, 2489-2503.



- Maggs, R., 1963. Treatment of manic illness with lithium carbonate. *Br. J. Psychiat.*, 109, 56-65.
- Man, P. L., 1979. Correlation of saliva and serum lithium. *Psychosomatics*, 20, 758-759.
- Mathews, M. B. and Decker, L., 1968. The effect of acid mucopolysaccharides and acid mucopolysaccharide-proteins on fibril formation from collagen solutions. *Bioch. J.*, 109, 517-526.
- McAuliffe, W. G. and Olesen, O. V., 1983. Effects of lithium on the structure of the rat kidney. *Nephron*, 34, 114-124.
- Meek, K. M., Chapman, J. A., and Hardcastle, R. A., 1979. The staining pattern of collagen fibrils. Improved correlation with sequence data. *J. Biol. Chem.*, 254, 10710-10714.
- Meinhold, J. M., West, D., Gurwich, E., Spunt, A., and Koya, D., 1980. Cutaneous reaction to lithium carbonate: a case report. *J. Clin. Psychiatry*, 41, 395-396.
- Mellerup, E. T. and Plenge, P., 1990. The side effects of lithium. *Biol. Psychiatry*, 28, 464-466.
- Mendels, J., Secunda, S. K., and Dyson, W. L., 1972. A controlled study of the antidepressant effects of lithium carbonate. *Arch. Gen. Psychiat.*, 26, 154-157.
- Mendels, J., Ramsey, T. A., Dyson, W. L. and Frazer, A., 1979. Lithium as an antidepressant. *Arch. Gen. Psychiatry*, 36, 845-846.
- Miller, A. and Parry, D. A. D., 1973. Structure and packing of microfibrils in collagen. *J. Mol. Biol.*, 75, 441-447.
- Miller, A., 1982. Molecular packing in collagen fibrils. *Trends biochem. Sci.*, 7, 13-18.



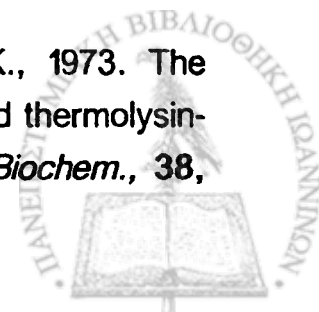
- Miyahara, M., Hayashi, K., Berger, J., Tanzawa, K., Njieha, F. K., Trelstad, R. L. and Prockop, D. J., 1984. Formation of collagen fibrils by enzymic cleavage of precursors of type I collagen in vitro. *J. Biol. Chem.*, **259**, 9891-9898.
- Muniz, C. E., Berghman, D. H., 1978. Contact stomatitis and lithium carbonate tables. *J. Am. Med. Assoc.*, **239**, 2759.
- Nagi, A. H., Rashid, A. and Naveed, I. A., 1982. Lithium-induced nephropathy in rat. Light and electron microscopic studies. *Nephron*, **30**, 77-81.
- Nelson, S. C., Bensch, K. G., Herman, M. M. and Barhas, J. D., 1972. A method for determining the distribution of lithium in whole brain sections by use of  $^6\text{Li}(n,\alpha)$   $^3\text{H}$  reactions and radiographic dielectric track registration techniques. *J. Histochem. Cytochem.*, **21**, 241-252.
- Nelson, S. C., Herman, M. M., Bensch, K. G., and Barchas, J. D., 1979. Localization and quantitation of lithium in rat tissue following intraperitoneal injections of lithium chloride. II. Brain. *J. Pharmac. Experimen. Therap.*, **212**, 11-15.
- Neu, C., DiMascio, A., Williams, D., 1975. Saliva lithium levels: a clinical applications. *Am. J. Psychiatry*, **132**, 66-68.
- Neu, C., Manschreck, T. C., and Flocks, J. M., 1979. Renal damage associated with long - term use of lithium carbonate. *J. Clin. Psychiatry*, **40**, 460-463.
- Noyes, R., Jr, 1969. Lithium carbonate. *Diseases of the Nervous System*, **30**, 318-321.
- Noyes, R., Jr., Dempsey, G. M., Blum, A. and Cavanaugh, G. L., 1974. Lithium treatment of depression. *Comprehensive Psychiatry*, **15**, 187-193.
- O' Connell, R. A., 1971. Lithium sites of action. Clues from side - effects. *Compr. Psychiatry*, **12**, 224-229.
- Okrasinski, H. 1977. Lithium acne. *Dermatologica*, **154**, 251-253.



