



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΟΡΓΑΝΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΟΣΤΩΝ ΜΕ
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

ΜΠΑΛΑΤΣΟΥΚΑΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

ΦΥΣΙΚΟΣ, M.Sc.

Διδακτορική Διατριβή

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2011

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΟΡΓΑΝΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΟΣΤΩΝ ΜΕ
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

ΜΠΑΛΑΤΣΟΥΚΑΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

ΦΥΣΙΚΟΣ, M.Sc.

Διδακτορική Διατριβή

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2011

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»

Ημερομηνία αίτησης του κ. Μπαλατσούκα Ιωάννη: 19-7-2007

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 613^α/2-10-2007

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπουσα

Τζαφλίδου Μαργαρίτα Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Εμφιετζόγλου Δημήτριος Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Φυσικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Πατσαλάς Παναγιώτης Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 17-10-2007

«Μελέτη ανόργανων συστατικών οστών με φασματοσκοπικές τεχνικές»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 718^α/12-7-2011

Ξενάκης Θεόδωρος	Καθηγητής Ορθοπαιδικής, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπάκας Θωμάς	Καθηγητής Τμήματος Φυσικής, Σχολής Θετικών Επιστημών Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Τζαφλίδου Μαργαρίτα	Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσικής, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Πατσαλάς Παναγιώτης	Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Γελαλής Ιωάννης	Επίκουρος Καθηγητής Ορθοπαιδικής με έμφαση στη Χειρουργική Σπονδυλικής Στήλης και Επανορθωτική Χειρουργική, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Εμφιετζόγλου Δημήτριος	Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Φυσικής, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κουρκουμέλης Νικόλαος	Λέκτορας Ιατρικής Φυσικής, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις **20-12-2011**

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Μαργαρίτα Τζαφλίδου
Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσικής



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θέλω να εκφράσω τις πιο θερμές μου ευχαριστίες στην επιβλέποντα κ. Τζαφλίδου Μαργαρίτα, Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσικής και Διευθύντρια του ομώνυμου Εργαστηρίου της Ιατρικής Σχολής, για την ιδιαίτερα καλή συνεργασία, την αμέριστη συμπαράστασή της, καθώς επίσης και για τις σημαντικότερες συμβουλές που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Πατσαλά Παναγιώτη, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών, για τις χρήσιμες συμβουλές του και για την παροχή της διάταξης Auger του εργαστηρίου Φυσικής Επιφανειών του Τμήματος Φυσικής, στο οποίο διεξήχθη μέρος των πειραμάτων της παρούσας εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στον κ. Εμφιετζόγλου Δημήτριο, Επίκουρο Καθηγητή Ιατρικής Φυσικής του Τμήματος Ιατρικής για τις χρήσιμες υποδείξεις του σε θέματα που αφορούσαν στην κατανόηση και στην εφαρμογή μεθόδων διόρθωσης στα αποτελέσματα των πειραμάτων.

Στο σημείο αυτό αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον κ. Κουρκουμέλη Νικόλαο, Λέκτορα Ιατρικής Φυσικής του Τμήματος Ιατρικής για την καλή διάθεση που επέδειξε στην επίλυση προβλημάτων που αφορούσαν στην εργασία. Ο πολύτιμος χρόνος που παρείχε συντέλεσε καθοριστικά στην άρτια ολοκλήρωση της εργασίας.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τον κ. Ματθόπουλο Δημήτρη, Καθηγητή Γενικής Βιολογίας Κυτταρικής Βιολογίας του Τμήματος Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, για τις χρήσιμες συμβουλές και τις πολύτιμες υποδείξεις του στην εξαγωγή οστών από τα πειραματόζωα.

Ευχαριστώ, επίσης, όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Ιατρικής Φυσικής για την αμέριστη συμπαράσταση και βοήθειά τους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένειά μου που ήταν δίπλα μου σε κάθε μου βήμα, στηρίζοντάς με με κάθε δυνατό τρόπο, ώστε να καταφέρω να επιτύχω τους στόχους μου.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τα οστά είναι στερεά μορφή του συνδετικού ιστού και αποτελούν το στηρικτικό ιστό του σώματος. Η ιδιότητα που κάνει τα οστά να διαφέρουν από τον υπόλοιπο συνδετικό ιστό, είναι η εξαιρετική τους σκληρότητα. Η ιδιαίτερη αυτή σκληρότητα οφείλεται στη σύνθεσή τους. Τα οστά αποτελούνται από ανόργανα άλατα κυρίως ασβεστίου και φωσφόρου, καθώς και από οργανική ουσία που είναι το κολλαγόνο. Η διαδοχική εναπόθεση των αλάτων αυτών με το κολλαγόνο, προσφέρει στο οστό στιβαρότητα και ελαστικότητα. Η αναλογία των ανόργανων αλάτων είναι συγκεκριμένη και οποιαδήποτε διαταραχή της έχει ως αποτέλεσμα αλλοιώσεις και παθήσεις των οστών (οστεοπόρωση, οστεοπενία, οστεομαλακία). Επίσης, το οστό είναι ένας ζωντανός οργανισμός που υφίσταται συνεχή ανακατασκευή και λειτουργεί για τον οργανισμό ως αποθήκη του ασβεστίου και του φωσφόρου. Επιπλέον, μέσω της ανακατασκευής αυτής το οστό κατορθώνει να διατηρεί την ολοκληρωμένη του μορφή

Σήμερα, μια από τις κυριότερες παθήσεις των οστών είναι η οστεοπόρωση. Ετυμολογικά σημαίνει «πορώδες οστού» και είναι μια χρόνια πάθηση κατά την οποία παρουσιάζεται απώλεια ποσότητας και ποιότητας των οστών. Προσβάλλει μεγάλο μέρος του πληθυσμού, κυρίως γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση. Στην Ελλάδα νοσούν 1 στις 2 γυναίκες ενώ δεν αφήνει ανεπηρέαστους τους άντρες στους οποίους νοσεί 1 στους 4. Ο οικονομικός αντίκτυπος της νόσου είναι τεράστιος και έχει υπολογιστεί ότι στις ανεπτυγμένες χώρες αγγίζει συνολικά τα 48 δισεκατομμύρια δολάρια ανά έτος. Γι' αυτό, τα τελευταία έτη μεγάλο μέρος της έρευνας έχει στραφεί στην κατανόηση και θεραπεία της σκελετικής αυτής πάθησης.

Η ακριβής στοιχειομετρική σύσταση της ανόργανης ουσίας των οστών αποτελεί διαρκές πεδίο έρευνας. Σημαντικός παράγοντας στη μελέτη των αλλαγών στο οστό, ως συνέπεια σκελετικών παθήσεων, είναι ο λόγος Ca/P ο οποίος παρέχει χρήσιμες πληροφορίες για την κατάσταση του οστού και ίσως να προσφέρει μεγαλύτερη αξιοπιστία από άλλες παραμέτρους στη διάγνωση σκελετικών ανωμαλιών. Για τον προσδιορισμό του ανωτέρου λόγου χρησιμοποιούνται τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* τεχνικές. Οι περισσότερες βασίζονται στη φασματοσκοπική μελέτη των οστών. Στην παρούσα διατριβή γίνεται

χρήση της φασματοσκοπίας Auger καθώς και του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης με χρήση στοιχειακού αναλυτή ακτίνων – X.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος.....	9
Επεξηγήσεις Συντομογραφιών.....	15
Λίστα εικόνων.....	17
Λίστα πινάκων.....	21
Λίστα γραφημάτων.....	23
Κεφάλαιο 1 – Εισαγωγή.....	27
1.1 Οστά.....	27
1.1.2 Δομή.....	28
1.1.2.1 Μικροσκοπική δομή.....	29
1.1.2.2 Κυτταρική δομή.....	30
1.1.2.3 Νανοδομή.....	31
1.1.3 Υδροξυαπατίτης – Ανόργανη χημική σύσταση.....	34
1.1.4 Ο λόγος Ca/P.....	37
1.1.5 Οστική ανακατασκευή – Ο ρόλος Ca και P.....	39
1.1.6 Οστεοπόρωση.....	41
1.2 Φασματοσκοπικές τεχνικές.....	46
1.2.1 Φασματοσκοπία ηλεκτρονίων Auger.....	47
1.2.1.1 Φαινόμενο Auger.....	47

1.2.1.2	Αλληλεπίδραση διεγέρτη – υλικού	52
1.2.1.3	Φάσματα Auger.....	58
1.2.1.4	Συσκευές Auger.....	60
1.2.2	Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM).....	62
1.2.2.1	Διάταξη ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης.....	63
1.2.2.2	Σχηματισμός εικόνας.....	65
1.2.2.3	Στοιχειακή ανάλυση δείγματος.....	68
1.2.3	Σύγκριση των δύο τεχνικών.....	74
Κεφάλαιο 2 – Υλικά και μέθοδοι.....		77
2.1	Εισαγωγή.....	77
2.2	Εξαγωγή οστών από τα ζώα.....	78
2.3	Προετοιμασία οστών προς μελέτη.....	79
2.3.1	Καθαρισμός οστών.....	79
2.3.2	Ξήρανση οστών.....	80
2.3.3	Δείγματα προς μελέτη.....	81
2.4	Προκλητή οστεοπόρωση – Μέθοδος IMO.....	83
2.5	Πειραματική διάταξη Auger.....	84
2.6	Εναπόθεση άνθρακα για παρακολούθηση στο SEM.....	87
2.7	Πειραματική διάταξη SEM – EDS	90
2.8	Στατιστική ανάλυση.....	93

Κεφάλαιο 3 – Αποτελέσματα	95
3.1 Μελέτη λόγου Ca/P σε φυσιολογικά οστά.....	95
3.1.1 Μέτρηση λόγου Ca/P στους επίμυες.....	95
3.1.1.1 Φασματοσκοπία Auger.....	95
3.1.1.2 SEM – EDS	108
3.1.1.3 Σύγκριση αποτελεσμάτων Auger – SEM	113
3.1.2 Μέτρηση λόγου Ca/P στους μύες.....	114
3.1.3 Σύγκριση λόγων Ca/P ανάμεσα στα τροκτικά.....	119
3.1.4 Μέτρηση λόγου Ca/P στους κόνικλους.....	122
3.1.4.1 Φασματοσκοπία Auger.....	122
3.1.4.2 SEM – EDS	125
3.2. Μελέτη λόγου Ca/P σε οστεοπορωτικά οστά.....	128
3.2.1 Φασματοσκοπία Auger.....	128
3.2.2 SEM – EDS	131
3.2.3 Μορφολογική μελέτη με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης.....	134
3.3 Σύγκριση αποτελεσμάτων Auger – SEM στους κόνικλους.....	138
3.4 Σύγκριση λόγων Ca/P ανάμεσα στα πειραματόζωα.....	139
Κεφάλαιο 4 – Συμπεράσματα και συζήτηση	143
4.1 Ο λόγος Ca/P στους επίμυες (Wistar rats).....	144
4.2 Ο λόγος Ca/P στους μύες (Swiss albino mice).....	148

Περιεχόμενα

4.3	Σύγκριση του λόγου Ca/P στα τρωκτικά.....	149
4.4	Ο λόγος Ca/P στους φυσιολογικούς κονίκλους.....	150
4.5	Ο λόγος Ca/P σε οστεοπορωτικούς κονίκλους.....	151
4.6	Γενική σύγκριση του λόγου Ca/P στα πειραματόζωα.....	153
4.7	Σύνοψη.....	154
4.8	Μελλοντική εργασία.....	155
	Περίληψη.....	157
	Abstract.....	159
	Βιβλιογραφία.....	161

ΕΠΕΞΗΓΗΣΕΙΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

AES	Auger Electron Spectroscopy
BMC	Bone Mineral Content
BMD	Bone Mineral Density
BSE	Backscattering Electron
CMA	Cylindrical Mirror Analyzer
CRT	Cathode Ray Tube
DXA	Dual – energy X – Ray Absorptiometry
EDS	Energy – Dispersive X – Ray Spectroscopy
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
H/Y	Ηλεκτρονικός Υπολογιστής
HA	Hydroxyapatite
HSA	Hemispherical Analyzer
IMFP	Inelastic Mean Free Path
IMO	Inflammation Mediated Osteoporosis
OCP	Octacalcium Phosphate
PTH	Parathyroid Hormone
SEM	Scanning Electron Microscope
SESSA	Simulation of Electron Spectra for Surface Analysis
TEM	Transmission Electron Microscope
TPP – 2M	Tanuma S., Powel J. C., Penn R. D., formula
UHV	Ultra – High Vacuum
WHO	World Health Organization
XRD	X – Ray Diffraction

ΛΙΣΤΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

<i>Εικόνα 1.1</i>	Ιεραρχική δομή του οστού: α) Μακροσκοπικά, β) Μικροσκοπικά, γ) Νανοδομή.....	28
<i>Εικόνα 1.2</i>	Εγκάρσια τομή μεγάλου μήκους συμπαγούς οστού.....	29
<i>Εικόνα 1.3</i>	Σχηματικό διάγραμμα της δομής των ινιδίων κολλαγόνου, των μορίων κολλαγόνου και του κρυσταλλικού απατίτη.....	32
<i>Εικόνα 1.4</i>	Σταδιακή επικάθηση κρυστάλλων απατίτη μέχρι την πλήρη ασβεστοποίησή τους (δεξιά).....	33
<i>Εικόνα 1.5</i>	Ο κύκλος της οστικής ανακατασκευής. Τα πέντε στάδια: α) ηρεμία, β) ενεργοποίηση, γ) οστεολυσία, δ) αναστροφή, ε) οστεοσύνθεση.....	40
<i>Εικόνα 1.6</i>	Οι αλλαγές στην οστική πυκνότητα των γυναικών ανάλογα με την ηλικία.....	43
<i>Εικόνα 1.7</i>	(A) Εικόνα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM) συμπαγούς υγιούς οστού όπου εμφανίζεται η συνεχής δομή των κρυστάλλων. (B) Εικόνα SEM οστεοπορωτικού συμπαγούς οστού όπου φαίνεται η ασυνεχής δομή των κρυστάλλων.....	44
<i>Εικόνα 1.8</i>	(A) Εικόνα SEM χαμηλής ενέργειας από σπογγώδες οστό λεκάνης υγιούς γυναίκας. (B) Εικόνα SEM οστεοπορωτικού σπογγώδους οστού λεκάνης γυναίκας όπου παρατηρείται το έλλειμμα οστίτη ιστού σε σχέση με το υγιές και την εμφάνιση κατάγματος.....	45

Εικόνα 1.9	Ιονισμός μέσω εξωτερικού διεγέρτη και απελευθέρωση ηλεκτρονίου μέσω της διαδικασίας Auger που αποτελείται από τρεις φάσεις α) τον ιονισμό, β) την ηρεμία και γ) την εκπομπή.....	48
Εικόνα 1.10	Ελαστική σκέδαση εισερχόμενης δέσμης ηλεκτρονίων με τον πυρήνα και τα ηλεκτρόνια του ατόμου.....	53
Εικόνα 1.11	Αλληλεπίδραση δέσμης ηλεκτρονίων – επιφάνειας και δημιουργία δευτερευόντων φαινομένων: δευτερογενή εκπομπή ηλεκτρονίων, οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια, ηλεκτρόνια Auger, φθορισμός ακτίνων – X.....	54
Εικόνα 1.12	Τα βέλη παρουσιάζουν τις πιθανές διευθύνσεις κίνησης των ηλεκτρονίων Auger στο υλικό. Τα πορτοκαλί βέλη είναι τα ηλεκτρόνια Auger με την χαρακτηριστική τους ενέργεια ενώ τα μπλε βέλη είναι τα ηλεκτρόνια αφού έχουν υποστεί ανελαστική σκέδαση.....	55
Εικόνα 1.13	Σχηματική απεικόνιση συστήματος Auger.....	60
Εικόνα 1.14	Δομή και η λειτουργία ενός κυλινδρικού αναλυτή CMA. Απεικονίζεται το δείγμα, οι τροχιές των ηλεκτρονίων, ο εξωτερικός και εσωτερικός κύλινδρος, τα διαφράγματα και ο ανιχνευτής.....	61
Εικόνα 1.15	Σχηματική αναπαράσταση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης.....	64
Εικόνα 1.16	Η εκπομπή δευτερογενών ηλεκτρονίων είναι μεγαλύτερη σε περιοχές με ανώμαλη επιφάνεια. Οι περιοχές αυτές εμφανίζονται πιο φωτεινές από ό,τι οι επίπεδες.....	66
Εικόνα 1.17	α) Απεικόνιση στην οθόνη του SEM ενός μη αγώγιμου δείγματος όπου εμφανίζεται το φαινόμενο φόρτισης (charging effect). Οι αλλοιώσεις στην εικόνα είναι εμφανείς.	

	<i>β)</i> Η ίδια εικόνα μετά την εναπόθεση λεπτού μεταλλικού στρώματος στην επιφάνεια του δείγματος. Οι λεπτομέρειές του διακρίνονται ευκρινώς.....	67
Εικόνα 1.18	Διαδικασία εκπομπής ακτίνων – X από το άτομο.....	68
Εικόνα 1.19	Σχηματική απεικόνιση του φασματογράφου ανάλυσης ενεργειακής διασποράς (EDS).....	69
Εικόνα 1.20	Διάγραμμα έντασης – ενέργειας εκπεμπόμενων ακτίνων – X από εναπόθεση λεπτού στρώματος μετάλλου σε γυαλί, όπως απεικονίζεται στην οθόνη του Η/Υ μετά την ποιοτική ανάλυση της θέσης των κορυφών ανάλογα με τον αντίστοιχο φθορισμό των ακτίνων.....	70
Εικόνα 1.21	Φάσμα ακτίνων – X καθαρού χαλκού (Cu) όπου εμφανίζονται οι χαρακτηριστικές ενέργειες των K και L στοιβάδων καθώς και ο θόρυβος (bremsstrahlung ή continuum).....	71
Εικόνα 2.1	<i>α)</i> Σκελετικό σύστημα επίμου όπου εμφανίζονται τα οστά του μηρού, της κνήμης, του βραχιόνιου και των πλευρών. <i>β)</i> Σκελετικό σύστημα κονίκλου όπου εμφανίζονται τα οστά του μηρού, της κνήμης, του βραχιόνιου και των πλευρών.....	79
Εικόνα 2.2	<i>α)</i> Υδραυλική πρέσα του εργαστηρίου Ιατρικής Φυσικής όπου η σκόνη του οστού συμπιέζεται υπό πίεση 3 tons. <i>β)</i> Καλούπι παστίλιας 8 mm όπου τοποθετείται η σκόνη του οστού. <i>γ)</i> Παστίλια οστού διαμέτρου 8 mm.....	83
Εικόνα 2.3	<i>α)</i> Διάταξη Auger που αποτελείται από: το θάλαμο προπαρασκευής κενού της τάξης του $10^{-7} - 10^{-8}$ mbar με τη χρήση μηχανικής αντλίας (rotary pump) και αντλίας τούρμπο (turbo pump), τη γραμμή μεταφοράς του δείγματος υπό κενό στο θάλαμο Auger και το θάλαμο Auger υπό συνεχές κενό μικρότερο του 5×10^{-9} mbar με τη χρήση αντλίας ιονισμού (ion pump).	

- β)* Εσωτερικό θαλάμου Auger όπου τοποθετείται ο δειγματοφορέας και μπροστά από αυτόν βρίσκεται το κανόνι ηλεκτρονίων με τον κυλινδρικό αναλυτή.
- γ)* Μονάδα έλεγχου: I) του αναλυτή και II) του νήματος για την εκπομπή της αρχικής δέσμης ηλεκτρονίων, III) ενισχυτής σήματος.....**85**
- Εικόνα 2.4** Βλάβη στην επιφάνεια οστού (παστίλια) εξαιτίας της ενεργητικότητας της δέσμης.....**87**
- Εικόνα 2.5** *α)* Διάταξη εξάχνωσης άνθρακα (PVD) της Εταιρείας JEOL JEE – 4X.
β) Εσωτερικό του θαλάμου εξάχνωσης.....**89**
- Εικόνα 2.6** *α)* Μονάδα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης τύπου JEOL JSM-5600 εφοδιασμένο με τον ανιχνευτή ακτίνων – X τύπου Link ISIS 300.
β) Θάλαμος κενού του μικροσκοπίου σάρωσης με τη στήλη του μικροσκοπίου και τους ανιχνευτές των ηλεκτρονίων.
γ) Εσωτερικό του θαλάμου του μικροσκοπίου σάρωσης.....**91**
- Εικόνα 3.1** Απεικόνιση στο SEM οστών από φυσιολογικούς κονίκλους
α) Περίοστεο μηριαίου οστού θηλυκού κονίκλου,
β) Ενδόστεο μηριαίου οστού θηλυκού κονίκλου,
γ) Περίοστεο οστού πλευρών θηλυκού κονίκλου,
δ) Ενδόστεο οστού πλευρών θηλυκού κονίκλου.....**135**
- Εικόνα 3.2** Απεικόνιση στο SEM οστών από οστεοπορωτικούς κονίκλους
α1,2) Περίοστεο μηριαίου οστού οστεοπορωτικού κονίκλου,
β) Ενδόστεο μηριαίου οστού οστεοπορωτικού κονίκλου,
γ) Περίοστεο οστού πλευρών οστεοπορωτικού κονίκλου,
δ) Ενδόστεο οστού πλευρών οστεοπορωτικού κονίκλου.....**137**

ΛΙΣΤΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

- Πίνακας 1.1** Συνοπτική παρουσίαση των ιόντων στον κρύσταλλο του ΗΑ όπως καταγράφηκε από τους Neumann και Neumann (1958).....**36**
- Πίνακας 2.1** Κατάταξη πειραματοζώων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ανάλογα με τον αριθμό των ζώων, το είδος, το φύλο, το μέσο όρο του βάρους τους (M.O.±SD) και την ηλικία τους.....**77**
- Πίνακας 3.1** Αποτελέσματα του λόγου Ca/P στους επίμυες μέσω φασματοσκοπίας Auger ταξινομημένα ανάλογα με την ηλικία, το φύλο του επίμυος και το είδος του οστού. Γίνεται επίσης σύγκριση αριστερού και δεξιού μέρους στην ηλικία των 5 μηνών. Τα αποτελέσματα είναι υπό τη μορφή μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (mean ± S.D.).....**103**
- Πίνακας 3.2** Αποτελέσματα του λόγου Ca/P μέσω φασματοσκοπίας EDS στους επίμυες ταξινομημένα ανάλογα με την ηλικία, το φύλο του επίμυος και το είδος του οστού. Τα αποτελέσματα είναι υπό τη μορφή μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (mean ± S.D.).....**110**
- Πίνακας 3.3** Αποτελέσματα του λόγου Ca/P μέσω φασματοσκοπίας Auger στους μύες ταξινομημένα ανάλογα με την ηλικία, το φύλο και το είδος του οστού. Τα αποτελέσματα είναι υπό την μορφή μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (mean ± S.D.).....**116**
- Πίνακας 3.4** Αποτελέσματα του λόγου Ca/P μέσω φασματοσκοπίας Auger στους κονίκλους για τα δύο φύλα ανάλογα με το είδος του οστού. Τα αποτελέσματα είναι υπό τη μορφή μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (mean ± S.D.).....**124**

- Πίνακας 3.5** Αποτελέσματα του λόγου Ca/P μέσω φασματοσκοπίας EDS στους κονίκλους για τα δύο φύλα ανάλογα με το είδος του οστού. Τα αποτελέσματα είναι υπό τη μορφή μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση (mean \pm S.D.).....**125**
- Πίνακας 3.6** Αποτελέσματα του λόγου Ca/P μέσω φασματοσκοπίας Auger για τους μάρτυρες και τους οστεοπορωτικούς κονίκλους ανάλογα με το είδος του οστού. Τα αποτελέσματα είναι υπό τη μορφή μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση (mean \pm S.D.).....**130**
- Πίνακας 3.7** Αποτελέσματα του λόγου Ca/P μέσω της φασματοσκοπία EDS για τους μάρτυρες και τους οστεοπορωτικούς κονίκλους ανάλογα με το είδος του οστού. Τα αποτελέσματα είναι υπό τη μορφή μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση (mean \pm S.D.).....**133**

ΛΙΣΤΑ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

- Γράφημα 1.1** Οι ενέργειες και οι αντίστοιχες μεταβάσεις για εκπομπή ηλεκτρονίων Auger για στοιχεία με ατομικό αριθμό έως 90.....**49**
- Γράφημα 1.2** Η απόδοση εκπομπής ηλεκτρονίου Auger είναι μεγαλύτερη για άτομα με μικρό ατομικό αριθμό ($Z < 30$) για την KLL μετάβαση, αντίθετα η απόδοση εκπομπής ακτίνων $-X$ είναι μεγαλύτερη για άτομα με μεγάλο ατομικό αριθμό Z**51**
- Γράφημα 1.3** Η ενεργός διατομή του ιονισμού ανάλογα με το λόγο της ενέργειας του διεγέρτη E_0 και της ενέργειας της εσωτερικής στοιβάδας E_w**52**
- Γράφημα 1.4** Απεικόνιση της πιθανότητας διαφυγής ηλεκτρονίου συναρτήσει του λόγου d/λ . Για τιμές του $d/\lambda > 5$ η πιθανότητα πρακτικά μηδενίζεται οπότε το μεγαλύτερο μέρος των ηλεκτρονίων προέρχεται από βάθος $d = \lambda$**56**
- Γράφημα 1.5** Γραφική εξάρτηση του IMFP από την ενέργεια των ηλεκτρονίων για ένα υλικό ατομικού όγκου α_A^3**57**
- Γράφημα 1.6** Φάσμα AES από μέταλλο Pd. Η ενέργεια της προσπίπτουσας δέσμης είναι 2,5 KeV. Οι δύο κύριες κορυφές των ηλεκτρονίων Auger είναι στα 220 και 340 eV. Το υπόβαθρο οφείλεται στα δευτερογενή ηλεκτρόνια από τα φαινόμενα της ανελαστικής σκέδασης.....**58**
- Γράφημα 1.7** Το φάσμα AES του Pd υπό τη διαφορική μορφή $d(N(E))/dE$**59**
- Γράφημα 2.1** α) Γράφημα φασματοσκοπίας μάζας από οστά χοίρων σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία. Παρατηρείται η ελάττωση της μάζας του ύδατος μέχρι τη θερμοκρασία των 200 °C ενώ παράλληλα περαιτέρω αύξηση της

θερμοκρασίας προκαλεί παραγωγή CO₂ που σημαίνει την απώλεια σε οργανικό μέρος του οστού.

β) Γράφημα φασματοσκοπίας υπερύθρου σε ανθρώπινα οστά σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία. Στα 3400 cm⁻¹ εμφανίζεται η κορυφή του OH⁻ όπου παρατηρείται ελάττωσή της με αύξηση της θερμοκρασίας. Στα 1600 – 400cm⁻¹ εμφανίζονται οι κορυφές των οργανικών ενώσεων όπου παρατηρείται έντονη μεταβολή τους για θερμοκρασία μεγαλύτερη των 200 °C.....**81**

Γράφημα 3.1 Φάσμα Auger παστίλιας συμπαγούς οστού κνήμης αρσενικού επίμυ 14 μηνών.....**96**

Γράφημα 3.2 Φάσματα Auger από παστίλια οστών **α)** αρσενικών επίμυων ηλικίας 5 μηνών **β)** θηλυκών επίμυων ηλικίας 5 μηνών.....**98**

Γράφημα 3.3 Φάσματα Auger από παστίλια οστών κνήμης **α)** αρσενικών επίμυων ηλικίας 5 και 14 μηνών **β)** θηλυκών επίμυων ηλικίας 5 και 14 μηνών.....**99**

Γράφημα 3.4 Φάσματα Auger από παστίλια οστών μηρού αριστερού και δεξιού μέρους **α)** αρσενικών επίμυων ηλικίας 5 μηνών **β)** θηλυκών επίμυων ηλικίας 5 μηνών.....**100**

Γράφημα 3.5 Σύγκριση αποτελεσμάτων του λόγου Ca/P μέσω φασματοσκοπίας Auger μεταξύ του δεξιού και αριστερού μέρους **α)** αρσενικοί επίμυες ηλικίας 5 μηνών **β)** θηλυκοί επίμυες ηλικίας 5 μηνών.....**104**

Γράφημα 3.6 Σύγκριση αποτελεσμάτων του λόγου Ca/P μέσω φασματοσκοπίας Auger μεταξύ αρσενικών και θηλυκών επίμυων **α)** ηλικίας 5 μηνών **β)** ηλικίας 14 μηνών. (*: P ≤ 0,05).....**106**

<i>Γράφημα 3.7</i> Σύγκριση αποτελεσμάτων του λόγου Ca/P μέσω φασματοσκοπίας Auger μεταξύ των ηλικιών 5 και 14 μηνών <i>α)</i> αρσενικοί επίμυες <i>β)</i> θηλυκοί επίμυες. (** P ≤ 0,01, *** P ≤ 0,001).....	107
<i>Γράφημα 3.8</i> Φάσμα EDS από παστίλια συμπαγούς οστού κνήμης αρσενικού επίμυ 14 μηνών.....	109
<i>Γράφημά 3.9</i> Σύγκριση αποτελεσμάτων του λόγου Ca/P μέσω φασματοσκοπίας EDS μεταξύ αρσενικών και θηλυκών επίμυων <i>α)</i> ηλικίας 5 μηνών <i>β)</i> ηλικίας 14 μηνών. (** P ≤ 0,01, *** P ≤ 0,001).....	111
<i>Γράφημα 3.10</i> Σύγκριση αποτελεσμάτων του λόγου Ca/P μέσω φασματοσκοπίας EDS μεταξύ των ηλικιών 5 και 14 μηνών <i>α)</i> αρσενικοί επίμυες <i>β)</i> θηλυκοί επίμυες. (* P ≤ 0,05, *** P ≤ 0,001).....	112
<i>Γράφημα 3.11</i> Φάσματα Auger μηρού αρσενικών και θηλυκών μυών ηλικίας 5 και 14 μηνών.....	115
<i>Γράφημα 3.12</i> Σύγκριση αποτελεσμάτων του λόγου Ca/P των οστών μέσω φασματοσκοπίας Auger μεταξύ αρσενικών και θηλυκών μυών <i>α)</i> ηλικίας 5 μηνών <i>β)</i> ηλικίας 14 μηνών.....	117
<i>Γράφημα 3.13</i> Σύγκριση αποτελεσμάτων του λόγου Ca/P των οστών μέσω φασματοσκοπίας Auger μεταξύ των ηλικιών 5 και 14 μηνών <i>α)</i> αρσενικοί μύες <i>β)</i> θηλυκοί μύες.....	119
<i>Γράφημα 3.14</i> Σύγκριση αποτελεσμάτων του λόγου Ca/P των οστών μέσω φασματοσκοπίας Auger μεταξύ των τρωκτικών <i>α)</i> αρσενικοί μύες ηλικίας 5 μηνών και αρσενικοί επίμυες ηλικίας 14 μηνών, <i>β)</i> θηλυκοί μύες ηλικίας 5 μηνών και θηλυκοί επίμυες ηλικίας 14 μηνών. (** P ≤ 0,01, * P ≤ 0,05).....	121

Γράφημα 3.15 Φάσματα Auger βραχιόνιου και πλευρών αρσενικών και θηλυκών κονίκλων.....	123
Γράφημά 3.16 Σύγκριση αποτελεσμάτων του λόγου Ca/P των μετρηθέντων οστών μεταξύ αρσενικών και θηλυκών κονίκλων. (** P ≤ 0,01).....	124
Γράφημα 3.17 Φάσμα EDS από παστίλια συμπαγούς οστού κνήμης αρσενικού κονίκλου.....	125
Γράφημά 3.18 Σύγκριση αποτελεσμάτων του λόγου Ca/P των οστών μέσω φασματοσκοπίας EDS μεταξύ αρσενικών και θηλυκών κονίκλων. (** P ≤ 0,01).....	127
Γράφημα 3.19 Φάσματα Auger μηρού και πλευρών οστεοπορωτικών και φυσιολογικών κονίκλων.....	129
Γράφημα 3.20 Σύγκριση αποτελεσμάτων του λόγου Ca/P μέσω φασματοσκοπίας Auger μεταξύ μαρτύρων και οστεοπορωτικών κονίκλων. (* P ≤ 0,05).....	130
Γράφημα 3.21 Φάσμα EDS από παστίλια συμπαγούς οστού μηρού α) φυσιολογικού κονίκλου, β) οστεοπορωτικού κονίκλου.....	132
Γράφημα 3.22 Σύγκριση αποτελεσμάτων του λόγου Ca/P μέσω φασματοσκοπίας EDS μεταξύ μαρτύρων και οστεοπορωτικών κονίκλων. (* P ≤ 0,05).....	133
Γράφημα 3.23 Σύγκριση των λόγων Ca/P μέσω φασματοσκοπίας Auger μεταξύ των ενήλικων πειραματοζώων α) Αρσενικά και β) Θηλυκά. (* P ≤ 0,05, ** P ≤ 0,01, *** P ≤ 0,001).....	140

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΟΣΤΑ

Τα οστά είναι μια εξειδικευμένη μορφή συνδετικού ιστού. Αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος του σκελετού καθώς και τον κυρίως στηρικτικό ιστό του σώματος. Διαφέρουν από τον υπόλοιπο συνδετικό ιστό ως προς την εξαιρετική σκληρότητα τους η οποία οφείλεται στη διαδοχική εναπόθεση μαλακού οργανικού υλικού σε ανόργανο υπόστρωμα που αποτελείται κυρίως από ασβέστιο, φώσφορο και άνθρακα [88], [134].

Ο κύριος διαχωρισμός των οστών γίνεται με βάση τον οστίτη ιστό που τα συνθέτει, ο οποίος ανάλογα με τη μορφή του, τα διαχωρίζει σε δύο κατηγορίες: α) τη συμπαγή μορφή που αποτελείται από ομοιογενή συμπαγή οστίτη ιστό (cortical bone) και συνθέτει το 80% του ανθρώπινου σκελετού και β) τη σπογγώδη μορφή (trabecular ή cancellous bone) που αποτελείται από ένα δίκτυο οστικών δοκίδων με ενδιάμεσους χώρους που καλύπτονται από μυελό των οστών [76].

Μακροσκοπικός διαχωρισμός των οστών μπορεί να γίνει ανάλογα με τη θέση και το σχήμα τους. Ανάλογα με τη θέση, διακρίνονται σε οστά των άνω και κάτω άκρων και σε οστά του κορμού. Ανάλογα με το σχήμα, ταξινομούνται στις εξής πέντε κατηγορίες: α) επιμήκη οστά που είναι τα οστά των άκρων και το κύριο μέρος τους αποτελείται από συμπαγή οστίτη ιστό ενώ τα άκρα τους από σπογγώδη, β) βραχέα οστά που αποτελούνται από σπογγώδη οστίτη ιστό και τέτοια είναι οι σπόνδυλοι, γ) πλατειά οστά, όπως του κρανίου, τα οποία περιλαμβάνουν δύο πλάκες από συμπαγή οστίτη ιστό μεταξύ των οποίων παρεμβάλλεται σπογγώδης ιστός, δ) ανώμαλα οστά με διάφορα σχήματα (οστά του προσώπου) και ε) σησαμοειδή οστά που είναι στρογγυλά ή ωοειδή και αναπτύσσονται κοντά στις αρθρώσεις [76], [88].

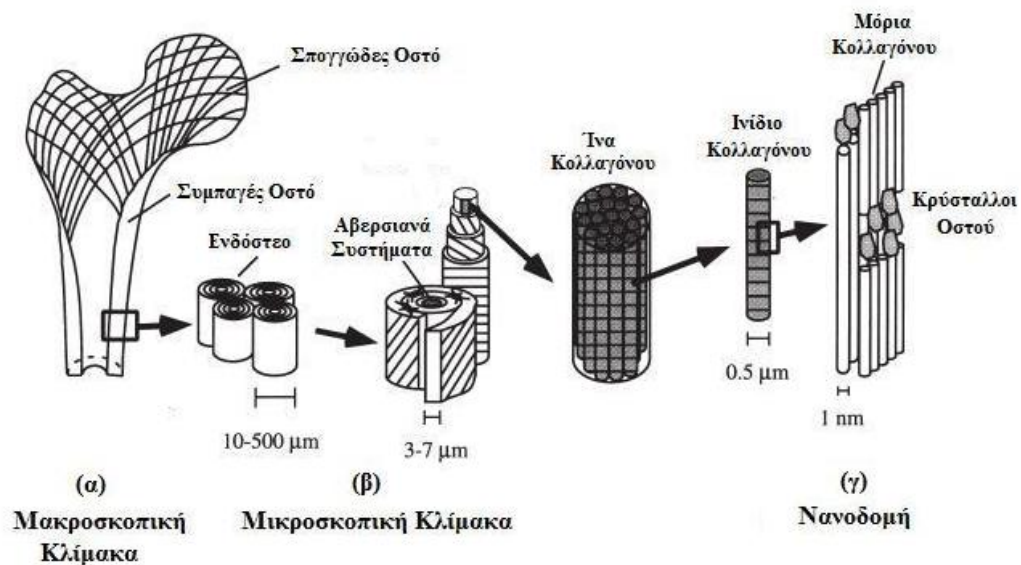
Το σχήμα των οστών εξαρτάται και από την κατασκευή τους η οποία ποικίλλει ανάλογα με τη λειτουργία τους. Έτσι στα άκρα του σώματος όπου απαιτούνται οστά με

περισσότερη ακαμψία, η ποσότητα του συμπαγούς οστίτη ιστού είναι μεγαλύτερη στη μέση του οστού από ό,τι στα άκρα του.

Γενικά, ο ρόλος των οστών είναι να προστατεύουν τα ζωτικά όργανα (καρδιά, πνεύμονες, κ.α.), να στηρίζουν τον κορμό και να συμμετέχουν στην κίνηση. Επιπλέον, παρέχουν κύτταρα αίματος μέσω του μυελού των οστών και αποτελούν, λόγω της χημικής τους σύστασης, αποθήκες αλάτων (ασβεστίου, φωσφόρου, μαγνησίου, κ.α.) [76], [88].

1.1.2. ΔΟΜΗ

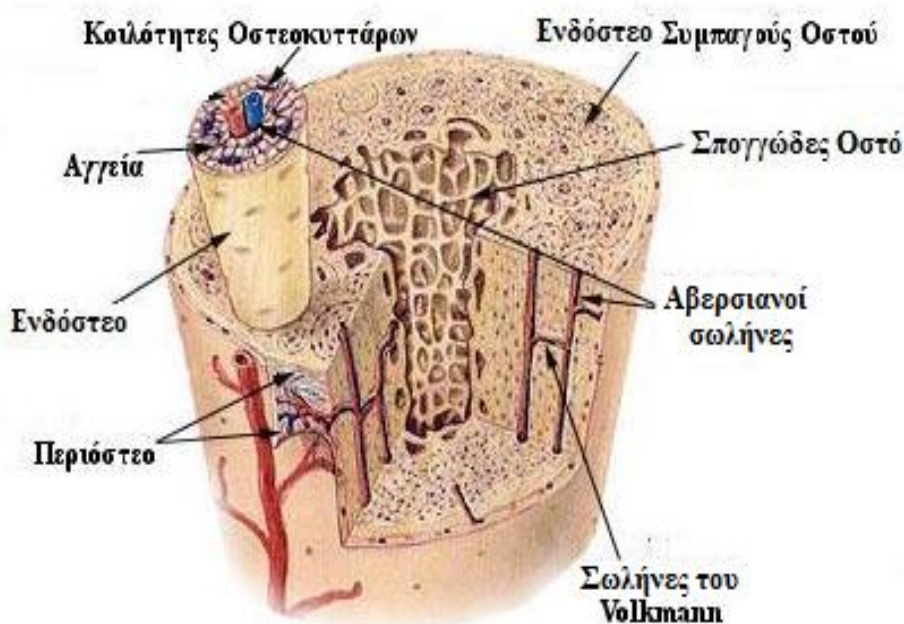
Δομικά το οστό είναι μια πολύπλοκη, πολυεπίπεδη κατασκευή, (Εικόνα 1.1) που παρέχει τα απαραίτητα θρεπτικά και κυτταρικά συστατικά για την αναδόμησή του. Στη δομή αυτή οφείλονται τόσο η μηχανική του αντοχή, όσο και η σκληρότητά του [94]. Η μακροσκοπική δομή έχει ήδη αναφερθεί, γι' αυτό παρακάτω γίνεται ιδιαίτερη αναφορά στις άλλες δομές.



Εικόνα 1.1 Ιεραρχική δομή του οστού: **α)** Μακροσκοπικά, **β)** Μικροσκοπικά, **γ)** Νανοδομή [102].

1.1.2.1 ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΔΟΜΗ

Σε μικροσκοπική κλίμακα η επιφάνεια του οστού διαιρείται σε δύο περιοχές, μια εξωτερική και μια εσωτερική. Η εξωτερική περιοχή αποτελείται από πυκνό συνδετικό ιστό που διατηρεί την οστεογεννητική του ικανότητα και ονομάζεται περίοστεο. Η εσωτερική περιοχή καλείται ενδόστεο και περιλαμβάνει όλες τις δομές της θεμέλιας ουσίας που περιγράφονται παρακάτω (Εικόνα 1.2) [134].



Εικόνα 1.2 Εγκάρσια τομή μεγάλου μήκους συμπαγούς οστού [51].

Στα οστά μεγάλου μήκους (Εικόνα 1.2), παρατηρώντας την εγκάρσια τομή του ενδόστεου απαντώνται ομόκεντρες κυκλικές δομές που ονομάζονται Αβερσιανά συστήματα. Στο εσωτερικό των δομών αυτών διέρχονται αγγεία, οι Αβερσιανοί σωλήνες. Επιπλέον, μέσα στα Αβερσιανά συστήματα υπάρχουν τριχοειδή, αρτηρίδια και φλεβίδια. Τα Αβερσιανά συστήματα επικοινωνούν μεταξύ τους καθώς και με το μυελό των οστών με κάθετους προς αυτά σωλήνες, τους σωλήνες Volkman (Εικόνα 1.2). Παρατηρούνται ακόμα, μικρές κοιλότητες που περιέχουν κύτταρα του οστού απαραίτητα για την ανάπτυξη και αναδόμησή του. Από αυτές τις κοιλότητες εξέρχονται μικροί σωληνίσκοι που ενώνουν τόσο τις κοιλότητες αφ' ενός μεν μεταξύ τους και αφ' ετέρου με τους Αβερσιανούς

σωλήνες. Με αυτόν τον τρόπο το οστό καταφέρνει να τρέφεται. Επίσης, ανάμεσα στα Αβερσιανά συστήματα υπάρχουν τμήματα οστού με ζωνοειδή διάταξη και ονομάζονται ενδιάμεσα συστήματα. Αυτά δεν έχουν πλήρως ανεπτυγμένους ή δεν έχουν καθόλου Αβερσιανούς σωλήνες και ξεχωρίζουν από τα Αβερσιανά συστήματα με εμφανείς γραμμές συγκόλλησης. Τέλος στην έξω και έσω επιφάνεια του ενδόστεου υπάρχουν επιμήκεις δεσμίδες οστίτη ιστού [57], [76].

Ο σπογγώδης οστίτης ιστός επειδή αποτελείται από λεπτές δοκίδες δεν έχει πλήρως ανεπτυγμένα Αβερσιανά συστήματα αλλά τρέφεται απευθείας από το μυελό των οστών μέσω μικρών αγγείων. Για το λόγο αυτό, το ενδόστεο αναδομείται πιο γρήγορα και εύκολα στην επιφάνεια του σπογγώδους οστού από ό,τι στου συμπαγούς [134].