- Ottosen, P. D., Sigh, B., Kristensen, J., Olsen, S., and Christensen, S., 1984. Lithium induced interstitial nephropathy associated with chronic renal failure. *Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. A*, **92**, 447-454.
- Ottosen, P. D., Nyengard, J. R., Jacobsen, N. O. and Christensen, S., 1987. A morphometric and ultrastructural study of lithium-induced changes in the medullary collecting ducts of the rat kidney. *Cell Tissue Res.*, **249**, 311-315.
- Paragas, M. G., 1984. Lithium adverse reactions in psychiatric patients. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **21**, 65-69.
- Parry, D. A. D., Flint, M. H., Gillard, G. C., and Craig, A. S., 1984. A role for glycosaminoglycans in the development of collagen fibrils. *FEBS Lett.*, **149**, 1-7.
- Parry, D. A. D., Craig, A. S., 1984. Growth and development of collagen fibrils in connective tissue. In: *Ultrastructure of the Connective Tissue Matrix*. Ruggeri A., Motta PM(eds), The Hague, Martinus Nijhoff, pp 34-36.
- Pickett, E. E. and Hawkins, J. L., 1981. Determination of lithium in small-animal tissues at physiological levels by flame emission photometry. *Analytical Biochemistry*, **112**, 213-218.
- Piez, K. A., 1967. Soluble collagen and the components resulting from its denaturation. In: *treatise on collagen*. Rammachandran, G. N. ed., Vol. 1, Academic Press, New York, p. 207.
- Poschl, A. and von der Mark, K., 1980. Synthesis of type V collagen by chick cornea fibroblasts in vivo and in vitro. *FEBS Lett.*, **115**, 100-104.
- Posey, R. E., 1972. Lithium carbonate dermatitis. *JAMA*, **221**, 1517.
- Prien, R. F., Klett, J. and Caffey, E. M., 1973. Lithium carbonate and imipramine in prevention of affective episodes. *Archives of General Psychiatry*, **29**, 420-425.



- Prien, R. F., Kupfer, D. J., Mansky, P. A., Small, J. G., Tuason, V. B., Voss, C. B., Johnson, W. E., 1984. Drug therapy in the prevention of recurrences in unipolar and bipolar affective disorders. *Archives of General Psychiatry*, **41**, 1096-1104.
- Prockop, D. J., Berg, R. A., Kivirikko, K. I. and Vitto, J., 1976. Intracellular steps in the biosynthesis of collagen. In: *Biochemistry of collagen*, Ramachandran, G.N. and Reddi, A.H. (eds), Plenum Press, New York, pp. 163-274.
- Prockop, D. J., 1980. Present and future research on collagen and genes for collagen. *Med. Biol.*, **58**, 289-297.
- Ralphs, J. R., Stamp, T. C., Dopping-Hepenstal, P. J. and Ali, S. Y., 1989. Ultrastructural features of the osteoid of patients with fibrogenesis imperfecta ossium. *Bone*, **10**, 243-249.
- Ramachandran, G. N. and Kartha, G., 1955. Structure of collagen. *Nature*, **176**, 593-595.
- Ramachandran, G. N. and Chandrasekharan, R., 1968. Interchain hydrogen bonds via bound water molecules in collagen triple helix. *Biopolymers*, **6**, 1649-1658.
- Ramachandran, G. N., Ramakrishnam, C., 1976. Molecular structure. In: *Biochemistry of collagen*. Ramachandran, G. N., Reddi, A. H., (eds), New York and London, Plenum Press, pp 45-84.
- Reiffers, J., and Dick, P., 1977. Cutaneous side - effects of treatment with lithium. *Dermatologica*, **155**, 155-163.
- Reifman, A. and Wyatt, R.J., 1980. Lithium: a break in the rising cost of mental illness. *Arch. Gen. Psychiatry*, **37**, 385-88.
- Rexrodt, F. W., Hopper, K. E., Fietzek, P. P. and Kuhn, K., 1973. The covalent structure of collagen. 1. The chymotrypsin, trypsin and thermolysin-derived peptides of  $\alpha 1$ -CB7 from calf-skin collagen. *Eur. J. Biochem.*, **38**, 384-395.