1.1.2.2 ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΔΟΜΗ

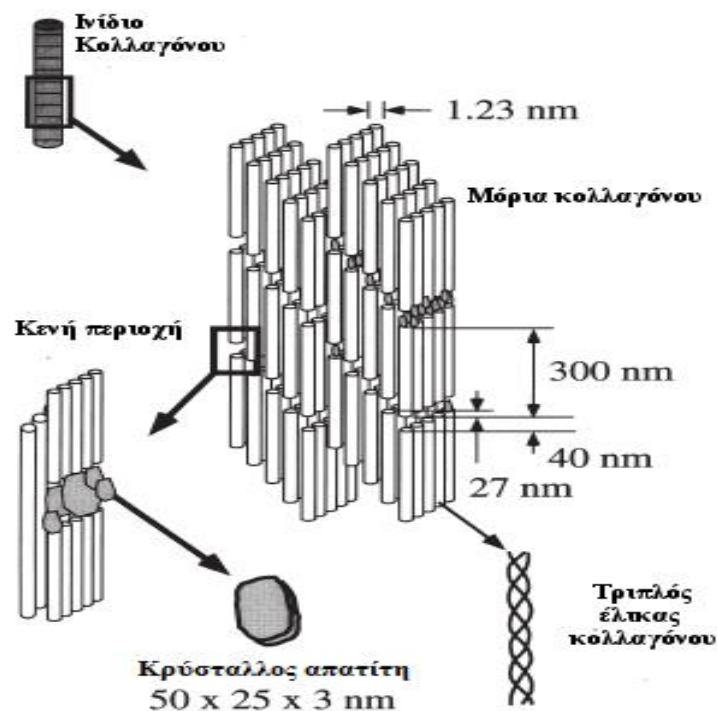
Σε κυτταρικό επίπεδο τα οστά αποτελούνται από τα οστεοκύτταρα, τα οποία συντελούν στην αναδόμηση και αποκατάσταση του οστού. Στην ουσία πρόκειται για το ίδιο κύτταρο το οποίο αλλάζει μορφή και λειτουργία ανάλογα με τις ανάγκες του οστού. Έτσι εμφανίζονται τρεις τύποι κυττάρων:

- 1) Οι οστεοβλάστες: συνθέτουν τον οστίτη ιστό και συναντώνται εκεί όπου δημιουργείται οστό. Ρόλος τους είναι να συνθέτουν το οργανικό τμήμα της θεμέλιας ουσίας. Βρίσκονται δε στην επιφάνεια των οστικών δοκίδων διατεταγμένα το ένα δίπλα στο άλλο, ως «τείχος».
- 2) Οι οστεοκλάστες: καταστρέφουν και απορροφούν το οστό. Πρόκειται για πολύ μεγάλα κύτταρα που βρίσκονται σε επαφή με το οστό. Εκκρίνουν ένζυμα τα οποία διαλύουν τη θεμέλια ουσία και απελευθερώνουν στην κυκλοφορία ασβέστιο και φώσφορο που είναι τα συστατικά της θεμέλιας ουσίας.
- 3) Τα οστεοκύτταρα: προέρχονται από οστεοβλάστες οι οποίοι έχουν εγκλωβιστεί στο ενδόστεο. Συμμετέχουν στη μεταβολική επεξεργασία του οστού, αλλά και ρυθμίζουν την πυκνότητα των ιόντων από το αίμα στη θεμέλια ουσία και αντίστροφα. Τέλος είναι δυνατό να μετατραπούν σε οστεοκλάστες όταν απαιτείται η καταστροφή του οστού [76].

1.1.2.3 ΝΑΝΟΔΟΜΗ

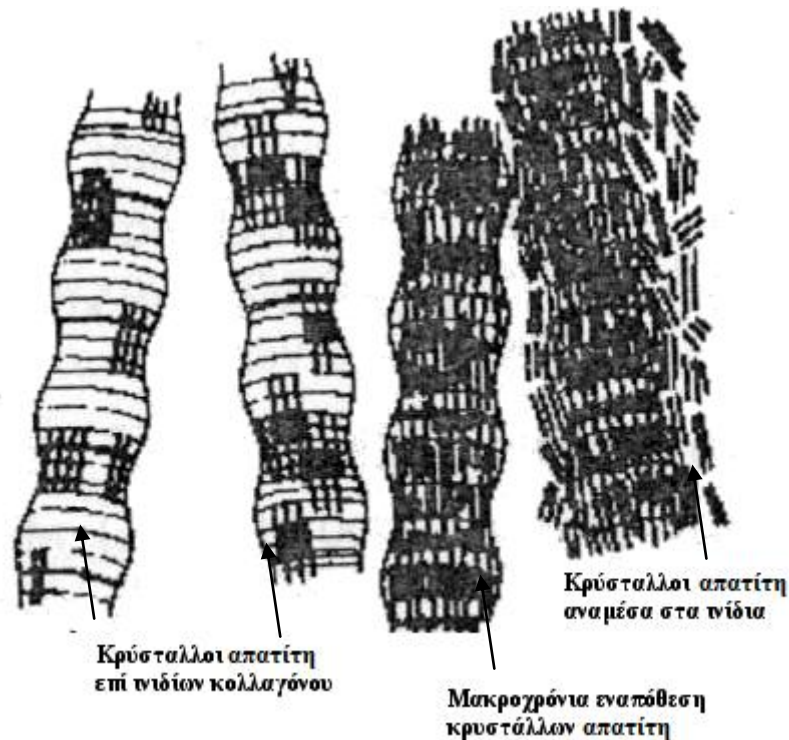
Η βασική βιοχημική σύσταση του οστού αποτελείται από ανόργανη ύλη, οργανική και ύδωρ (65%, 25% και 10% αντίστοιχα, κατά βάρος οστικής μάζας) [94]. Αν με κατάλληλη χημική διεργασία αφαιρεθεί από το οστό η ανόργανη ύλη, τότε το οστό θα είναι μαλακό και εύκαμπτο. Αντίθετα αν αφαιρεθεί η οργανική ύλη, παρόλο που το οστό θα είναι σκληρό, είναι ιδιαίτερα εύθραυστο.

Το οργανικό μέρος αποτελείται κατά 90% από μόρια κολλαγόνου κυρίως τύπου I. Τα μόρια αυτά είναι πολυπεπτιδικές αλυσίδες οι οποίες σχηματίζουν δομή τριπλής έλικας. Το σχήμα τους μοιάζει με ράβδο η οποία έχει καθορισμένο μήκος και διάμετρο που εξαρτάται από τον τύπο του κολλαγόνου. Γενικά τα μόρια κολλαγόνου έχουν μήκος περίπου 300 nm με διάμετρο περίπου 1,23 nm [102]. Τοποθετούνται μέσα στο ινίδιο το ένα δίπλα στο άλλο (αφήνοντας έναν κενό χώρο περίπου 40 nm), σε διαδοχικές σειρές, σε παράλληλα επίπεδα αλλά μετατοπισμένα μεταξύ τους κατά 234 αμινοξέα. Ο τρόπος διάταξής τους έχει σαν συνέπεια η δομή των ινιδίων να εμφανίζει μια περιοδικότητα κατά μέσο όρο 67 nm (Εικόνα 1.3).



Εικόνα 1.3 Σχηματικό διάγραμμα της δομής των ινιδίων κολλαγόνου, των μορίων κολλαγόνου και του κρυσταλλικού απατίτη [102].

Το ανόργανο υλικό έχει κρυσταλλική δομή με όχι πλήρως καθορισμένη στοιχειομετρία. Αποτελείται κυρίως από ασβέστιο και φωσφορικές ρίζες, ονομάζεται δε απατίτης. Η μελέτη του απατίτη θα γίνει στο επόμενο κεφάλαιο. Οι κρύσταλλοι αυτοί έχουν σχήμα λεπτών πλακών συγκεκριμένων διαστάσεων (μήκους 30 – 50 nm, πλάτους 15 – 30 nm και πάχους 3 – 10 nm) με εξαγωνική συμμετρία [139]. Μερικοί είναι τοποθετημένοι στην κενή περιοχή μεταξύ των μορίων κολλαγόνου και άλλοι είναι προσκολλημένοι στην επιφάνεια των ινιδίων κολλαγόνου και μέσα στην τριπλή έλικα του μορίου του κολλαγόνου [140]. Τα υπόλοιπα ανόργανα άλατα (Κεφάλαιο 1.3) αλλά και ελεύθερα ιόντα προσροφούνται στην επιφάνεια των κρυστάλλων απατίτη. Με το πέρασμα του χρόνου όλο και περισσότεροι κρύσταλλοι εναποτίθενται στην επιφάνεια των ινιδίων κολλαγόνου με αποτέλεσμα την ασβεστοποίησή τους (Εικόνα 1.4). Μάλιστα έρευνες έχουν δείξει ότι τα οστά γίνονται περισσότερο κρυσταλλικά με την ηλικία [96] και μάλιστα στα συμπαγή οστά η κρυσταλλικότητα αυξάνεται στο περίοστεο, ενώ στα σπογγώδη στο εξωτερικό μέρος των οστικών δοκίδων.



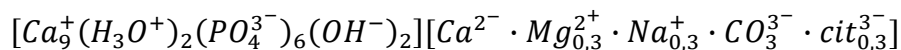
Εικόνα 1.4 Σταδιακή επικάλυψη κρυστάλλων απατίτη μέχρι την πλήρη ασβεστοποίησή τους (δεξιά) [40].

Το τρίτο συστατικό του οστού είναι το ύδωρ. Η παρουσία του ή η απουσία του αλλάζει της μηχανικές ιδιότητες του οστού χωρίς όμως να έχει διευκρινιστεί πλήρως ο ρόλος του [140]. Αποτελεί, επίσης, μια αποθήκη πολλών ιόντων τα οποία συμμετέχουν στο μεταβολισμό του οστού. Έχει διαπιστωθεί, ότι ύδωρ υπάρχει τόσο στους ιστούς του οστού όσο και δεσμευμένο ανάμεσα στο ανόργανο υλικό. Το βάρος του ανά όγκο οστού ποικίλλει. Έτσι, τα συμπαγή οστά μεγάλου μήκους έχουν μικρότερη ποσότητα ύδατος από ό,τι τα σπογγώδη. Με την πάροδο της ηλικίας η ποσότητα ύδατος στα οστά μειώνεται ως αποτέλεσμα της ασβεστοποίησής τους. Επιπλέον, η ποσότητα εξαρτάται από το φύλο και τις παθολογικές καταστάσεις του οστού (οστεοπενία, οστεομαλακία, οστεοπόρωση) [123].

1.1.3. ΥΔΡΟΞΥΑΠΑΤΙΤΗΣ – ΑΝΟΡΓΑΝΗ ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ

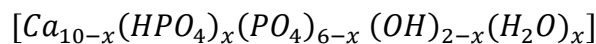
Το οστό λειτουργεί ως η κύρια αποθήκη ιόντων του οργανισμού. Εξαιτίας λοιπόν αυτού του ρόλου του αλλά και της αντοχής του, η ανόργανη δομή του αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης από το 1894. Παρόλα αυτά, η ακριβής στοιχειομετρική σύσταση του ανόργανου μέρους του οστού συνεχίζει να αποτελεί αντικείμενο έρευνας.

Όπως προαναφέρθηκε, οι ανόργανοι κρύσταλλοι του οστού έχουν ως βασικό συστατικό το ασβέστιο (Ca) και το φώσφορο (P), η δε χημική ένωση που σχηματίζουν ονομάζεται απατίτης. Ο λόγος για τον οποίο φέρει αυτή την ονομασία είναι ότι απατά ή συγχέει ως προς την ακριβή χημική του σύσταση. Έτσι, κανείς δεν μπορεί δογματικά να δώσει την ακριβή φύση του ανόργανου υλικού του οστού. Γενικά, η ανόργανη χημική σύσταση του οστού μπορεί να γραφεί:



δηλαδή, αποτελείται από τον απατίτη που μπορεί να έχει επιπλέον ιόντα Ca^{2+} , PO_4^{3-} και OH^- αλλά και ιόντα CO_3^{3-} , σε λιγότερη ποσότητα Mg^+ , Na^+ , K^+ και μερικά ακόμα ιόντα, όπως τα κιτρικά (citrate) [134].

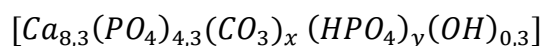
Έχει διαπιστωθεί ότι το μεγαλύτερο μέρος του ανόργανου υλικού του οστού προέρχεται από κρυστάλλους απατίτη που ονομάζεται υδροξυαπατίτης (hydroxyapatite, HA). Η συνήθης μορφή του βιολογικού υδροξυαπατίτη ή αλλιώς μη – στοιχειομετρικού βιολογικού απατίτη είναι:



με το x να παίρνει ακέραιες τιμές μεταξύ του 0 και 2. Υπό αυτή τη μορφή λαμβάνεται υπόψη και το ύδωρ που μπορεί να είναι δεσμευμένο στην κρυσταλλική δομή του απατίτη [33]. Πιο συχνά όμως ο υδροξυαπατίτης γράφεται με την στοιχειομετρική του μορφή ως $Ca_5(PO_4)_3(OH)$ ή ως $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ που προκύπτει από τη μη στοιχειομετρική για $x = 0$. Όπως γίνεται φανερό, ο λόγος για τον οποίο ονομάζεται υδροξυαπατίτης είναι η παρουσία του ιόντος OH^- στο μόριό του [101]. Σύμφωνα με έρευνες [83], η παρουσία του OH^- στα οστά, ως αυτόνομου ιόντος, δεν είναι ξεκάθαρη αλλά οφείλεται στην ύπαρξη της

φωσφορικής ρίζας HPO_4^{2-} . Ο καθαρός υδροξυαπατίτης είναι λευκός μπορεί όμως να έχει και γκρι, καφέ ή κίτρινο χρώμα ανάλογα με τον τύπο του απατίτη, η δε πυκνότητά του είναι $3,156 \text{ g/cm}^3$. Στον κρύσταλλο μπορεί να υπάρχουν ή να συνυπάρχουν μαζί με τον υδροξυαπατίτη και άλλες μορφές απατίτη όπως το οκταφωσφορικό ασβέστιο (OCP), το διένυδρο φωσφορικό ασβέστιο και το άμορφο φωσφορικό ασβέστιο [53], [134].

Επιπλέον, σύμφωνα με μελέτες που έχουν γίνει με τη μέθοδο της περίθλασης ακτίνων – X (X – Ray Diffraction, XRD) και της υπέρυθρης φασματοσκοπίας (Fourier Transform Infrared, FTIR) για τον HA σε συμπαγή οστά ζώων, παρατηρήθηκε ότι στο κρυσταλλικό πλέγμα περιλαμβάνονται ιόντα CO_3^{2-} και HPO_4^{2-} [73]. Με την αύξηση της ηλικίας παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης ιόντων CO_3^{2-} τα οποία με τη σειρά τους αντικαθιστούν τα ιόντα HPO_4^{2-} τα οποία και μειώνονται. Για το λόγο αυτό ένας πλήρης τύπος περιγραφής της μορφής του HA που λαμβάνει υπόψη και τα ιόντα αυτά είναι:



με το y να μειώνεται και το x να αυξάνεται με την αύξηση της ηλικίας και το άθροισμα των δύο να παραμένει σταθερό, $x + y = 1,7$ [77].

Από μελέτες των Neuman και Neuman (1958) [91], [92] του κρυσταλλικού πλέγματος του HA, καθώς και της δέσμευσης σε αυτό ανιόντων και κατιόντων, διαπιστώθηκε ότι τα ιόντα βρίσκονται σε ένυδρη μορφή. Αυτό οφείλεται στην απορρόφηση των ιόντων από το εξωκυτταρικό υγρό η οποία συμβάλλει στη δημιουργία ένυδρων κυψελών. Έτσι, στον κρύσταλλο υπάρχουν τρεις περιοχές: α) η εσωτερική β) η επιφανειακή και γ) οι ένυδρες κυψέλες όπου μπορεί να γίνει ανταλλαγή ιόντων. Στον παρακάτω πίνακα αποτυπώνεται συνοπτικά η διάχυση των ιόντων στον κρύσταλλο, καθώς και αντικαταστάσεις ιόντων.

Κεφάλαιο 1 – Εισαγωγή

Διάχυση ιόντων στον κρύσταλλο						
Ιόντα	Ένυδρες κυψέλες		Επιφάνεια κρυστάλλου	Εσωτερικό κρυστάλλου	Αντικατάσταση ιόντων	
	Υδωρ	Δεσμευμένα ιόντα				
K ⁺	+	-	-	-	-	
Na ⁺	+	-	+	-	} Ca ⁺²	
Mg ⁺²	+	+	-	-		
UO ₂ ⁺²	+	+	-	-		
Sr ⁺²	+	+	+	+		
Ra ⁺²	+	+	+	+		
⁴⁵ Ca ⁺²	+	+	+	+		
Cl ⁻	+	-	-	-	-	
Citrate ⁻³	+	+	-	-	} PO ₄ ⁻³	
CO ₃ ⁻²	+	+	+	-		
³² PO ₄ ⁻³	+	+	+	+		
F ⁻	+	-	+	+	OH ⁻	

Πίνακας 1.1 Συνοπτική παρουσίαση των ιόντων στον κρύσταλλο του ΗΑ όπως καταγράφηκε από τους Neumann και Neumann (1958) [134].

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι ο αριθμός των ιόντων που υπάρχουν στο οστό είναι σημαντικός. Πολλά από αυτά προσροφώνται στην επιφάνεια του κρυστάλλου ή απορροφούνται από αυτό, αλλά και ένας μεγάλος αριθμός αυτών αντικαθιστούν τα ιόντα του πλέγματος. Έτσι το φθόριο (F⁻) μπορεί να αντικαταστήσει τα ιόντα υδροξυλίου (OH⁻) του πλέγματος. Ο λόγος είναι ότι τόσο το F⁻ όσο το OH⁻ έχουν περίπου το ίδιο μέγεθος αλλά και το ίδιο φορτίο. Σε χαμηλή συγκέντρωση το F⁻ προστατεύει τον οργανισμό, αντίθετα όμως σε υψηλές συγκεντρώσεις προκαλεί παθήσεις όπως τη νόσο Paget ή οστεοπόρωση.

Τόσο το κάλιο (K⁺) όσο και το νάτριο (Na⁺) αποθηκεύονται στα οστά, μάλιστα το Na⁺ υπάρχει και στην επιφάνεια των κρυστάλλων. Το μαγνήσιο (Mg²⁺) είναι σημαντικό για τον οργανισμό και συνυφασμένο με τη ζωή. Πάνω από το μισό της συγκέντρωσης του Mg²⁺ βρίσκεται στον σκελετό και συμμετέχει τόσο στην αιμόσταση, όσο και στην απορρόφηση του Ca²⁺. Το μεγαλύτερο μέρος του Mg²⁺ βρίσκεται στην επιφάνεια των κρυστάλλων ή αντικαθιστά το Ca²⁺ στο κρυσταλλικό πλέγμα. Έτσι η έλλειψή του ή η

υψηλή συγκέντρωσή του στον οργανισμό δημιουργεί παθήσεις και σύνδρομα όπως η οστεοπόρωση, η υπερμαγνησεμία ή η υπομαγνησεμία [122].

Τέλος, στα οστά βρίσκονται και παίζουν σημαντικό ρόλο μέσω των ενζύμων αλλά και των κυττάρων των οστών και των χόνδρων, διάφορα μέταλλα σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις όπως Fe^{2+} , Ni^{2+} , Al^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} κ.α. Το στρόντιο (Sr), επειδή ακολουθεί στον περιοδικό πίνακα το Ca^{2+} και μοιάζει αρκετά με αυτό μπορεί να το αντικαταστήσει, όμως εξαιτίας των ραδιενεργών ισοτόπων του καθίσταται επικίνδυνο για τον οργανισμό [134].

1.1.4. Ο ΛΟΓΟΣ Ca/P

Η βασική παράμετρος που συναντάται στη βιβλιογραφία για τη μελέτη των οστών ως προς την ποιότητά τους, είναι η οστική τους πυκνότητα (Bone Mineral Density, BMD). Αλλαγές όμως της πυκνότητας, δε σημαίνουν απαραίτητα και αλλαγές στη συγκέντρωση του Ca ή του P ή και των δύο. Ιδιαίτερα σε αλλαγές στη συγκέντρωση του Ca οφείλονται πολλές παθήσεις, όπως η οστεοπόρωση, αλλά και διαφοροποιήσεις στη μηχανική αντοχή του οστού που οδηγεί στο θρυμματισμό του. Καθώς όμως κατά τη δημιουργία του οστού ο P συμβάλλει στην απορρόφηση του Ca, τα δύο αυτά χημικά στοιχεία είναι άρρηκτα συνδεδεμένα μεταξύ τους, καθώς και με τη δομή του οστού. Η κύρια μέθοδος μελέτης της οστικής πυκνότητας είναι η φασματοσκοπία απορρόφησης διπλής δέσμης ακτίνων – X (DXA), που απαιτεί ζωντανό οργανισμό (in vivo μέτρηση) και όπως έχει αποδειχτεί δεν δίνει ιδιαίτερα ακριβή αποτελέσματα ως προς την ποιότητα του οστού [15]. Έτσι γίνεται φανερό ότι μια χρήσιμη παράμετρος για τις αλλαγές στο οστό, ποσοτικές και ποιοτικές, που μπορεί να προέρθουν από διάφορες αιτίες, είναι η μελέτη του λόγου Ca/P.

Όπως προαναφέρθηκε, η κυρίαρχη ανόργανη χημική ένωση του Ca και του P στο οστό είναι ο HA. Στη στοιχειομετρική μορφή του HA ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) η αναλογία Ca και P είναι 1,67. Όμως στο οστό δεν υπάρχει μόνο ο HA. Συνεπώς λόγω της παρουσίας των επιπλέον συστατικών του οστού η σύστασή του σε Ca και P γίνεται 39,9% και 18,5% αντίστοιχα, με αποτέλεσμα ο λόγος Ca/P να είναι ίσος κατά μέσο όρο με 2,16. Αυτό δε σημαίνει ότι ο λόγος είναι πάντα ίσος με αυτή την τιμή, αλλά ποικίλλει με το είδος του

οστού (σπογγώδες ή συμπαγές), την ηλικία, την περιοχή που βρίσκεται το οστό (βραχίονας, μηρός, κνήμη) αλλά και την κατάσταση του οστού (υγιή ή παθολογική) [149].

Μελέτες του λόγου Ca/P σε υγιή ανθρώπινα συμπαγή μηριαία οστά, σε οστά λεκάνης και σε πορώδη οστά, έχουν δείξει ότι ο λόγος δεν αλλάζει σημαντικά με την ηλικία μέχρι τα 55 έτη. Οι ίδιες μελέτες ισχυρίζονται ότι ο λόγος Ca/P δεν επηρεάζεται από το φύλο [148], [131], [149]. Οι Simmons Jr. E. D. et al (1991) [113], σε μελέτες σε συμπαγή μηριαία οστά υγιών ανθρώπων, υποστηρίζουν ότι στο λόγο Ca/P δεν υπάρχουν αλλαγές μέχρι τα 85 έτη. Ο δε Strandh J. (1960) [117], μελετώντας τις δομικές αλλαγές του λόγου στο ίδιο συμπαγές μηριαίο ανθρώπινο οστό, συμπέρανε ότι δεν επηρεάζεται σημαντικά από τη δομή.

Έρευνες σε οστά αρουραίων, συσχέτισαν τη διαφορετική δομή των οστών με αλλαγές στο λόγο Ca/P. Σύμφωνα με τις μελέτες αυτές, ο λόγος αλλάζει σημαντικά μεταξύ συμπαγών και πορώδων οστών τόσο κνήμης όσο και μηρού [11]. Επιπλέον, ο Legros R. (1987) [77], σε μελέτη του σε συμπαγή οστά αρουραίων μέχρι 1 έτους, ισχυρίζεται ότι ο λόγος αυξάνεται όσο αυξάνεται η ηλικία. Ο δε Yasumura S. (1993) [147], παρατήρησε ότι ο λόγος Ca/P μειώνεται αισθητά με την ηλικία στην ενδοοστεϊκή περιοχή μηριαίων οστών αρουραίων.

Οι Tzaphlidou M. and Speller R. (2005, 2006) [127], [129] σε μελέτες σε οστά διαφορετικών ζώων, κατέληξαν ότι η διαφορετική χρήση του κάθε μέρους του σώματος από το ζώο είναι αυτή που δημιουργεί διαφορές στο λόγο Ca/P. Έτσι όπως ισχυρίζονται οι διαφορετικές απαιτήσεις για πιέσεις στα πρόσθια και στα οπίσθια άκρα κονίκλων και αρουραίων, είναι η αιτία της διαφορετικής προσαρμογής των οστών και συνεπώς του λόγου Ca/P. Επιπλέον, οι ίδιες έρευνες απέδειξαν ότι η διαφορετική χρήση των οστών από διαφορετικό είδος ζώου επηρεάζει τον ανωτέρω λόγο. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η διαφορετική χρήση των οπίσθιων άκρων μεταξύ αμνών, αρουραίων και κονίκλων όπου τα μεν πρώτα είναι προορισμένα να περπατούν, τα δεύτερα να τρέχουν ενώ τα τελευταία να πηδούν. Στα ίδια συμπεράσματα έχει καταλήξει και ο Dickerson T. W. J. (1961) [28], μελετώντας οστά χοίρων, αρουραίων και πτηνών.

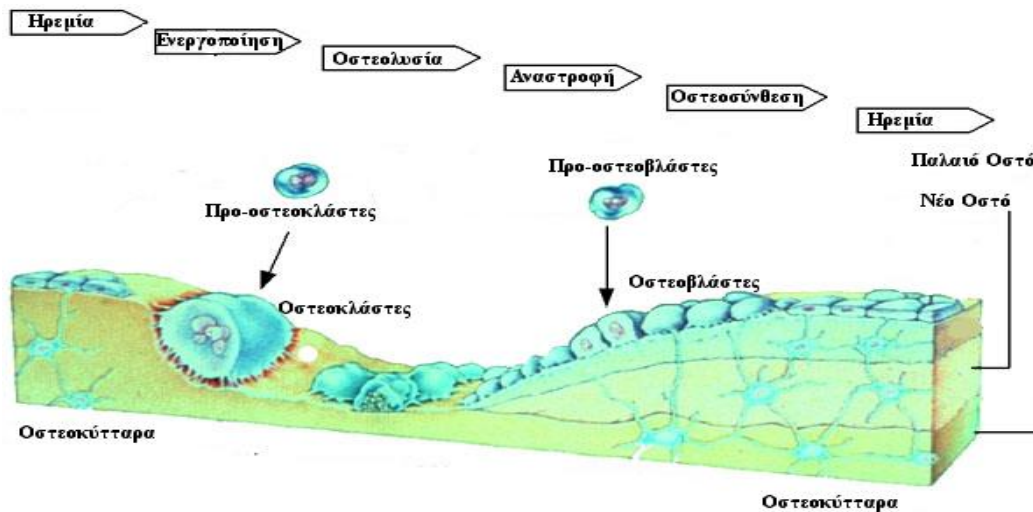
Τέλος ο λόγος Ca/P επηρεάζεται σημαντικά από τις διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Μελέτη σε ανθρώπινα οστά με ατελή οστεογένεση έδειξε ότι ο λόγος Ca/P μειώνεται αρκετά σημαντικά στα παθολογικά οστά σε σύγκριση με τα υγιή [21]. Επιπλέον έρευνες σε οστεοπορωτικά μηριαία οστά αρουραίων αλλά και σε οστεοπορωτικά οστά

κνήμης κονίκλων έδειξαν ότι ο λόγος είναι σημαντικά μικρότερος του αντίστοιχου οστού των υγιών ζώων [34], [89].

1.1.5. ΟΣΤΙΚΗ ΑΝΑΚΑΤΑΣΚΕΥΗ – Ο ΡΟΛΟΣ Ca και P

Το οστό είναι ένας ζωντανός οργανισμός που έχει την ιδιότητα να υφίσταται συνεχή ανακατασκευή καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του. Αυτή η ανακατασκευή, ονομάζεται οστική ανακατασκευή (bone remodeling) και είναι απαραίτητη ώστε το σκελετικό σύστημα να διατηρεί την ολοκληρωμένη του μορφή, αλλά και τα οστά να λειτουργούν ως αποθήκες Ca και P.

Η οστική ανακατασκευή είναι αποτέλεσμα της δράσης των οστεοκλαστών και των οστεοβλαστών, καθώς και της συζευγμένης δράσης τους στην αποκατάσταση μικροτραυματισμών του οστού. Ο κύκλος της οστικής ανακατασκευής περιλαμβάνει μια πολύπλοκη σειρά καθορισμένων βημάτων, που ομαδοποιείται σε πέντε στάδια: α) της ηρεμίας, β) της ενεργοποίησης, γ) της οστεολυσίας, δ) της αναστροφής και ε) της οστεοσύνθεσης. Η σειρά των φάσεων απεικονίζεται στην εικόνα 1.5, όπου κατά την φάση της ενεργοποίησης, οι προ-οστεοκλάστες παράγουν οστεοκλάστες οι οποίοι καταστρέφουν το παλαιό οστό απορροφώντας τη θεμέλια ουσία και έτσι δημιουργούν κοιλότητες (φάση οστεολυσίας). Στη συνέχεια, οι οστεοκλάστες απομακρύνονται (φάση αναστροφής) και τη θέση τους παίρνουν οι οστεοβλάστες, οι οποίοι προσκολλώνται στα τοιχώματα όπου εναποθέτουν νέο οστίτη ιστό (φάση οστεοσύνθεσης).



Εικόνα 1.5 Ο κύκλος της οστικής ανακατασκευής. Τα πέντε στάδια: α) ηρεμία, β) ενεργοποίηση, γ) οστεολυσία, δ) αναστροφή, ε) οστεοσύνθεση.

Κατά τη διάρκεια της οστεολυσίας, οι οστεοκλάστες απορροφούν και διασπούν τη θεμέλια ουσία και τα μέταλλα που παράγονται μεταβαίνουν στο αίμα. Έτσι, το οστό λειτουργεί ως αποθήκη Ca και P, άλλα και ως ρυθμιστής των επιπέδων αυτών στο αίμα. Έχει υπολογιστεί ότι σε κάθε λεπτό της ζωής ενός ενήλικα, ένα άτομο Ca στα τέσσερα του αίματος ανταλλάσσεται με ένα αντίστοιχο του οστού. Οι παράγοντες που ρυθμίζουν τα επίπεδα Ca και P στο αίμα είναι η παραθυρεοειδής ορμόνη (PTH), η βιταμίνη D, η καλσιτοσίνη, η αυξητική ορμόνη και οι γενετικές ορμόνες.

Εάν, λοιπόν, τα επίπεδα του Ca στο αίμα είναι χαμηλά τότε ενεργοποιείται η PTH με αποτέλεσμα τη διέγερση των οστεοκλαστών και την αναστολή της δράσης των οστεοβλαστών με συνέπεια την απελευθέρωση Ca και P στο αίμα. Επιπλέον, στους νεφρούς, η PTH προκαλεί την επαναρρόφηση του Ca και αυξάνει την απέκκριση του P. Στο έντερο, η δράση της PTH αυξάνει τη μεταβολή της βιταμίνης D στην ενεργό μορφή της την D_3 ($1,25(OH)_2D_3$, 1,25-διυδροξυχολεκαλσιφερόλη), η οποία αυξάνει την απορρόφηση Ca και P από το έντερο. Έτσι η βιταμίνη D βοηθάει στην απορρόφηση του Ca, ενώ η PTH ελαττώνει την αποβολή του Ca με ταυτόχρονη αύξηση της αποβολής του P την οποία εμποδίζει η βιταμίνη D. Άρα, τόσο η PTH όσο και η βιταμίνη D, δρουν στα οστά με σκοπό την απελευθέρωση Ca και P και την επαναρρόφηση του Ca με ελάχιστες απώλειες.

Η καλσιτοσίνη δρα όταν τα επίπεδα Ca στο αίμα είναι υψηλά με σκοπό τη μείωση της συγκέντρωσης Ca. Αναστέλλει τη λειτουργία των οστεοκλαστών και συνεπώς την απορρόφηση του οστού. Η δράση της δηλαδή, είναι αντίθετη με αυτή της βιταμίνης D και της PTH.

Τέλος, η αυξητική ορμόνη είναι απαραίτητη για την αύξηση του οστού, χωρίς να έχει άμεση δράση στην οστική απορρόφηση. Ρυθμίζει, όμως, τον οστικό σχηματισμό και συνεπώς, αυξάνει έμμεσα την απορρόφηση του Ca. Οι δε γενετικές ορμόνες έχουν άμεση σχέση με την ανάπτυξη του οστού. Προκαλούν τον κυτταρικό θάνατο των οστεοκλαστών και διεγείρουν την παραγωγή οστού μέσω των οστεοβλαστών.

Γίνεται φανερό λοιπόν ότι τα οστά διαδραματίζουν βασικό ρόλο στα επίπεδα Ca και P στον οργανισμό μέσω της οστικής ανακατασκευής. Έτσι ο φυσιολογικός λόγος Ca/P στα οστά έχει άμεση συνέπεια στον ίδιο λόγο στο αίμα. Οποιαδήποτε διαταραχή των επιπέδων αυτών των στοιχείων στον οργανισμό και των παραγόντων που ελέγχουν την απορρόφηση ή απελευθέρωσή τους από τα οστά, έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία παθολογικών καταστάσεων στα οστά, όπως είναι η οστεοπόρωση, η οστεοπενία και η οστεομαλακία [46], [76], [100].

1.1.6. ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗ

Η οστεοπόρωση είναι η πιο διαδεδομένη μεταβολική νόσος των οστών. Αρχικά, ορίστηκε ως η μακροχρόνια συστηματική απώλεια οστικής μάζας που έχει ως αποτέλεσμα τη χαμηλή οστική πυκνότητα και τη διαταραχή της μικρο – αρχιτεκτονικής δομής του οστού. Συνέπεια αυτών είναι η αραιώση της πυκνότητας του οστού, με αποτέλεσμα το οστό να γίνεται πορώδες αυξάνοντας την ευθραυστότητά του και μειώνοντας τη μηχανική του αντοχή με κίνδυνο κατάγματος. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organization, WHO) το 2001 [144] [145], έδωσε ένα νέο ορισμό για την οστεοπόρωση. Την αναφέρει ως την σκελετική διαταραχή, που χαρακτηρίζεται από την ελάττωση της οστικής αντοχής, η οποία προδιαθέτει τον αυξημένο κίνδυνο κατάγματος. Έτσι η οστική αντοχή συνδυάζει την οστική ποιότητα και πυκνότητα. Ο ορισμός αυτός επικεντρώνεται περισσότερο στην αντοχή του οστού και στον κίνδυνο κατάγματος. Η οστεοπόρωση

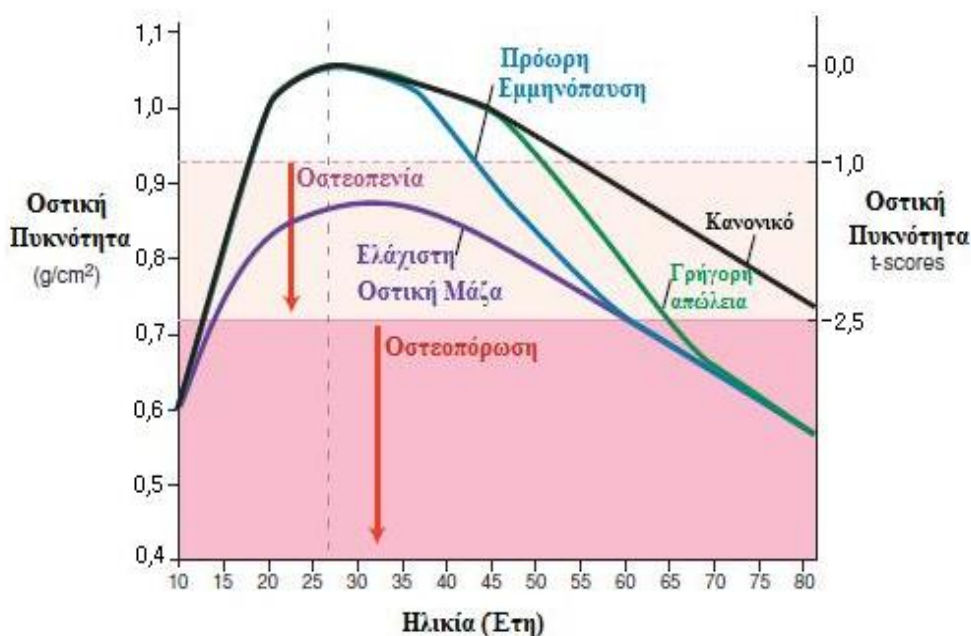
θεωρείται μια «σιωπηλή νόσος», γιατί η οστική απώλεια προηγείται και εξελίσσεται αθόρυβα χρόνια πριν την τελική μείωση της ποιότητας του οστού [54], [59], [60].

Σύμφωνα με μελέτες του WHO πρόκειται για το δεύτερο πιο διαδεδομένο νόσημα του δυτικού κόσμου που προσβάλλει κυρίως γυναίκες της λευκής φυλής. Σε παγκόσμιο επίπεδο προσβάλλει 1 στις 3 γυναίκες ηλικίας 60 – 70 ετών και 2 στις 3 ηλικίας άνω των 80 ετών. Προσβάλλει όμως και άντρες, αλλά με μικρότερη συχνότητα εμφάνισης, 2 με 3 φορές μικρότερη από αυτή των γυναικών δηλαδή, 1 στους 5 άντρες για ηλικία άνω των 50 ετών. Στις ΗΠΑ εκτιμάται ότι 8 εκατομμύρια γυναίκες άνω των 50 ετών πάσχουν από οστεοπόρωση, ενώ 22 εκατομμύρια έχουν χαμηλή οστική πυκνότητα. Εκτιμάται μάλιστα, ότι το 43% των γυναικών και το 13% των αντρών άνω των 50 ετών θα πάθουν οστεοπορωτικό κάταγμα κατά τη διάρκεια της ζωής τους. Αν όμως αναφερθούμε στη θνησιμότητα λόγω των καταγμάτων, το ποσοστό αυξάνεται δραματικά. Στην Ελλάδα, σύμφωνα με μελέτες, 1 στις 2 γυναίκες και 1 στους 4 άντρες άνω των 50 ετών θα εκδηλώσει ένα τουλάχιστον κάταγμα συσχετιζόμενο με την οστεοπόρωση κατά τη διάρκεια της υπόλοιπης ζωής του. Σήμερα υπολογίζεται ότι στην Ελλάδα 500.000 γυναίκες και 50.000 άντρες πάσχουν από βαριά οστεοπόρωση, ενώ σύμφωνα με έρευνα του 2003 το 35% των γυναικών είναι ασθενείς. Το κόστος δε για την αντιμετώπιση της νόσου και των καταγμάτων κινείται σε δυσθεώρητα επίπεδα και μόνο το 2001 υπολογίστηκε για τις ΗΠΑ στα 17 δισεκατομμύρια δολάρια. Σύμφωνα λοιπόν με αυτά η μελέτη της οστεοπόρωσης αλλά και η έγκαιρη διάγνωσή της είναι επιτακτική, αφού ως ασθένεια έχει επιπτώσεις, τόσο σε οικονομικό, όσο και σε κοινωνικό επίπεδο [59], [116].

Η οστεοπόρωση διακρίνεται σε δυο κατηγορίες: την ιδιοπαθή και τη δευτεροπαθή. Η ιδιοπαθής είναι η συχνότερα εμφανιζόμενη οστεοπόρωση και διακρίνεται σε δύο τύπους: α) τον τύπο I ή μεταεμμηνόπαυσιακή οστεοπόρωση και β) τον τύπο II ή γεροντική οστεοπόρωση. Ο πρώτος τύπος, όπως φανερώνει και η ονομασία του, εμφανίζεται στις γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση, όπου παρατηρείται ραγδαία μείωση των οιστρογόνων. Τα οιστρογόνα είναι οι γενετικές ορμόνες που προστατεύουν τον σκελετό και η απώλειά τους έχει ως συνέπεια τη μείωση της οστικής μάζας. Ο τύπος αυτός της οστεοπόρωσης χαρακτηρίζεται από έλλειμμα σε σπογγώδες οστό των σπονδύλων και συνοδεύεται από συντριπτικά κατάγματα. Ο δεύτερος τύπος παρουσιάζεται σε άτομα και των δύο φύλων άνω των 70 ετών. Οφείλεται σε διαταραχή των ορμονών που ελέγχουν την οστική ανακατασκευή με αποτέλεσμα το ισοζύγιο οστεολυσίας και οστεοσύνθεσης να είναι

αρνητικό. Σε αυτή την περίπτωση της οστεοπόρωσης, υπάρχει απώλεια οστικής μάζας τόσο στο σπογγώδες όσο και στο συμπαγές οστό. Έτσι εμφανίζονται κυρίως κατάγματα στο μηριαίο οστό, περισσότερο δε στον αυχένα του μηρού. Η δευτεροπαθής οστεοπόρωση οφείλεται κυρίως στον τρόπο ζωής (κάπνισμα, αλκοολισμός, έλλειψη βιταμίνης D, κ.α.) αλλά και σε χρόνιες νόσους όπως νόσοι του παραθυρεοειδή, των νεφρών, κ.α. [32], [54], [116].

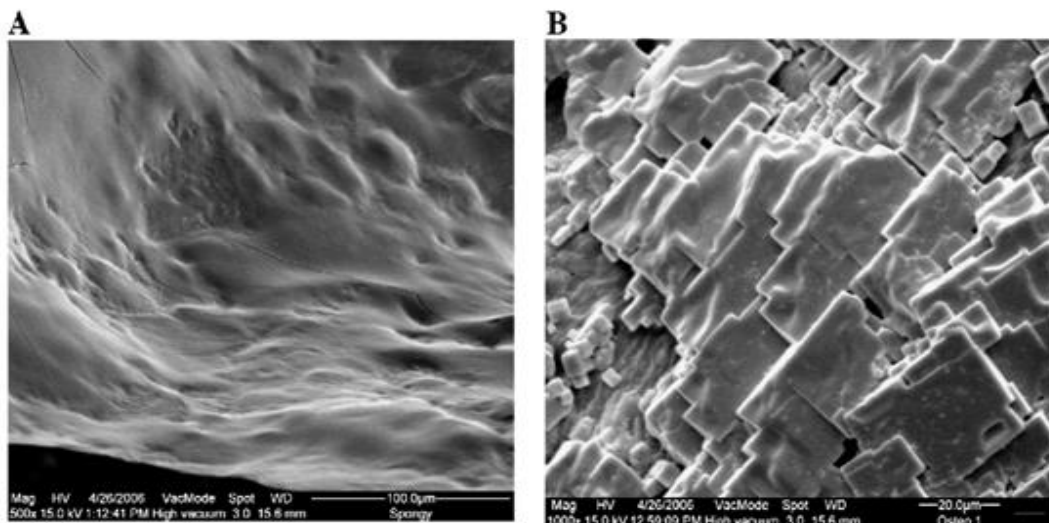
Η μελέτη της απώλειας της οστικής πυκνότητας ώστε να γίνει διάγνωση, γίνεται με μη επεμβατικές μεθόδους. Κυρίως η οστική πυκνότητα υπολογίζεται με την απορρόφηση ακτίνων – X. Η οστική πυκνότητα όμως από μόνη της, δεν μπορεί να δώσει διάγνωση ως προς την οστεοπόρωση, αφού πρέπει να συγκριθεί και με την ηλικία του εξεταζομένου. Έτσι έχει ορισθεί ένας παράγοντας που καθορίζει αν ένα άτομο είναι οστεοπορωτικό ή μη ο οποίος ονομάζεται t – score και είναι η σύγκριση της οστικής πυκνότητας του εξεταζομένου με τη μέση τιμή της οστικής πυκνότητας ενός ενήλικα (Εικόνα 1.6). Ο WHO έχει ορίσει με αυτό τον τρόπο, ότι όταν η τιμή αυτή είναι μικρότερη του -2,5 το εξεταζόμενο άτομο είναι οστεοπορωτικό ενώ αν είναι μεταξύ -1 και -2,5 το άτομο εμφανίζει οστεοπενία [18], [69], [136].