- Richards, F. M. and Knowles, J. R., 1968. Glutaraldehyde as a protein cross-linking reagent. *J. molec. Biol.*, **37**, 231-233.
- Rick, A. and Crick, F. H. C., 1955. Structure of collagen. *Nature*, **176**, 915-916.
- Rifkin, A., Kurtin, S. B., and Quitkin, F., 1973. Lithium induced folliculitis. *Am. J. Psychiatry*, **130**, 1018-1019.
- Ruiz - Maldonado, R., Francisco, C. D., and Tamayo, L., 1973. Lithium dermatitis. *JAMA*, **224**, 1534.
- Sabatini, D. D., Bensch, K. and Barnett, R. J., 1963. Cytochemistry and electron microscopy: the preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J. Cell. Biol.*, **17**, 19-58.
- Sarantidis, D., and Waters, B., 1983. A review and controlled study of cutaneous conditions associated with lithium carbonate. *Br. J. Psychiatry*, **143**, 42-50.
- Sasaki, T., Saito, S., Aihara, M., Ohsawa, J.m and Ikezawa, Z., 1989. Exacerbation of psoriasis during lithium treatment. *Journal of dermatology*, **16**, 59-63.
- Sautter, F., McDermott, B. and O'Neill, P., 1992. Family studies of lithium - responsive schizophrenia: a review. *Lithium*, **3**, 169-173.
- Schou, M., Juel - Nielsen, N., Stromgren, E., and Voldby, H., 1954. The treatment of manic phychoses by the administration of lithium salts. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, **17**, 250-260.
- Schou, M., 1958. Lithium studies. 3. Distribution between Serum and tissues. *Acta phamracol. et toxicol.*, **15**, 115-124.
- Schou, M., and Baastrup, P. C., 1967. Lithium treatment of manic depressive disorder. *Journal of the American Medical Association*, **201**, 696-698.



Schou, M., and Amdisen, A., 1973(a). Lithium and pregnancy. III. Lithium ingestion by children breast-fed by women on lithium treatment. *Br. J. Med.*, 2, 138.

Schou, M., Amdisen, A., and Steenstrup, O. R., 1973(b). Lithium and pregnancy. II. Hazards to women given lithium during pregnancy and delivery. *Br. J. Med.*, 2, 137-138.

Schou, M., 1986. Lithium treatment: a refresher course. *Br. J. Psychiatry*, 149, 541-547.

Scott, J. E., 1980. Collagen - proteoglycan interactions. Localization of proteoglycans in tendon by electron microscopy. *Biochem. J.*, 187, 887-891.

Scott, J. E. and Orford, C. R., 1981. Dermatan sulphate-rich proteoglycan associates with rat tail tendon collagen at the d band in the gap region. *Biochem. J.*, 197, 213-216.

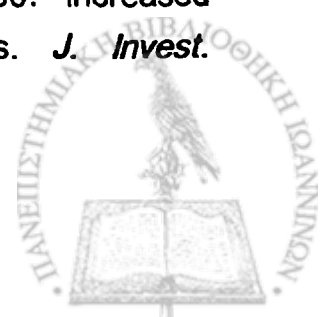
Scott, J. E., 1984. The periphery of developing collagen fibril. Quantitative relationships with dermatan sulphate and other surface-associated species. *Biochem. J.*, 218, 229-233.