Εικόνα 1.6 Οι αλλαγές στην οστική πυκνότητα των γυναικών ανάλογα με την ηλικία [18].

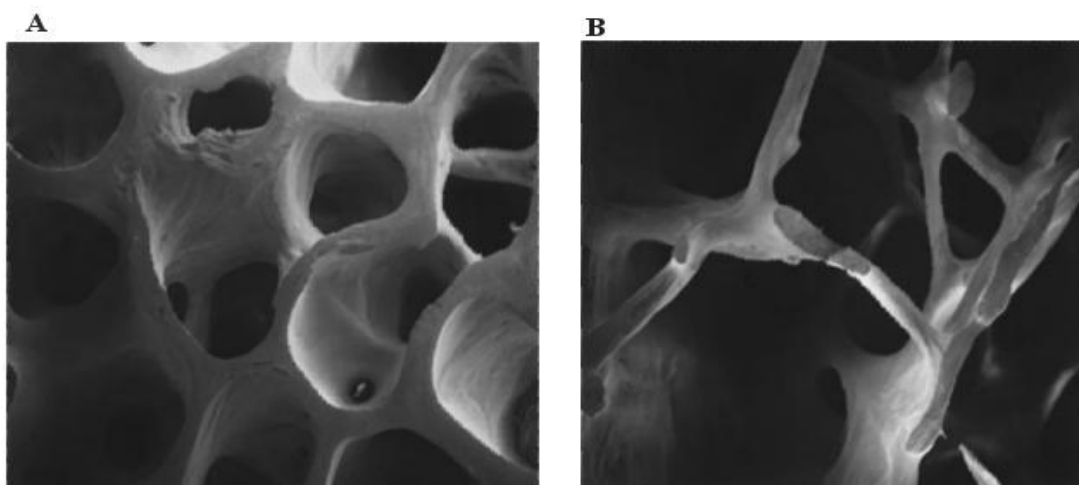
Όπως ήδη αναφέρθηκε, χρησιμοποιώντας μόνο την οστική πυκνότητα ως μέσω διάγνωσης και κατάταξης των οστών σε παθογόνα ή μη, δεν οδηγεί πάντα σε αξιόπιστα αποτελέσματα. Συχνά υπάρχει μια σημαντική αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των τιμών πυκνότητας για τα υγιή και τα οστεοπορωτικά οστά. Επιπλέον, τα κατάγματα δεν οφείλονται μόνο στην απώλεια της οστικής πυκνότητας με την ηλικία, αλλά και στις διαφοροποιήσεις στην ποιότητα του οστού, όπως αλλαγές στη δομή του κολλαγόνου αλλά και στην ανόργανη σύνθεση του οστού και των κρυστάλλων. Έτσι ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη της ποιότητας του οστού και πώς αυτή σχετίζεται με τη φυσιολογία του [106], [107].

Εμφανείς είναι οι αλλαγές κατά την οστεοπόρωση τόσο στα συμπαγή όσο και στα σπογγώδη οστά όπως αυτές έχουν παρατηρηθεί από πολλούς ερευνητές [27], [108] χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές. Με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (Scanning Electron Microscope – SEM) (Εικόνα 1.7A,B) απεικονίζονται οι αλλαγές, σε συμπαγές οστό του άνω μέρους ανθρώπινου μηρού, όπου κατά την οστεοπορωτική κατάσταση η δομή των κρυστάλλων εμφανίζει ασυνέχεια [108]. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι στα συμπαγή οστεοπορωτικά οστά, αυξάνεται η κρυσταλλικότητα του ανόργανου μέρους με αποτέλεσμα αύξηση της ασβεστοποίησής τους ενώ ο βαθμός ασβεστοποίησης του άμορφου μέρους μειώνεται [8].



Εικόνα 1.7 (A) Εικόνα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM) συμπαγούς υγιούς οστού όπου εμφανίζεται η συνεχής δομή των κρυστάλλων. (B) Εικόνα SEM οστεοπορωτικού συμπαγούς οστού όπου φαίνεται η ασυνεχής δομή των κρυστάλλων [108].

Η σπογγώδης δομή του οστού, όπως εμφανίζεται στο SEM (Εικόνα 1.8A,B), κατά την οστεοπόρωση, παρουσιάζει σημαντικό έλλειμμα οστίτη ιστού στις οστικές δοκίδες με αποτέλεσμα τη δομική ασυνέχεια του οστού και την εμφάνιση καταγμάτων [27]. Γενικά, η κρυσταλλικότητα στα οστεοπορωτικά οστά είναι αυξημένη σε σχέση με την ηλικία περισσότερο από ό,τι στα υγιή. Στα οστεοπορωτικά οστά παρατηρείται επίσης έλλειμμα οστίτη ιστού.



Εικόνα 1.8 (A) Εικόνα SEM χαμηλής ενέργειας από σπογγώδες οστό λεκάνης υγιούς γυναίκας. (B) Εικόνα SEM οστεοπορωτικού σπογγώδους οστού λεκάνης γυναίκας όπου παρατηρείται το έλλειμμα οστίτη ιστού σε σχέση με το υγιές και την εμφάνιση κατάγματος [27].

Μελέτες με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης (TEM) έδειξαν ότι ενώ στα υγιή οστά οι ίνες κολλαγόνου βρίσκονται σε παράλληλα επίπεδα, όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 1.2.3, στα οστεοπορωτικά οστά έχουν τυχαία εναπόθεση. Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι στην οστεοπόρωση η διάμετρος των ινιδίων μειώνεται σε σχέση με τα υγιή οστά και αυτό έχει σαν συνέπεια τη μείωση των μηχανικών αντοχών του οστού και την αύξηση των καταγμάτων [126]. Όσον αφορά τη δομή των κρυστάλλων του HA δεν είναι ξεκάθαρο κατά πόσο το μέγεθός τους επηρεάζεται κατά την οστεοπόρωση. Οι Grynpas M. D. and Holygand D. (1998) [43], μελετώντας ανθρώπινα οστεοπορωτικά οστά με τη χρήση TEM, παρατήρησαν ότι οι κρύσταλλοι έχουν μικρότερο μέγεθος από τα υγιή. Αντίθετα οι Chatterji S. et al. (1981) [24] υποστήριξαν, με βάση τη μελέτη τους σε ανθρώπινα οστεοπορωτικά συμπαγή οστά με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου

σάρωσης (SEM), ότι οι κρύσταλλοι έχουν μεγαλύτερο μέγεθος από ό,τι στα υγιή οστά. Ανάμεσα στις δυο αυτές απόψεις είναι η μελέτη των Rubin M. A. et al. (2003) [105] οι οποίοι με τη χρήση TEM σε σπογγώδη και συμπαγή ανθρώπινα οστά, δεν παρατήρησαν καμία αλλαγή στο μέγεθος των κρυστάλλων του HA μεταξύ των υγιών και παθολογικών οστών. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι Rohanizadeh R. et al. (2000) [104] μελετώντας στο TEM οστεοπορωτικά σπογγώδη οστά επίμυων.

Τέλος, όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 1.1.4, ο λόγος Ca/P στα οστεοπορωτικά οστά, σύμφωνα με πολλές μελέτες [73], [34] μειώνεται σε σύγκριση με τα υγιή και τη μείωση αυτή οι Burnell J. M. et al (1993) [20] την συνδέουν με τη μείωση του μεγέθους των κρυστάλλων. Ακόμη οι ίδιοι ερευνητές παρατήρησαν ότι στα ανθρώπινα οστεοπορωτικά οστά της λεκάνης, οι συγκεντρώσεις Na και Mg παρουσίαζαν αύξηση σε σχέση με τα υγιή.

1.2. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Το ανόργανο μέρος του οστού έχει άμεση σχέση με τη δομή και τις ιδιότητές του. Η ακριβής στοιχειομετρική του σύσταση αποτελεί διαρκές πεδίο έρευνας, αν και είναι γενικώς αποδεκτό, ότι ο κύριος μοριακός τύπος είναι αυτός του υδροξυαπατίτη (HA) στον οποίο, όπως αναφέρθηκε, τα κυρίαρχα στοιχεία με μεγάλο ατομικό αριθμό είναι το Ca και ο P. Ο λόγος Ca/P παρέχει χρήσιμες πληροφορίες για την κατάσταση του οστού, γι αυτό και η έρευνα έχει στραφεί στον προσδιορισμό του λόγου αυτού.

Σήμερα χρησιμοποιούνται τεχνικές για *in vivo* μελέτη του λόγου Ca/P, αλλά σε αυτές υπεισέρχονται παράμετροι που προκαλούν προβλήματα στον ακριβή προσδιορισμό του. Τέτοιοι παράγοντες είναι το δέρμα, ο μυελός των οστών και το κολλαγόνο [15], [33]. Για το λόγο αυτό γίνονται *in vitro* μελέτες χρησιμοποιώντας τεχνικές, όπως περίθλαση ακτίνων – X (X – ray Diffraction) [5], σκέδαση ακτίνων – X μικρής γωνίας (Small – angle X – ray Scattering) [3], ανάλυση με νετρονιακή ενεργοποίηση (Neutron Activation Analysis) [130], [149], υπολογιστική μικροτομογραφία (Micro – CT) [90], [115], [127], ανάλυση με φθορισμό ακτίνων – X με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, ή διαπερατότητας (Energy – Dispersive X – ray Analysis via Scanning or Transmission

Electron Microcopy) [10], [73] αλλά και με φθορισμό ακτίνων – X με σύγχροτρο (Microsynchrotron X – ray Fluorescence) [17].

Η εισαγωγή της φασματοσκοπίας ηλεκτρονίων Auger (Auger Electron Spectroscopy – AES) ως μια αξιόπιστη τεχνική για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση του λόγου Ca/P των οστών έγινε για πρώτη φορά από τους Tzaphlidou M. et al. (2005) [125]. Η τεχνική AES είναι η βασική τεχνική της παρούσας διατριβής. Επιπλέον, έγινε χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (Scanning Electron Microscope – SEM) για τον ποσοτικό προσδιορισμό των δομικών αλλαγών στα οστά, λόγω οστεοπόρωσης, μέσω της φασματοσκοπίας ακτίνων – X (Energy Dispersive X – ray Spectroscopy – EDS).

1.2.1 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΩΝ AUGER

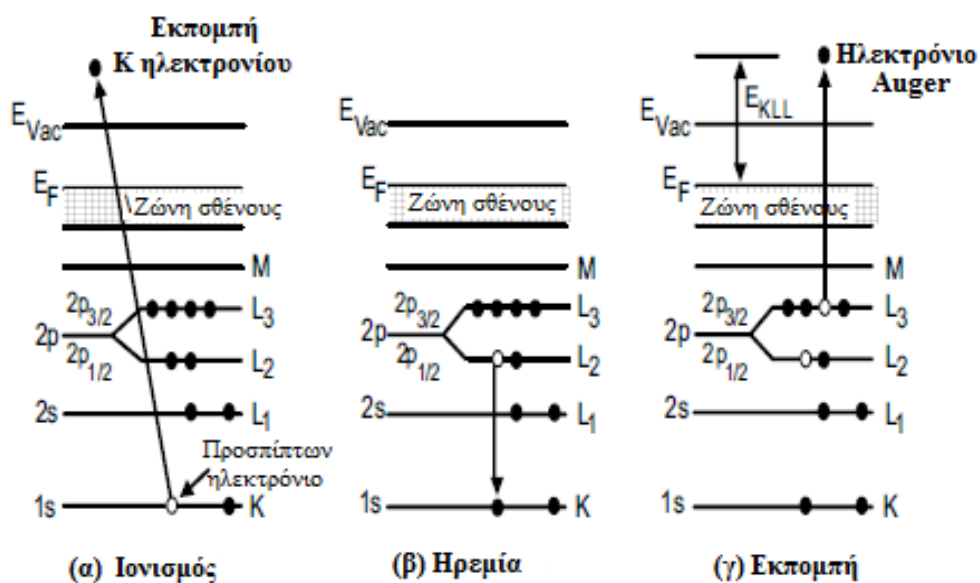
Η φασματοσκοπία AES πήρε το όνομά της από το φαινόμενο εκπομπής ηλεκτρονίων, η οποία παρατηρήθηκε πρώτη φορά από το Γάλλο φυσικό Pierre Auger και την Lise Meitner το 1920. Μέχρι όμως και το 1950, το φαινόμενο Auger απλώς εξηγούσε τις ανωμαλίες στα φάσματα των ακτίνων – X. Από το 1953 μέχρι σήμερα, με την ανάπτυξη της τεχνολογίας του υπερύψηλου κενού, αποτέλεσε μια σημαντική τεχνική χαρακτηρισμού των επιφανειών [50]. Χρησιμοποιείται για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση μιας επιφάνειας, καθώς και τον έλεγχο της καθαρότητάς της. Η μέθοδος βασίζεται στην ανίχνευση ηλεκτρονίων που ελευθερώνονται από άτομα της επιφάνειας μέσω του φαινομένου Auger, με βάθος διαφυγής μεταξύ 0,5 – 2 nm [82].

Για τη μελέτη επιφανειών βιολογικών ιστών οι αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία είναι πολύ περιορισμένες και στηρίζονται κυρίως στη μελέτη οδοντικών ιστών [68], [67], [72], [87], [142].

1.2.1.1 ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ AUGER

Κατά το φαινόμενο Auger το άτομο διεγείρεται από εξωτερικό διεγέρτη που μπορεί να είναι είτε ηλεκτρόνιο υψηλής ενέργειας, είτε φωτόνιο στην περιοχή των ακτίνων – X (Εικόνα 1.9). Κατά τη διέγερση αυτή, ηλεκτρόνιο της εσωτερικής στοιβάδας με

ενέργεια E_K διεγείρεται και στη θέση του αφήνει μια οπή. Η οπή καλύπτεται ταχύτατα από ηλεκτρόνιο ανώτερης ενεργειακής στάθμης ενέργειας E_{L2} . Η ενεργειακή διαφορά $\Delta E = E_K - E_{L2}$ αποδίδεται στο περιβάλλον με τη μορφή φωτονίου, το οποίο με τη σειρά του είτε διαφεύγει από το άτομο, είτε απορροφάται από ηλεκτρόνιο υψηλότερης ενεργειακής στάθμης E_{L3} και το οποίο απελευθερώνεται. Το ηλεκτρόνιο που διαφεύγει μέσω αυτής της διαδικασίας ονομάζεται ηλεκτρόνιο Auger ενέργειας $0 - 2 \text{ keV}$ [50], [58] [109], [138].



Εικόνα 1.9 Ιονισμός μέσω εξωτερικού διεγέρτη και απελευθέρωση ηλεκτρονίου μέσω της διαδικασίας Auger που αποτελείται από τρεις φάσεις α) τον ιονισμό, β) την ηρεμία και γ) την εκπομπή [44].

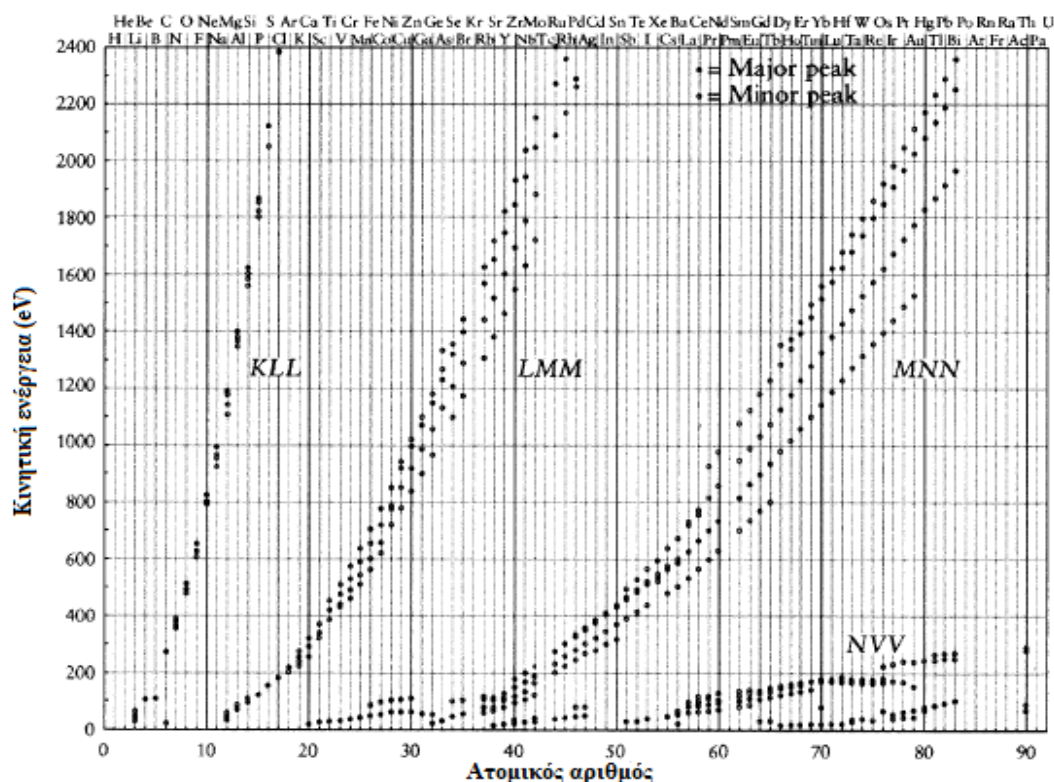
Γίνεται λοιπόν φανερό ότι η τελική κατάσταση του ατόμου είναι διπλά ιονισμένη, το δε ηλεκτρόνιο που ελευθερώνεται παίρνει το όνομά του από τη μετάβαση που συντελείται και στην περίπτωση αυτή ονομάζεται KL_2L_3 Auger ηλεκτρόνιο. Η κινητική ενέργεια του ηλεκτρονίου είναι περίπου ίση με τη διαφορά των ενεργειών των σταθμών που συμμετέχουν, δηλαδή της ενέργειας στην αρχική κατάσταση E_K μειωμένη κατά την ενέργεια των υψηλότερων σταθμών E_{L2} και E_{L3} .

$$E_{KL_2L_3} = E_K - E_{L_2} - E_{L_3} \quad (1)$$

Στην πραγματικότητα, ο υπολογισμός της ενέργειας είναι πολύ πιο πολύπλοκος από το απλό μοντέλο που περιγράφηκε. Ο υπολογισμός όμως αυτός ικανοποιεί την εμπειρική προσέγγιση των ενεργειών των στοιχείων του περιοδικού πίνακα. Έτσι, για ένα στοιχείο ατομικού αριθμού Z η προσεγγιστική σχέση της κινητικής ενέργειας του ηλεκτρονίου Auger για την παραπάνω μετάβαση δίνεται από τη σχέση:

$$E_{KL_2L_3}(Z) = E_K(Z) - \frac{1}{2} [E_{L_2}(Z) + E_{L_2}(Z + 1)] - \frac{1}{2} [E_{L_3}(Z) + E_{L_3}(Z + 1)] \quad (2)$$

Η ενέργεια του ηλεκτρονίου Auger δεν εξαρτάται από τον αρχικό διεγέρτη αλλά από το άτομο της επιφάνειας το οποίο διεγείρεται. Στο γράφημα 1.1 παρουσιάζονται οι μεταβάσεις και οι ενέργειες για τα στοιχεία του περιοδικού πίνακα έως τον ατομικό αριθμό 90.



Γράφημα 1.1 Οι ενέργειες και οι αντίστοιχες μεταβάσεις για εκπομπή ηλεκτρονίων Auger για στοιχεία με ατομικό αριθμό έως 90 [138].

Όπως γίνεται αντιληπτό, για να πραγματοποιηθεί η εκπομπή ηλεκτρονίου Auger συμμετέχουν τρία ηλεκτρόνια, γεγονός που δηλώνει ότι άτομα με λιγότερο από τρία ηλεκτρόνια δεν μπορούν να εκπέμψουν ηλεκτρόνιο Auger, όπως το H και το He.

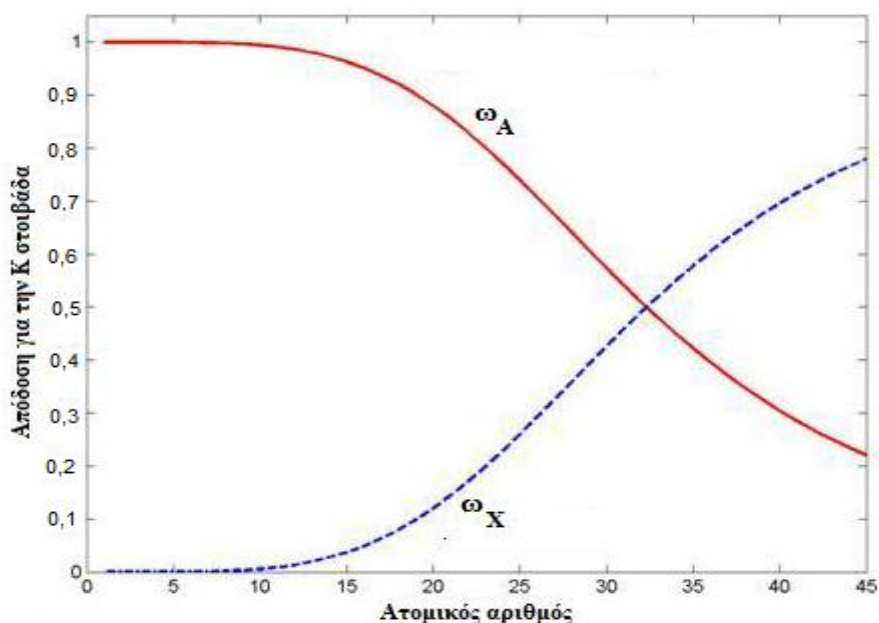
Η εκπομπή ηλεκτρονίου Auger και ο φθορισμός ακτίνων – X είναι δύο φαινόμενα που λαμβάνουν χώρα ταυτόχρονα. Η απόδοση για την εκπομπή ενός ηλεκτρονίου Auger ω_A σε σχέση με την απόδοση για την αποδιέγερση με εκπομπή ακτίνων – X ω_X δίνεται από τη σχέση:

$$\omega_A = 1 - \omega_X = 1 - \frac{W_X}{W_X + W_A} \quad (3)$$

όπου W_X και W_A είναι η πιθανότητα εκπομπής ακτίνων – X ή εκπομπής ηλεκτρονίου Auger αντίστοιχα [50]. Η πιθανότητα αυτή εξαρτάται τόσο από τον ατομικό αριθμό Z όσο και από την ενεργειακή κατάσταση. Η εμπειρική σχέση για εκπομπή ακτίνων – X από την K στοιβάδα δίνεται από τη σχέση:

$$\omega_X = \frac{[\sum_{i=0}^3 C_i Z^i]^4}{1 + [\sum_{i=0}^3 C_i Z^i]^4} \quad (4)$$

όπου C_i σταθερά και Z ο ατομικός αριθμός [61]. Γραφικά η απόδοση για εκπομπή ηλεκτρονίου Auger σε σχέση με την απόδοση και για εκπομπή ακτίνων – X για την K στοιβάδα απεικονίζονται στο γράφημα 1.2. Από το γράφημα προκύπτει ότι για ελαφρά στοιχεία ($Z < 30$) η απόδοση για εκπομπή ηλεκτρονίου Auger είναι μεγαλύτερη, ενώ η απόδοση για εκπομπή ακτίνων – X είναι μεγαλύτερη για άτομα με μεγάλους ατομικούς αριθμούς.

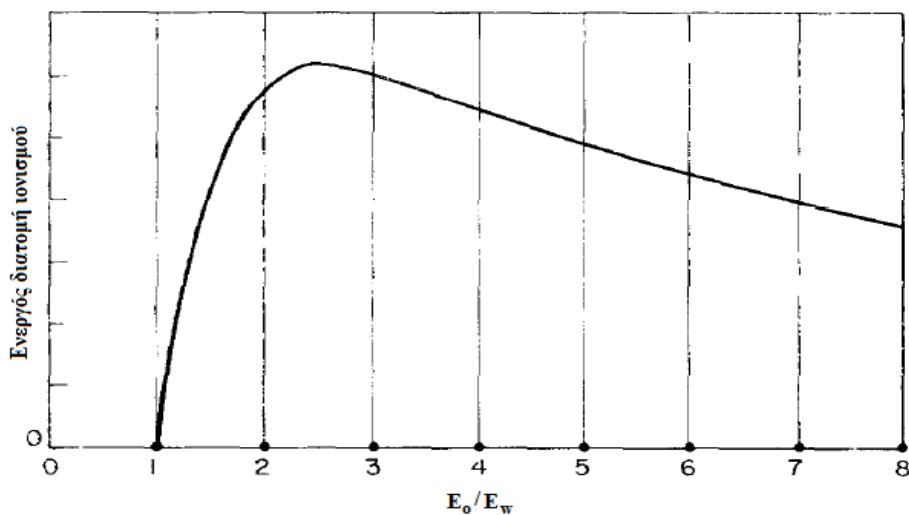


Γράφημα 1.2 Η απόδοση εκπομπής ηλεκτρονίου Auger είναι μεγαλύτερη για άτομα με μικρό ατομικό αριθμό ($Z < 30$) για την KLL μετάβαση, αντίθετα η απόδοση εκπομπής ακτίνων $-X$ είναι μεγαλύτερη για άτομα με μεγάλο ατομικό αριθμό Z [50].

Τέλος, η πιθανότητα εκπομπής ηλεκτρονίου Auger σχετίζεται με την πιθανότητα ιονισμού της εσωτερικής ενεργειακής κατάστασης W . Συνεπώς, σημαντικό παράγοντα αποτελεί η ενέργεια της αρχικής δέσμης διέγερσης E_0 σε σχέση με την ενέργεια σύνδεσης της εσωτερικής στοιβάδας E_W , καθώς επίσης και οι δευτερογενείς ιονισμοί που προκαλούνται, οι οποίοι αυξάνουν την επίδραση της δέσμης του διεγέρτη. Από την κβαντική θεωρία προκύπτει ότι η ενεργός διατομή σ_W για την εκπομπή ηλεκτρονίου Auger δίνεται από τη σχέση:

$$\sigma_W = const \times \frac{C(E_0/E_W)}{E_W^2} \quad (5)$$

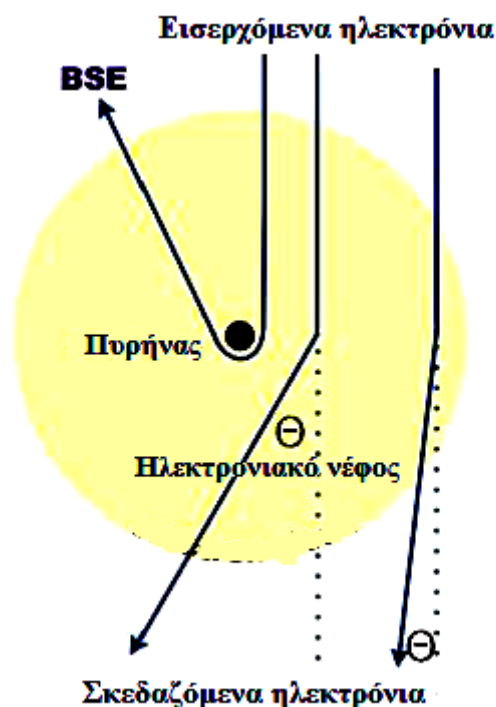
όπου $const$ είναι σταθερά που αναφέρεται στην εκάστοτε στοιβάδα W ($= K, L, M$). Η γραφική απεικόνιση της ενεργού διατομής του ιονισμού φαίνεται στο γράφημα 1.3 όπου για $E_0 < E_W$ η ενέργεια του διεγέρτη είναι ανεπαρκής, ενώ για $E_0 \gg E_W$ το προσπίπτον ηλεκτρόνιο δεν έχει αρκετό χρόνο ώστε να αλληλεπιδράσει [23], [135].



Γράφημα 1.3 Η ενεργός διατομή του ιονισμού ανάλογα με το λόγο της ενέργειας του διεγέρτη E_o και της ενέργειας της εσωτερικής στοιβάδας E_w [23].

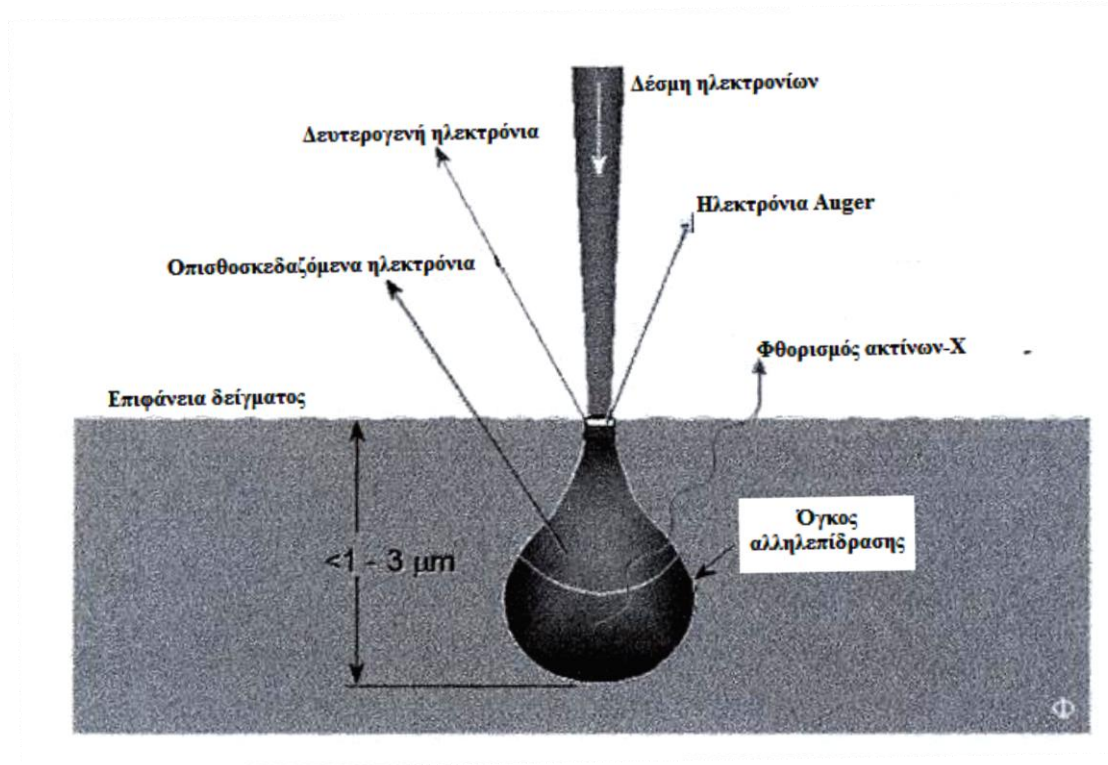
1.2.1.2 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΙΕΓΕΡΤΗ – ΥΛΙΚΟΥ

Η αρχική δέσμη του διεγέρτη που μπορεί να είναι ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας μερικών keV, αλληλεπιδρά με την ύλη μέσω της ελαστικής και της ανελαστικής σκέδασης. Κατά την ελαστική σκέδαση, τα ηλεκτρόνια της δέσμης του διεγέρτη αλληλεπιδρούν μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων με τον πυρήνα ή τα δέσμια ηλεκτρόνια των ατόμων του υλικού, με αποτέλεσμα την αλλαγή της κατεύθυνσης κίνησής τους αλλά όχι της ενέργειάς τους (Εικόνα 1.10).



Εικόνα 1.10 Ελαστική σκέδαση εισερχόμενης δέσμης ηλεκτρονίων με τον πυρήνα και τα ηλεκτρόνια του ατόμου.

Στην ανελαστική σκέδαση, η αρχική δέσμη αλληλεπιδρά με τα ηλεκτρόνια των ατόμων και τα απελευθερώνει. Με τη σειρά τους αυτά σκεδάζονται προς κάθε κατεύθυνση και σταδιακά χάνουν την ενέργειά τους. Το μεγαλύτερο ποσοστό της ενέργειας των ηλεκτρονίων που σκεδάζονται ανελαστικά χάνεται με τη μορφή θερμότητας, ενώ ένα μικρό ποσοστό αυτής εξέρχεται από το δείγμα με τη μορφή δευτερευόντων φαινομένων. Τέτοιου είδους φαινόμενα μπορεί να είναι δευτερογενή εκπεμπόμενα ηλεκτρόνια (secondary electrons), οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια (backscattering electrons, BSE), ηλεκτρόνια Auger (Auger electrons) αλλά και ακτίνες X (characteristic x-ray). Όλα αυτά τα δευτερεύοντα φαινόμενα δημιουργούνται ταυτόχρονα και κάθε ένα παρέχει διαφορετικές πληροφορίες για το υλικό (Εικόνα 1.11).



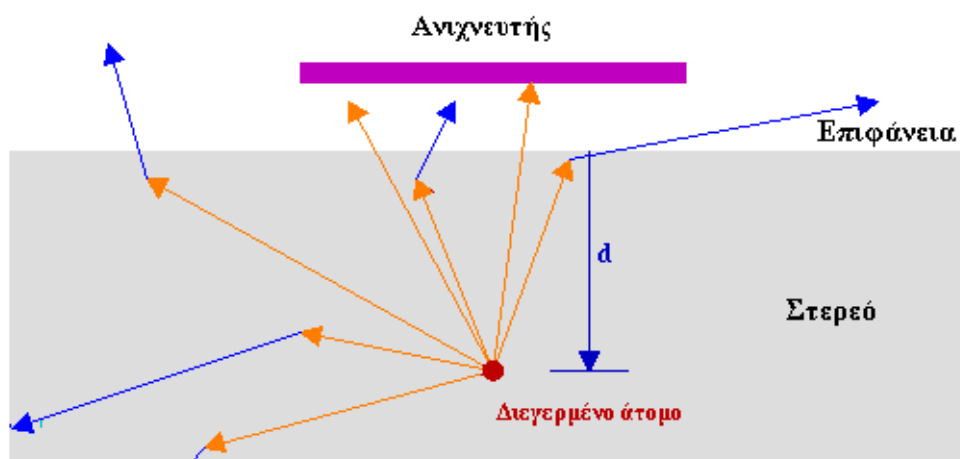
Εικόνα 1.11 Αλληλεπίδραση δέσμης ηλεκτρονίων – επιφάνειας και δημιουργία δευτερευόντων φαινομένων: δευτερογενή εκπομπή ηλεκτρονίων, οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια, ηλεκτρόνια Auger, φθορισμός ακτίνων – X [109].

Τα δευτερογενή ηλεκτρόνια διαφεύγουν από την επιφάνεια από την πλευρά εισόδου της δέσμης και έχουν ενέργεια της τάξης των 50 eV. Τα ηλεκτρόνια αυτά είναι ηλεκτρόνια τα οποία στο τέλος της τροχιάς φθάνουν στην επιφάνεια με ενέργεια μερικών eV, ή ηλεκτρόνια σθένους στα οποία έχει μεταφερθεί ενέργεια μέσω της ανελαστικής σκέδασης και βρίσκονται πολύ κοντά στην επιφάνεια. Λόγω της μικρής τους ενέργειας, είναι δυνατόν να διαφύγουν από το δείγμα μόνο εάν είναι κοντά στην επιφάνεια. Τα οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια προέρχονται από μεγαλύτερο βάθος και έχουν ενέργεια μεγαλύτερη των 50 eV. Είναι ηλεκτρόνια της αρχικής δέσμης τα οποία έχουν υποστεί σκέδαση από τον πυρήνα των ατόμων. Τα ηλεκτρόνια Auger και ο φθορισμός των ακτίνων – X δημιουργούνται από το μηχανισμό διέγερσης και αποδιέγερσης των ατόμων [119].

Το βάθος αλληλεπίδρασης είναι μεγάλο και φτάνει μέχρι τα 1 – 3 μm , ενώ ο όγκος αλληλεπίδρασης απλώνεται σε σχήμα σταγόνας. Το μέγεθος της αλληλεπίδρασης προσδιορίζεται από την σκέδαση της αρχικής δέσμης στο υλικό, η οποία εξαρτάται από το είδος του υλικού και από την ενέργεια της αρχικής δέσμης.

Παρόλα αυτά, μόνο τα ηλεκτρόνια Auger που εκπέμπονται από τα πρώτα στρώματα της επιφάνειας φθάνουν στον ανιχνευτή χωρίς να χάσουν την ενέργειά τους και έχουν ενέργεια που είναι χαρακτηριστική για κάθε στοιχείο (χαρακτηριστική ενέργεια ηλεκτρονίου Auger).

Συνεπώς, ένα μόνο μέρος των ηλεκτρονίων Auger που παράγονται στο υλικό ανιχνεύεται, ενώ ένα μέρος χάνει την ενέργειά του και φτάνει στον ανιχνευτή με ενέργεια μικρότερη της χαρακτηριστικής του ηλεκτρονίου Auger. Η απώλεια αυτή της ενέργειας οφείλεται στο φαινόμενο της ανελαστικής σκέδασης. Συνεπώς, πέρα από την απώλεια ενέργειας, προκαλείται και αλλαγή στη διεύθυνση κίνησης των ηλεκτρονίων (Εικόνα 1.12).



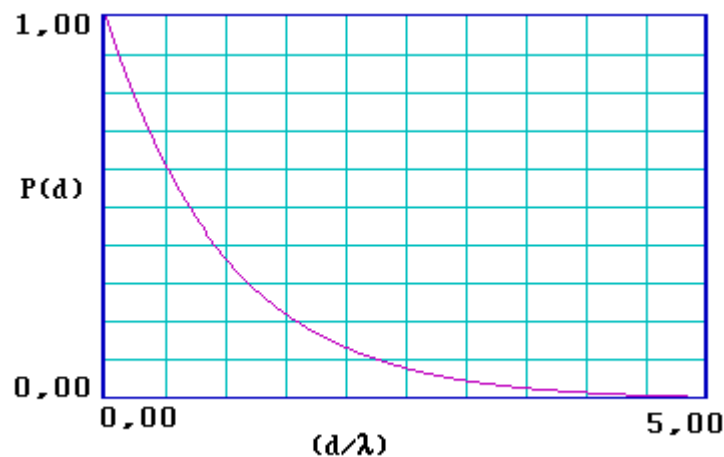
Εικόνα 1.12 Τα βέλη παρουσιάζουν τις πιθανές διευθύνσεις κίνησης των ηλεκτρονίων Auger στο υλικό. Τα ανοιχτόχρωμα βέλη είναι τα ηλεκτρόνια Auger με την χαρακτηριστική τους ενέργεια ενώ τα σκουρόχρωμα βέλη είναι τα ηλεκτρόνια αφού έχουν υποστεί ανελαστική σκέδαση [58].

Η πιθανότητα λοιπόν, να ανιχνευτεί το ηλεκτρόνιο Auger χωρίς να υποστεί ανελαστική σκέδαση εξαρτάται από το βάθος (d) διαφυγής του ηλεκτρονίου και είναι μικρότερη όσο μεγαλύτερο είναι το βάθος. Επιπλέον, εξαρτάται και από το μήκος διαδρομής μεταξύ δύο γεγονότων σκέδασης (λ) (inelastic mean free path – IMFP). Το IMFP είναι το μήκος ώστε το ηλεκτρόνιο να ανιχνευτεί χωρίς να υποστεί ανελαστική

σκέδαση. Η πιθανότητα που προκύπτει ώστε να ανιχνευτεί το ηλεκτρόνιο, δίνεται από τη σχέση:

$$P(d) \sim e^{-\left(\frac{d}{\lambda}\right)} \quad (6)$$

Εάν λοιπόν, παρασταθεί γραφικά η πιθανότητα διαφυγής του ηλεκτρονίου συναρτήσει του λόγου d/λ , παρατηρείται ότι ο λόγος πρακτικά μηδενίζεται για τιμές $d/\lambda > 5$ (Γράφημα 1.4). Είναι λοιπόν φανερό ότι το μεγαλύτερο μέρος των ηλεκτρονίων Auger προέρχεται από βάθος ίσο με το IMFP, ενώ σύμφωνα με την παραπάνω σχέση το σύνολο σχεδόν των ηλεκτρονίων (> 95%) έχουν προέρθει από βάθος ίσο με τρεις φορές το IMFP.



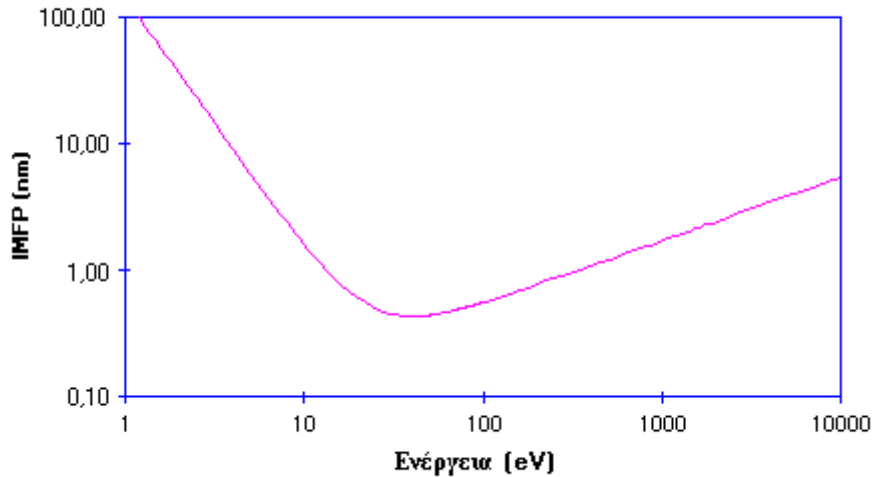
Γράφημα 1.4 Απεικόνιση της πιθανότητας διαφυγής ηλεκτρονίου συναρτήσει του λόγου d/λ . Για τιμές του $d/\lambda > 5$ η πιθανότητα πρακτικά μηδενίζεται οπότε το μεγαλύτερο μέρος των ηλεκτρονίων προέρχεται από βάθος $d = \lambda$ [58].

Το IMFP για μονατομικό υλικό έχει υπολογιστεί [138] και είναι ανάλογο της ενέργειας του ηλεκτρονίου Auger, αλλά εξαρτάται και από το είδος του στοιχείου. Η σχέση που τα συνδέει είναι η εξής:

$$\lambda = \frac{538\alpha_A}{E_A^2} + 0,41\alpha_A(\alpha_A E_A)^{0,5} \quad (7)$$

όπου E_A είναι η ενέργεια του ηλεκτρονίου Auger και α_A^3 ο ατομικός όγκος του υλικού. Αν παρασταθεί γραφικά η εξάρτηση του λ από την ενέργεια για ένα στοιχείο ατομικού όγκου

α_A^3 προκύπτει το γράφημα 1.5 στο οποίο το λ παρουσιάζει ελάχιστο για ενέργειες μεταξύ 50 – 100 eV. Παρόμοιο γράφημα δίνουν όλα τα στοιχεία.



Γράφημα 1.5 Γραφική εξάρτηση του IMFP από την ενέργεια των ηλεκτρονίων για ένα υλικό ατομικού όγκου α_A^3 [58].