Scott, J. E. and Haigh, M., 1985a. Proteoglycan - type I collagen fibril interactions in bone and non - calcifying connective tissues. *Biosci. Rep.*, 5, 71-81.

Scott, J. E. and Haigh, M., 1985b. Small-proteoglycan: collagen interactions: Keratan sulphate proteoglycan associates with rabbit corneal collagen fibrils at the "a" and "c" bands. *Biosci. Rep.*, 5, 765-774.

Scott, J. E., 1988. Proteoglycan-fibrillar collagen interactions. *Biochem. J.*, 252, 313-323.

Sedgwick, J. B., Bergstresser, P. R. and Hurd, E. R., 1980. Increased granulocyte adherence in psoriasis and psoriatic arthritis. *J. Invest. Dermatol.*, 74, 81-84.





- Silvestri, A., Santonastaso, P., and Paggiarin, D., 1988. Alopecia areata during lithium therapy. A case report. *General Hospital Psychiatry*, 10, 46-48.
- Sims, A., White, A., C., Garvey, K., 1978. Problems associated with the analysis and interpretation of saliva lithium. *Br. J. Psychiatry*, 132, 152-154.
- Singer, I., 1981. Lithium and the kidney. *Kidney Int.*, 19, 374-387.
- Skott, A., Magnusson, B., Mobacken, H., and Starmark, J., 1977. Lithium and psoriasis. *Br. J. Psychiatry*, 131, 223.
- Skerritt, P. W., 1987. Psoriasis arthritis during lithium therapy. *Australian and New Zealand Journal of Psychiatry*, 21, 601-604.
- Skoöven, I. and Thormann, J., 1979. Lithium compound treatment and psoriasis. *Arch. Dermatol.*, 115, 1185-1187.
- Smith, J. W., 1968. Molecular pattern in native collagen. *Nature*, 219, 157-158.
- Souza, F. G. M. and Goodwin, G. M., 1991. Lithium treatment and prophylaxis in unipolar depression: a meta-analysis. *Br. J. Psychiatry*, 158, 666-675.
- Srebrnik, A., Bar-Nathan, E. A., Ilie, B., Peyser, R. and Brenner, S., 1991. Vaginal ulcerations due to lithium carbonate therapy. *Cutis*, 48, 65-66.
- Stamm, T. and Lubach, D., 1981. Undesirable side effects on the skin caused by lithium therapy: case report and references. *Psychiatr. Prax.*, 8, 152-154.
- Stokes, P. E., Shamoian, C. A., and Patton, M. J., 1971. Efficacy of lithium as acute treatment of manic depressive illness. *Lancet*, i, 1319-1325.
- Thellier, M., Stelz, T., and Wissocq, J. C., 1976. Detection of stable isotopes of lithium or boron with the help of A(n, $\alpha$ ) nuclear reaction. Application to the use of Li as a tracer for unidirectional flux measurements and to the microlocalization of lithium in animal histologic preparations. *Biochimica et Biophysica Acta*, 437, 604-627.



Thellier, M., Wissocq, J. C., and Heurteaux, C., 1980(a). Quantitative microlocation of lithium in the brain by a(n,  $\alpha$ ) nuclear reaction. *Nature*, **283**, 299-302.

Thellier, M., Heurteaux, C., and Wissocq, J. C., 1980(b). Quantitative study of the distribution of lithium in the mouse brain for various doses of lithium given to the animal. *Brain research*, **199**, 175-196.

Tilkian, J. G., Schroeder, J. S., and Kao, J., 1976. Effect of lithium on cardiovascular performance: report on extended ambulatory monitoring and exercise testing before and during lithium therapy. *Am. J. Cardiol.*, **38**, 701-708.