Η ενέργεια των ηλεκτρονίων που προέρχονται από στρώματα βαθύτερα της επιφάνειας και που ταξιδεύουν ευθύγραμμα προς τον ανιχνευτή θα μειώνεται εκθετικά με την απόσταση αλλά και με το IMFP σύμφωνα με τη σχέση:

$$I = I_0 e^{-\left(\frac{d}{\lambda}\right)} \quad (8)$$

όπου I_0 η αρχική ένταση των ηλεκτρονίων της δέσμης. Για γωνία πρόσπτωσης δέσμης θ (ως προς τον ανιχνευτή) η σχέση μετασχηματίζεται σε:

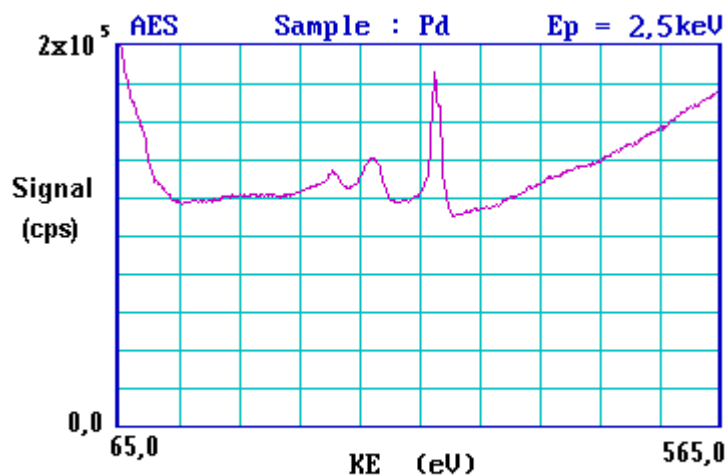
$$I = I_0 e^{-\left(\frac{d}{\lambda \cos \theta}\right)} \quad (9)$$

Η απώλεια ενέργειας λόγω του IMFP έχει ως αποτέλεσμα την ενεργειακή μετατόπιση των κορυφών του στοιχείου και την εμφάνισή τους σε χαρακτηριστικές ενέργειες άλλων στοιχείων [58]. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητο να υπεισέρχεται διόρθωση στον

υπολογισμό της συγκέντρωσης των στοιχείων σε ένα δείγμα, η οποία θα λαμβάνει υπόψη το IMFP.

1.2.1.3 ΦΑΣΜΑΤΑ AUGER

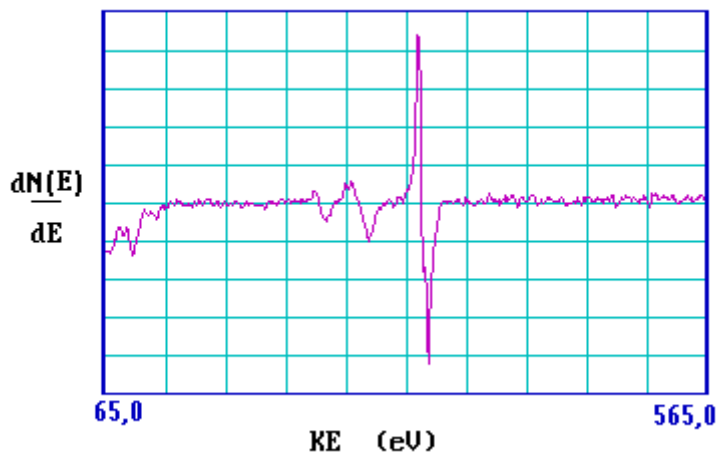
Η AES βασίζεται στη μέτρηση των κινητικών ενεργειών των εκπεμπόμενων ηλεκτρονίων. Έτσι, με δεδομένο ότι για κάθε στοιχείο είναι γνωστή η ενέργεια των εκπεμπόμενων ηλεκτρονίων Auger, η μελέτη της επιφάνειας ενός δείγματος μπορεί να οδηγήσει στη χημική σύστασή της. Η μελέτη της χημικής σύστασης γίνεται μέσω του φάσματος Auger (Γράφημα 1.6), όπου η συγκέντρωση του κάθε στοιχείου είναι ανάλογη του εμβαδού που βρίσκεται κάτω από την αντίστοιχη κορυφή $N(E)$. Η κορυφή $N(E)$ αντιπροσωπεύει τον αριθμό των ηλεκτρονίων που έχουν ενέργεια E .



Γράφημα 1.6 Φάσμα AES από μέταλλο Pd. Η ενέργεια της προσπίπτουσας δέσμης είναι 2,5 keV. Οι δύο κύριες κορυφές των ηλεκτρονίων Auger είναι στα 220 και 340 eV. Το υπόβαθρο οφείλεται στα δευτερογενή ηλεκτρόνια από τα φαινόμενα της ανελαστικής σκέδασης [58].

Το φάσμα σε αυτή τη μορφή εισάγει σφάλμα στη συγκέντρωση των ηλεκτρονίων, λόγω των δευτερευόντων ηλεκτρονίων που οφείλονται στο φαινόμενο της ανελαστικής σκέδασης. Για την αποφυγή του ανωτέρου σφάλματος, η ανάλυση των φασμάτων Auger

γίνεται μέσω της διαφορίσής τους, δηλαδή της ανάλυσης της ποσότητας $d(N(E))/dE$. Σε αυτή τη μορφή τα δευτερογενή φαινόμενα απεικονίζονται ως θόρυβος. Μια τέτοια διαφορική μορφή του φάσματος απεικονίζεται στο γράφημα 1.7.



Γράφημα 1.7 Το φάσμα AES του Pd υπό τη διαφορική μορφή $d(N(E))/dE$ [58].

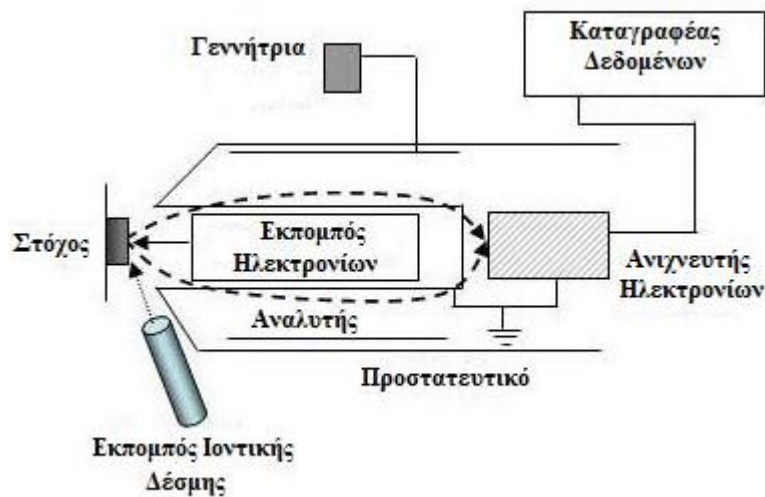
Από την ενέργεια των κορυφών και με την κατάλληλη βάση δεδομένων για τις ενέργειες των κορυφών κάθε στοιχείου, μπορεί να γίνει ποιοτική ανάλυση της επιφάνειας του δείγματος. Ενώ η ανάλυση με βάση το ύψος από κορυφή σε κορυφή του φάσματος, μπορεί να δώσει το ποσοστό του κάθε στοιχείου στην επιφάνεια, αποφεύγοντας έτσι την ολοκλήρωση του απευθείας σήματος Auger. Συνεπώς η συγκέντρωση ενός X στοιχείου του δείγματος υπολογίζεται από τη σχέση:

$$C_X = \frac{I_X/S_X}{\sum I_i/S_i} \quad (10)$$

όπου I_X είναι το μετρούμενο ύψος της κορυφής, S_X ο παράγοντας ευαισθησίας μέτρησης του στοιχείου, ενώ I_i και S_i το ύψος της κορυφής και ο παράγοντας ευαισθησίας ενός πρότυπου δείγματος του στοιχείου γνωστής συγκέντρωσης. Το άθροισμα αιτιολογείται από το ότι το πρότυπο δείγμα μπορεί να αποτελείται από παραπάνω από ένα στοιχείο [19], [111].

1.2.1.4 ΣΥΣΚΕΥΕΣ AUGER

Το σύστημα της φασματοσκοπίας Auger αποτελείται από το θάλαμο όπου τοποθετείται το δείγμα, τον εκπομπό της δέσμης των ηλεκτρονίων (electron gun), τον αναλυτή της ενέργειας των εκπεμπόμενων ηλεκτρονίων Auger και τον καταγραφέα που αποτυπώνει το φάσμα. Στα σύγχρονα συστήματα ο καταγραφέας είναι ένας ηλεκτρονικός υπολογιστής (Εικόνα 1.13). Σε πολλά συστήματα Auger, περιλαμβάνεται και ένας εκπομπός ιοντικής δέσμης (ion gun ή sputtering gun).



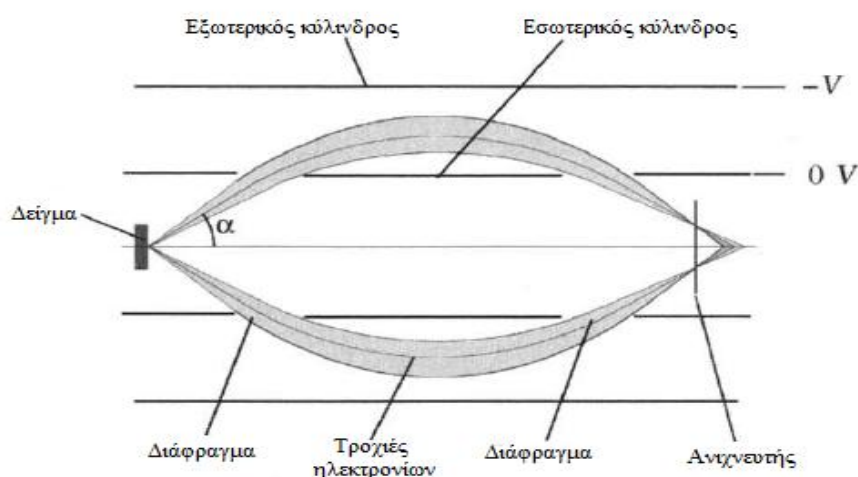
Εικόνα 1.13 Σχηματική απεικόνιση συστήματος Auger.

Ο θάλαμος όπου τοποθετείται το δείγμα βρίσκεται σε υπερ-υψηλό κενό (Ultra High Vacuum – UHV), δηλαδή υπό πίεση 10^{-8} έως 10^{-10} mbar. Ο λόγος της ύπαρξης τόσο υψηλού κενού είναι η χαμηλή ενέργεια των εκπεμπόμενων ηλεκτρονίων, τα οποία σκεδάζονται εύκολα στα μόρια της ατμόσφαιρας, με αποτέλεσμα τη μείωση της έντασης του σήματος και την αύξηση του θορύβου. Επιπλέον, η φασματοσκοπία Auger είναι μια τεχνική που μελετά την επιφάνεια του δείγματος και συνεπώς η επιφάνεια πρέπει να έχει υψηλό βαθμό καθαρότητας. Έχει υπολογιστεί ότι σε πίεση 10^{-6} mbar, στην επιφάνεια προσροφάται ατμόσφαιρα πάχους ενός ατόμου σε χρόνο 1s.

Ο εκπομπός της δέσμης ηλεκτρονίων του διεγέρτη αποτελείται από το νήμα, που είναι η πηγή των ηλεκτρονίων, και τους φακούς που εστιάζουν τη δέσμη των ηλεκτρονίων και δίνουν την επιτάχυνση. Ο εκπομπός είναι κατασκευασμένος έτσι ώστε το κενό να μην

επηρεάζεται από τη θέρμανση του νήματος. Μπορεί να λειτουργεί με ρεύματα της τάξης μερικών mA ώστε τα μαγνητικά πεδία που προκαλούνται να μην επηρεάζουν το θάλαμο. Επιπλέον, παρέχει μικρής διαμέτρου δέσμη με ενέργεια που προσεγγίζει τη μονοενεργειακή.

Οι τύποι των αναλυτών που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι δύο: α) ο κυλινδρικός αναλυτής (CMA) και β) ο ημισφαιρικός αναλυτής (HSA). Ο CMA αποτελείται από δύο ομόκεντρους μεταλλικούς κυλίνδρους υπό διαφορά δυναμικού. Τα ηλεκτρόνια περνούν αρχικά από το πρώτο διάφραγμα μέσα από το χώρο που χωρίζει τους δύο κυλίνδρους και διαγράφουν παραβολικές τροχιές διαφορετικής καμπυλότητας ανάλογα με την ενέργειά τους και τελικά φτάνουν στον ανιχνευτή (detector) μέσω του δεύτερου διαφράγματος (Εικόνα 1.14).



Εικόνα 1.14 Δομή και η λειτουργία ενός κυλινδρικού αναλυτή CMA. Απεικονίζεται το δείγμα, οι τροχιές των ηλεκτρονίων, ο εξωτερικός και εσωτερικός κύλινδρος, τα διαφράγματα και ο ανιχνευτής [138].

Τα μόνα ηλεκτρόνια που φτάνουν στον ανιχνευτή είναι αυτά που η ενέργειά τους είναι συγκρίσιμη του δυναμικού, ενώ τα ηλεκτρόνια διαφορετικής ενέργειας δεν εξέρχονται από το δεύτερο διάφραγμα. Η καταγραφή ολόκληρου του φάσματος γίνεται με σάρωση του δυναμικού, ενώ μαζί με τα ηλεκτρόνια Auger καταγράφονται και δευτερογενή ηλεκτρόνια.

Ο εκπομπός ιοντικής δέσμης χρησιμοποιείται στο να αναλύει το δείγμα σε βάθος μερικών nm ώστε να λαμβάνεται το προφίλ του βάθους (depth profile) του δείγματος. Τα ιόντα είναι συνήθως Ar^+ με ενέργεια από 1 έως 5 keV.

Με βάση λοιπόν τα προηγούμενα, η AES έχει υψηλή διακριτική ικανότητα που καθορίζεται από τη διάμετρο της δέσμης. Επιπλέον η διακριτική ικανότητα παραμένει υψηλή και κατά την ανάλυση του δείγματος σε βάθος. Βασικό δε χαρακτηριστικό είναι η δυνατότητα χαρτογράφησης της επιφάνειας. Πλεονέκτημα της φασματοσκοπίας Auger είναι η ταχεία συλλογή δεδομένων (διαρκεί μερικά λεπτά), ενώ οδηγεί σε ιδιαίτερα ακριβή ποσοτικά αποτελέσματα με υψηλή επαναληψιμότητα. Αντίθετα, η χρήση του υπερ-υψηλού κενού περιορίζει τη χρήση της φασματοσκοπίας σε μη υγροσκοπικά δείγματα. Επίσης η ενεργητικότητα της δέσμης είναι δυνατόν να αλλοιώσει την επιφάνεια του δείγματος. Ειδικά τα μονωτικά δείγματα υφίστανται εκτεταμένη φόρτιση με αποτέλεσμα να δημιουργείται στο σήμα αρκετός θόρυβος.

1.2.2. ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΣΑΡΩΣΗΣ (SEM)

Για την απεικόνιση αντικειμένων διαστάσεων μερικών νανομέτρων, η διακριτική ικανότητα της οπτικής μικροσκοπίας περιορίζεται, ενώ καθίσταται αδύνατη η παρατήρηση όταν το αντικείμενο γίνεται μικρότερο από το μήκος κύματος του φωτός. Για το λόγο αυτό, γίνεται η χρήση των ηλεκτρονικών μικροσκοπίων, τα οποία ανιχνεύουν τα ηλεκτρόνια αντί των φωτονίων. Τα ηλεκτρόνια έχουν πολύ μικρότερο μήκος κύματος από τα φωτόνια με αποτέλεσμα η διακριτική ικανότητα που επιτυγχάνεται με τα ηλεκτρονικά μικροσκόπια να είναι πολύ καλύτερη από εκείνη των οπτικών μικροσκοπίων.

Ένας τύπος ηλεκτρονικού μικροσκοπίου είναι το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Scanning Electron Microscope – SEM). Η πρώτη εικόνα από SEM ελήφθη το 1935 από τον Max Knoll. Αργότερα το 1942 ο Zworykin χρησιμοποίησε το SEM για να μελετήσει παχιά δείγματα, ενώ η εμπορική του χρήση βασίστηκε στη δουλειά του Oatley το 1965 στο Πανεπιστήμιο του Cambridge [55]. Το 1986 ο Ernst Ruska τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ για τη σχεδίαση του πρώτου ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης [56]. Στις μέρες μας χρησιμοποιείται εκτενώς σε πολλές εφαρμογές μικροσκοπίας καθώς και για

την ανάλυση της στοιχειομετρίας και μορφολογίας μιας επιφάνειας, αφού βασίζεται στην αλληλεπίδραση της δέσμης των ηλεκτρονίων με την επιφάνεια.

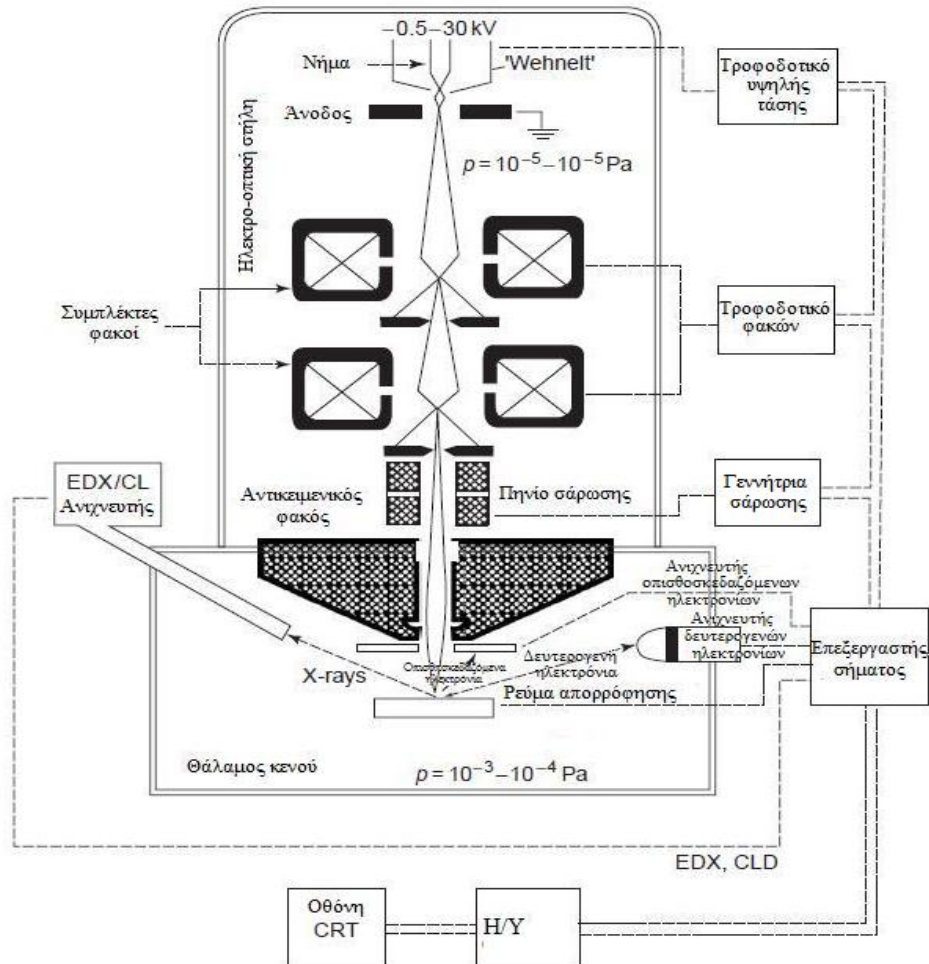
Η λειτουργία λοιπόν του SEM, βασίζεται στη σάρωση της επιφάνειας του δείγματος μέσω της δέσμης ηλεκτρονίων και της αλληλεπίδρασης με αυτή. Για το σχηματισμό της εικόνας του αντικείμενου ανιχνεύονται τα δευτερογενή ηλεκτρόνια. Πληροφορίες για την τοπογραφία της επιφάνειας παρέχουν και τα οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια. Η στοιχειακή ανάλυση πραγματοποιείται από τις εκπεμπόμενες ακτίνες – X. Το πλεονέκτημα του SEM σε σχέση με τα άλλα ηλεκτρονικά μικροσκόπια είναι η διακριτική του ικανότητα όπως επίσης το μεγάλο βάθος εστίασης της τάξης των 100 μm . Η γενικευμένη χρήση του οφείλεται στο μεγάλο εύρος μεγεθύνσεων που παρέχει (X20 – X150.000) αλλά και στην τρισδιάστατη απεικόνιση του αντικείμενου συνδυαζόμενη από την ποικιλία δειγμάτων που μπορούν να εξετασθούν.

Στη μελέτη των οστών η χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου είναι ευρεία, τόσο για την απεικόνιση των οστών, όσο και για την στοιχειακή ανάλυσή τους. Έτσι, στα ανθρώπινα οστά με χρήση της εκπομπής ακτίνων – X έχει μελετηθεί η στοιχειακή τους σύνθεση καθώς και ο προσδιορισμός του λόγου Ca/P [2], [70], [85], [86]. Επιπλέον το SEM έχει χρησιμοποιηθεί και στη μελέτη διαφόρων παθολογικών ανθρώπινων οστών [25], [93], [99]. Επίσης, με τη χρήση του έχουν προσδιοριστεί οι αλλαγές του λόγου Ca/P οφειλόμενες στις διαφορετικές θέσεις των οστών στο σώμα [73] και στην επίδραση της θερμοκρασίας [66]. Τέλος, τα τελευταία χρόνια έχει γίνει αρκετή μελέτη στην απεικόνιση της επιφάνειας των οστών και της σύνθεσής τους μέσω των οπισθοσκεδαζόμενων ηλεκτρονίων [6], [12], [16], [71].