Toole, B. P. and Lowther, D. A., 1968. The effect of chondroitin sulphate-protein on the formation of collagen fibrils in vitro. *Biochem. J.*, **109**, 857-866.

Traub, W. and Yonath, A., 1966. Polymers of tripeptides as collagen models. X-ray studies of poly (L-prolyl-glycyl-proline) and related polytripeptides. *J. Mol. Biol.*, **16**, 404-412.

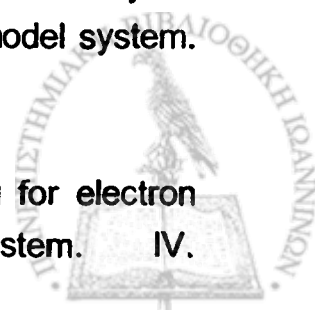
Traub, W., and Piez, K. A., 1971. The chemistry and structure of collagen. *Advan. Protein Chem.*, **25**, 243-253.

Tupin, J. P., Smith, D. B., Clanon, T. L., Kim, L. I., Nugent, A., and Groupe, A., 1973. The long-term use of lithium in aggressive prisoners. *Comp. Psychiat.*, **14**, 311-317.

Tzaphlidou, M., Chapman, J. A. and Meek, K. M., 1982a. A study of positive staining for electron microscopy using collagen as a model system. I. Staining by phosphotungstate and tungstate ions. *Micron*, **13**, 119-131.

Tzaphlidou, M., Chapman, J. A. and Al-Samman, M., 1982b. A study of positive staining for electron microscopy using collagen as a model system. II. Staining by uranyl ions. *Micron*, **13**, 133-145.

Tzaphlidou, M. and Chapman, J. A., 1986. A study of staining for electron microscopy using collagen as a model system. IV.



Phosphotungstate/tungstate staining patterns and their correlation with sequence data. *Micron Microsc. Acta*, 17, 269-280.

Tzaphlidou, M., 1986. A study of staining for electron microscopy using collagen as a model system. V. The effect of suberimidate fixation on negative staining patterns. *Micron Microsc. Acta*, 17, 281-287.

Tzaphlidou, M., 1991. The positive staining pattern of skin collagen in chronic haemodialysis patients. *Micron Microsc. Acta*, 22, 17-19.

Tzaphlidou, M., Siamopoulos, K. C. and Glaros, D., 1991a. Abnormal collagen fibril structure of skin in chronic haemodialysis patients: an electron microscopic study. *Micron Microsc. Acta*, 22, 1-8.

Tzaphlidou, M., Leontiou, I. and Glaros, D., 1991b. The effect of gamma irradiation on the organization of mouse skin collagen fibrils. The positive staining pattern. *Micron Microsc. Acta*, 22, 207-212.

Unwin, P. N. T., 1975. Beef liver catalase structure: interpretation of electron micrographs. *J. molec. Biol.*, 98, 235-242.

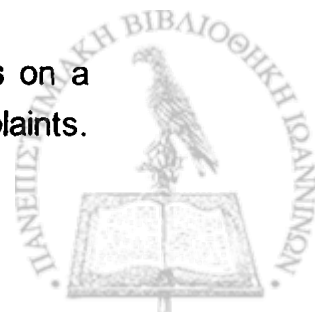
Vartsky, D., LoMonte, A., Ellis, K. J., Yasumura, S., and Cohn, S. H., 1985. A proposed method for the *in vivo* determination of lithium in human brain. *Phys. Med. Biol.*, 30, 1225-1236.

Veis, A., Anesey, J. and Mussell, S., 1967. A limiting microfibril model for the tree-dimensional arrangement within collagen fibres. *Nature*, 215, 931-934.

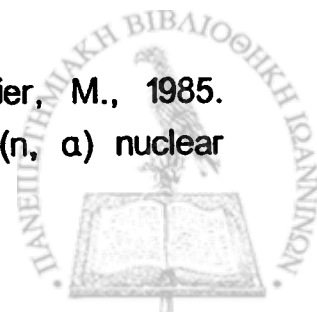
Veis, A., Miller, A., Leibovich, S. J. and Traub, W., 1979. The limiting collagen microfibril. The minimum structure demonstrating native axial periodicity. *Biochim. Biophys. Acta*, 576, 88-98.

Vestergaard, P., Amidsen, A., and Schou, M., 1980. Clinically significant side effects of lithium treatment. *Acta Psychiatr. Scand.*, 62, 193-200.

Vestergaard, P., Poulstrup, I., and Schou, M., 1988. Prospective studies on a lithium cohort. 3. Tremor, weight gain, diarrhea, psychological complaints. *Acta Psychiatr. Scand.*, 78, 434-441.



- Vogel, A., Holbrook, K.A., Steinmann, B., Gitzelmann, R. and Byers, P.H., 1979. Abnormal collagen fibril structure in the gravis form (type I) of Ehlers-Danlos syndrome. *Lab. Invest.*, **40**, 201-206.
- Von der Mark, K., Wendt, P., Rexrodt, F. and Kuhn, K., 1970. Direct evidence for a correlation between amino-acid sequence and cross striation pattern of collagen. *FEBS Lett.*, **11**, 105-108.
- Walker, R. G., Escott, M., Birchall, I., Dowling, J. P. and Kincaid-Smith, P., 1986. Chronic progressive renal lesions induced by lithium. *Kidney Int.*, **29**, 875-881.
- Waterhouse, E. J., Quesenberry, P. J. and Ballian, G., 1986. Collagen synthesis by murine bone marrow cell culture. *J. Cell. Physiol.*, **127**, 397-402.
- Weakley, B. S., 1972. *A beginner handbook in biological electron microscopy*. Churchill Livingstone. Edinburgh and London.
- Weinstein, M. R., and Goldfield, M. D., 1971. Cardiovascular malformations with lithium use during pregnancy. *Am. J. Psychiatry*, **132**, 529-531.
- Wendt, P., Fietzek, P. P., and Kuhn, K., 1972. The covalent structure of collagen. The tryptic, Thermolytic and chymotryptic peptides of  $\alpha_1$ -CB<sub>3</sub> from calf skin collagen. *FEBS Lett.*, **26**, 69-73.
- Wharton, R. N. and Fieve, R. R., 1966. The use of lithium in affective psychoses. *Amer. J. Psychiat.*, **123**, 706-712.
- Wissocq, J. C., Stelz, T., Heurteaux, C., Bisconte, J. C. and Thellier, M., 1979. Application of A(n, $\alpha$ ) nuclear reaction to the microlocalization of lithium in the mouse brains. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **27**, 1462-1470.
- Wissocq, J. C., Heurteaux, C., Hennequin, E., and Thellier, M., 1985. Microlocating lithium in the mouse embryo by use of a (n,  $\alpha$ ) nuclear reaction. *Roux' s Arch. Dev. Biol.*, **194**, 433-435.



Wood, G. C. and Keech, M. K., 1960. The formation of fibrils from collagen solutions. The effect of experimental conditions: kinetic and electron-microscope studies. *Biochem. J.*, 75, 588-598.

Woodhead-Galloway, J., Hukins, D. W. L. and Wray, J. S., 1975. Closest packing of two-stranded coiled-coils as a model for the collagen fibril. *Bioch. Bioph. Res. Comm.*, 64, 1237-1244.

Worral, E. P., Moody, J. P., Peet, M., Dick, P., Smith, A., Chambers, C., Adams, M. and Naylor, G. J., 1979. Controlled studies of the acute antidepressant effects of lithium. *Br. J. Psychiatry*, 135, 255-262.

Yoder, F. W., 1975. Acneiform eruption due to lithium carbonate. *Arch. Dermatol.*, 111, 396-397.

Zis, A. P. and Goodwin, F. K., 1979. Major affective disorder as a recurrent illness. A critical review. *Archives of General Psychiatry*, 36, 835-839.