1.2.2.1 ΔΙΑΤΑΞΗ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟΥ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟΥ ΣΑΡΩΣΗΣ (SEM)

Η σχηματική αναπαράσταση της διάταξης ενός SEM φαίνεται στην εικόνα 1.15. Το SEM αποτελείται, από μια ηλεκτρο-οπτική στήλη μέσα στην οποία βρίσκονται όλα τα μέρη για την παραγωγή και εστίαση της δέσμης των ηλεκτρονίων καθώς και ένα θάλαμο όπου τοποθετείται το δείγμα. Πάνω σε αυτόν είναι προσαρτημένη η στήλη, ενώ περιλαμβάνει τους ανιχνευτές των παραγόμενων ηλεκτρονίων καθώς και το σύστημα απεικόνισης. Τόσο η στήλη όσο και ο θάλαμος βρίσκονται υπό κενό της τάξης των 10^{-3} –

10^{-4} mbar, ώστε τα ηλεκτρόνια να μην σκεδάζονται στα μόρια του αέρα και δημιουργείται μόλυνση του δείγματος που εξετάζεται (contamination).



Εικόνα 1.15 Σχηματική αναπαράσταση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης.

Η στήλη του μικροσκοπίου αποτελείται από το νήμα παραγωγής της δέσμης των ηλεκτρονίων, το οποίο είναι ένα λεπτό σύρμα (Filament) που συνήθως είναι βολφράμιο εύκαμπτο ώστε να σχηματίζει αιχμή. Έτσι κατά τη διαρροή του από ρεύμα μέσω του φαινομένου Joule θερμαίνεται και παράγει ηλεκτρόνια λόγω θερμοϊονικής εκπομπής. Το νήμα πολώνεται αρνητικά σε δυναμικό 1 – 40 keV σε σχέση με την άνοδο και έτσι η δέσμη ηλεκτρονίων επιταχύνεται προς την οπή της ανόδου ενώ αποκτά ενέργεια όση η διαφορά δυναμικού (Εικόνα 1.15). Επιπλέον, στο νήμα τοποθετείται ένα κάλυμμα, που ονομάζεται Wehnelt, το οποίο χρησιμεύει ως φακός που επιτρέπει τον έλεγχο της

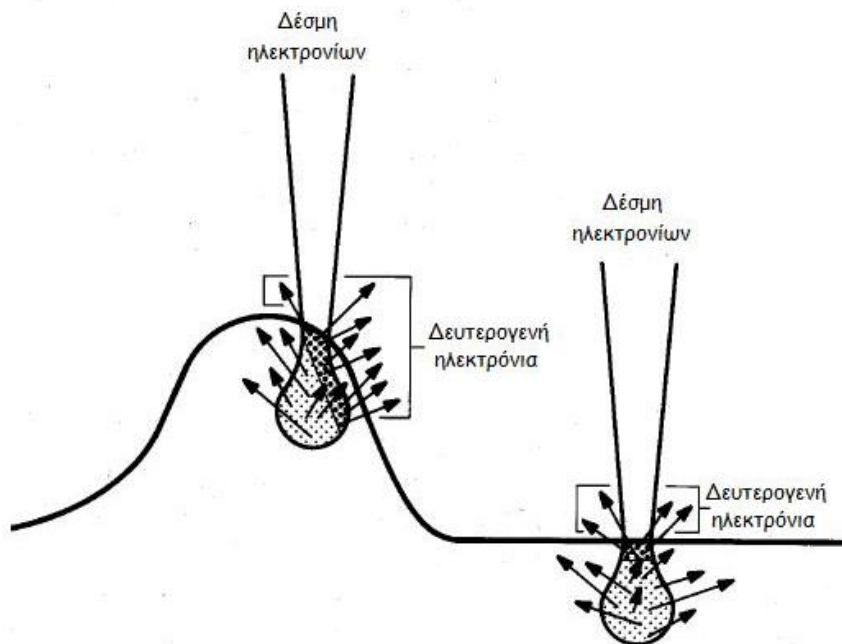
διαμέτρου της δέσμης κατά την παραγωγή της. Στη συνέχεια, η δέσμη εστιάζεται με τη βοήθεια δύο συμπυκνωτών ηλεκτρομαγνητικών φακών (condenser lens – συμπλέκτης φακός) σε διάμετρο 2 – 100 nm. Η σάρωση της επιφάνειας του δείγματος επιτυγχάνεται μέσω των πηνίων σάρωσης (scan coils). Η σάρωση γίνεται σε ένα κάναβο (raster) που αποτελείται από ένα αριθμό οριζόντιων γραμμών. Ο ανιχνευτής των δευτερογενών ηλεκτρονίων καταμετρά τα ηλεκτρόνια, ενώ στην οθόνη (CRT) εμφανίζεται η εικόνα σε συγχρονισμό με τη σάρωση της δέσμης. Η φωτεινότητα της εικόνας διαμορφώνεται από τον ενισχυτή. Η τελική μεγέθυνση είναι ο λόγος των διαστάσεων της οθόνης προς τις διαστάσεις του κάναβου σάρωσης.

1.2.2.2 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΕΙΚΟΝΑΣ

Η εικόνα του δείγματος στο SEM δημιουργείται κυρίως από τα δευτερογενή ηλεκτρόνια. Στην τοπογραφική όμως ανάλυση του δείγματος μπορεί να χρησιμοποιηθούν και τα οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια. Για τη στοιχειομετρική ανάλυση ενός δείγματος χρησιμοποιούνται οι εκπεμπόμενες ακτίνες – X.

Τα δευτερογενή ηλεκτρόνια εκπέμπονται από ολόκληρη την περιοχή της αλληλεπίδρασης δέσμης – δείγματος. Επειδή όμως έχουν χαμηλή ενέργεια, μόνο τα δευτερογενή ηλεκτρόνια που είναι κοντά στην επιφάνεια διαφεύγουν. Έτσι, περίπου μόνο το 1% του αριθμού των παραγόμενων δευτερογενών ηλεκτρονίων συνεισφέρουν στην παραγωγή της εικόνας. Το μέγιστο βάθος διαφυγής ποικίλλει και εξαρτάται από το υλικό. Για μέταλλα, το βάθος διαφυγής έχει υπολογιστεί στα 5 nm, ενώ για μονωτές στα 50 nm.

Η απορρόφηση και η διαφυγή των δευτερογενών ηλεκτρονίων είναι ο κύριος παράγοντας δημιουργίας της εικόνας στο SEM. Η μεγαλύτερη εκπομπή ηλεκτρονίων είναι σε περιοχές με ανώμαλη επιφάνεια παρά σε επίπεδες περιοχές (Εικόνα 1.16).



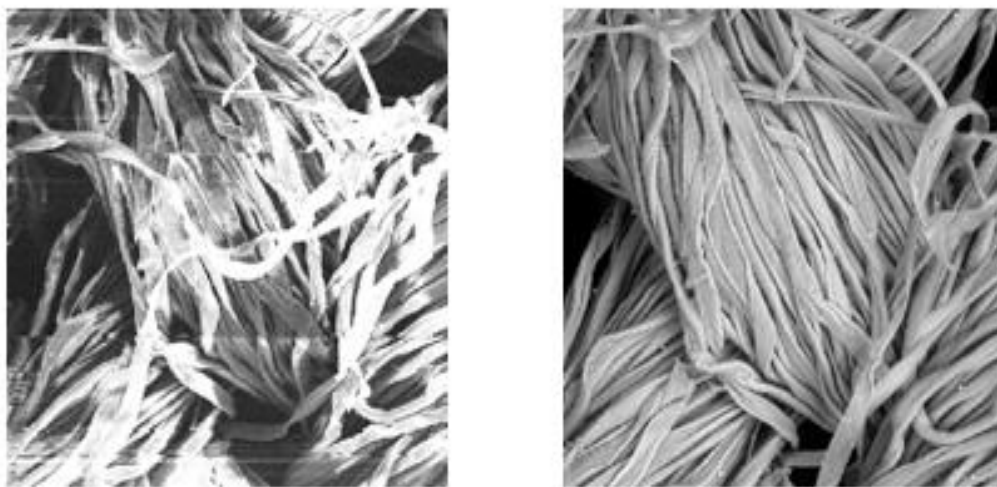
Εικόνα 1.16 Η εκπομπή δευτερογενών ηλεκτρονίων είναι μεγαλύτερη σε περιοχές με ανώμαλη επιφάνεια. Οι περιοχές αυτές εμφανίζονται πιο φωτεινές από ό,τι οι επίπεδες [36].

Έτσι οι ανώμαλες περιοχές εμφανίζονται πιο φωτεινές, σε αντίθεση με τις επίπεδες που εμφανίζονται πιο σκούρες. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται η δημιουργία μιας ψευδο-τρισδιάστατης απεικόνισης της επιφάνειας του δείγματος. Εξαιτίας της διαφυγής των δευτερογενών ηλεκτρονίων από μικρό όγκο της αλληλεπίδρασης δέσμης – δείγματος, η εικόνα έχει υψηλή διακριτική ικανότητα [75].

Τυπικά το 10% με 50% των ηλεκτρονίων της αρχικής δέσμης σκεδάζεται ελαστικώς σε μεγάλες γωνίες και έτσι τέτοια ηλεκτρόνια εξέρχονται από το δείγμα από την ίδια πλευρά της εισόδου της δέσμης (οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια). Τα ηλεκτρόνια αυτά έχουν μεγάλες ενέργειες με μέσο όρο το 60% με 80% της αρχικής ενέργειας της δέσμης. Γι αυτό το λόγο για την ανίχνευσή τους απαιτούνται ειδικοί ανιχνευτές που τοποθετούνται ακριβώς πάνω από το δείγμα. Εξαιτίας των μεγάλων ενεργειών τους δεν απορροφούνται ισχυρά από το δείγμα και το μεγαλύτερο μέρος τους διαφεύγει. Το μέγιστο βάθος διαφυγής τους ποικίλλει και είναι αντιστρόφως ανάλογο του ατομικού αριθμού των

στοιχείων του δείγματος. Επιπλέον, είναι κατά πολύ μεγαλύτερο από το βάθος διαφυγής των δευτερογενών ηλεκτρονίων. Το μεγάλο όμως βάθος διαφυγής μειώνει τη διακριτική ικανότητα σε σχέση με αυτή των δευτερογενών ηλεκτρονίων. Έτσι τα οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια είναι πολύ χρήσιμα στην παρουσίαση των διαφορών ανάμεσα στα άτομα που απαρτίζουν το δείγμα και έχουν διαφορετικό ατομικό αριθμό. Κατά συνέπεια, η ανίχνευση των οπισθοσκεδαζόμενων ηλεκτρονίων παρέχει μια πολύ καλή εικόνα της τοπογραφίας του δείγματος [36].

Ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την ποιότητα της απεικόνισης μέσω δευτερογενών ηλεκτρονίων, είναι το φαινόμενο της φόρτισης (charging effect) με αποτέλεσμα να δημιουργούνται στην εικόνα αλλοιώσεις. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται όταν το δείγμα δεν είναι αγώγιμο με αποτέλεσμα τη συσσώρευση ηλεκτρονίων στην επιφάνειά του. Έτσι λόγω του αρνητικού φορτίου τα δευτερογενή ηλεκτρόνια δεν μπορούν να εξέλθουν από την επιφάνεια με αποτέλεσμα να χάνεται η λεπτομέρεια (Εικόνα 1.17).



(α)

(β)

Εικόνα 1.17

(α) Απεικόνιση στην οθόνη του SEM ενός μη αγώγιμου δείγματος όπου εμφανίζεται το φαινόμενο φόρτισης (charging effect). Οι αλλοιώσεις στην εικόνα είναι εμφανείς.

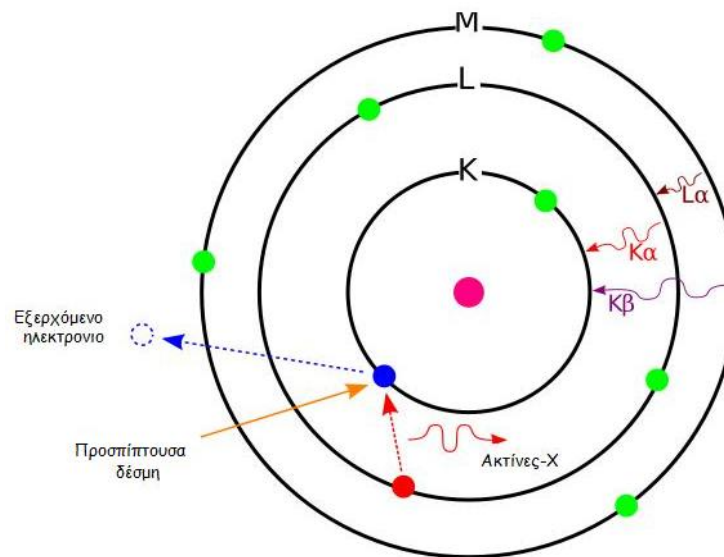
(β) Η ίδια εικόνα μετά την εναπόθεση λεπτού μεταλλικού στρώματος στην επιφάνεια του δείγματος. Οι λεπτομέρειές του διακρίνονται ευκρινώς.

Για την αποφυγή αυτού του φαινομένου στα μη αγώγιμα δείγματα γίνεται εναπόθεση ενός λεπτού στρώματος μετάλλου, μέσω εξάχνωσης, ώστε να αυξηθεί η αγωγιμότητά τους. Τα μέταλλα τα οποία συνήθως χρησιμοποιούνται είναι ο χρυσός (Au), το αλουμίνιο (Al) και ο

άνθρακας (C). Η εναπόθεση όμως πρέπει να γίνει πολύ προσεχτικά ώστε το στρώμα να είναι πολύ λεπτό (μερικά nm) και να μην αλλοιώνει τη μορφολογία του δείγματος [36].

1.2.2.3 ΣΤΟΙΧΕΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Η εκπομπή ακτίνων – X προκαλείται από την αλληλεπίδραση της δέσμης των ηλεκτρονίων με την ύλη. Κατά τη διέγερση, ένα ηλεκτρόνιο της δέσμης προσπίπτει στο άτομο και το ιονίζει με αποτέλεσμα στη θέση του εξερχομένου ηλεκτρονίου του ατόμου να δημιουργείται μια οπή (Εικόνα 1.18). Την οπή αυτή την καταλαμβάνει ηλεκτρόνιο ανώτερης στάθμης, ενώ το πλεόνασμα ενέργειας αποδίδεται με τη μορφή φωτονίου στην περιοχή των ακτίνων – X. Οι ακτίνες αυτές, είτε διαφεύγουν από το άτομο, είτε στη συνέχεια, όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 2.2.1, προκαλούν εκπομπή ηλεκτρονίου Auger.



Εικόνα 1.18 Διαδικασία εκπομπής ακτίνων – X από το άτομο [52].

Η ενέργεια των ακτίνων και οι αντίστοιχες μεταβάσεις στις στοιβάδες είναι χαρακτηριστικές για κάθε άτομο. Ο συμβολισμός των ακτίνων – X χαρακτηρίζεται από τη μετάβαση. Για παράδειγμα, για μετάβαση από την εκφυλιστική κατάσταση της στοιβάδας

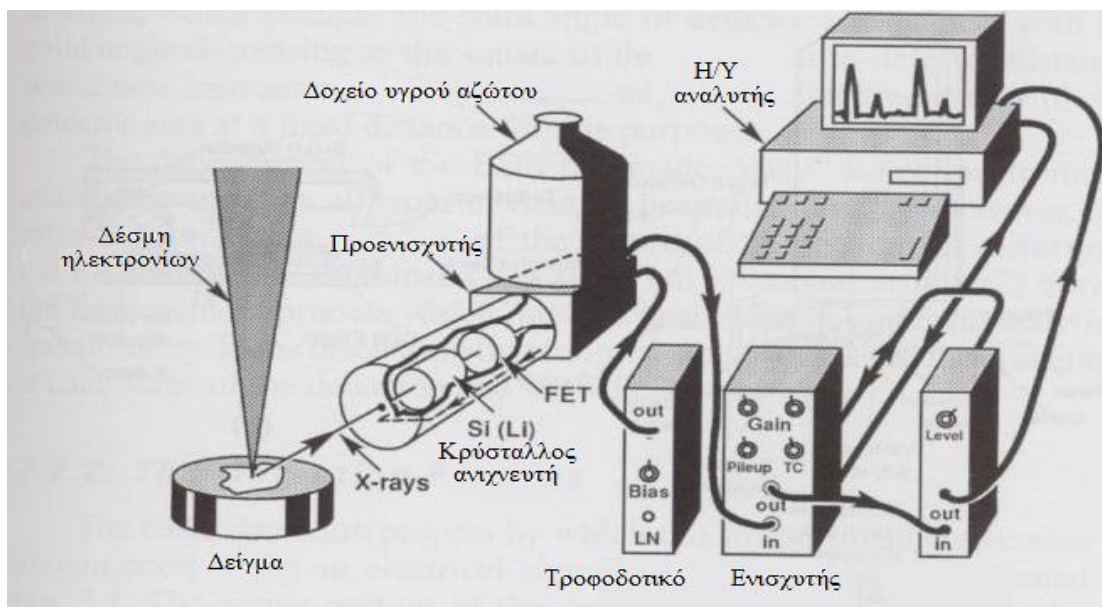
L την L_{III} στην στοιβάδα K συμβολίζεται ως $K_{\alpha 1}$, από την L_{II} στην K ως $K_{\alpha 2}$ ενώ από την M_{III} στην K ως $K_{\beta 1}$. Το μήκος κύματος των ακτίνων – X δίνεται από τη σχέση

$$\lambda = \frac{1,2398}{E} \text{ nm} \quad (11)$$

όπου E η ενέργεια των φωτονίων σε keV

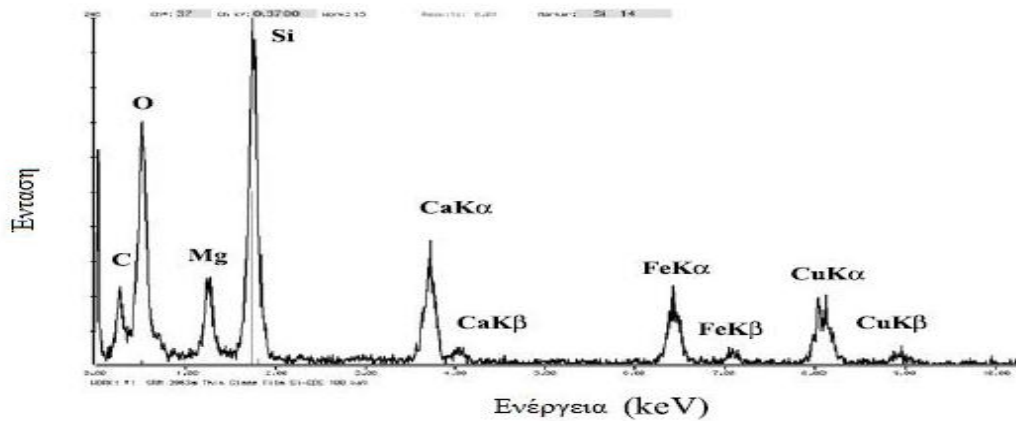
Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης ο φθορισμός των ακτίνων – X πραγματοποιείται σε όλο τον όγκο της αλληλεπίδρασης δέσμης με το δείγμα. Έτσι δημιουργούνται δύο ειδών ακτίνες, οι χαμηλής ενέργειας που απορροφούνται από το δείγμα και οι υψηλής ενέργειας που διαφεύγουν [41].

Οι ακτίνες – X που διαφεύγουν από το δείγμα ανιχνεύονται από το φασματογράφο ανάλυσης ενεργειακής διασποράς ακτίνων – X (Energy – Dispersive X – ray Spectroscopy – EDS). Ο ανιχνευτής αποτελείται από έναν κρύσταλλο πυριτίου λιθίου (Si(Li)) με προσμίξεις γερμανίου (Ge). Οι ακτίνες – X εισέρχονται στον ανιχνευτή μέσω ενός παραθύρου βηριλίου (Be) και τον ionίζουν (Εικόνα 1.19). Ο ionισμός παράγει φορτίο το οποίο ενισχύεται με τη μορφή παλμού από ένα σύστημα ενισχυτών. Λόγω της θερμικής απώλειας ρεύματος ο ανιχνευτής ψύχεται με άζωτο.



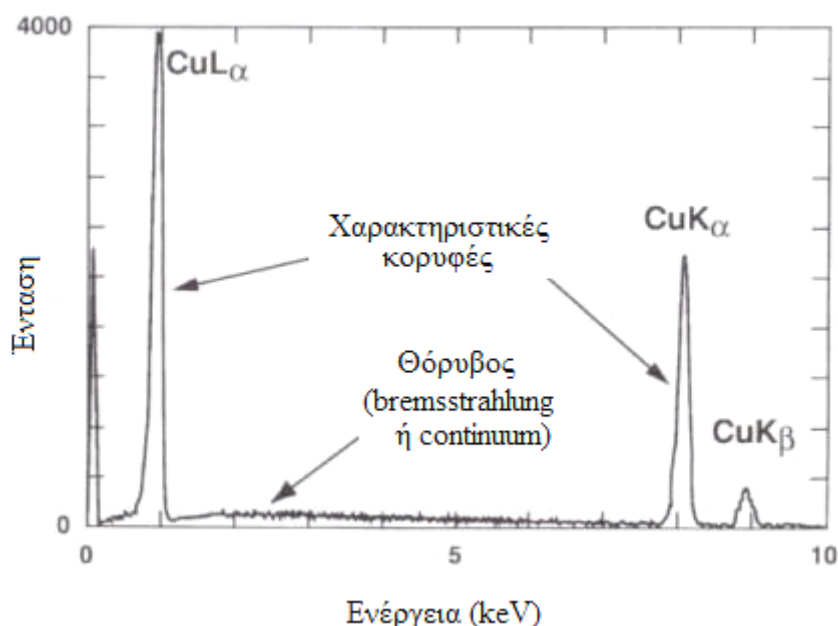
Εικόνα 1.19 Σχηματική απεικόνιση του φασματογράφου ανάλυσης ενεργειακής διασποράς (EDS) [41].

Το ύψος του παλμού, μετά την τελική ενίσχυση, αντιπροσωπεύει ένα μέτρο της ενέργειας του αρχικού φωτονίου των ακτίνων – X. Όλες οι μετρήσεις καταγράφονται από ένα σύστημα πολλαπλών καναλιών (multichannel analyzer) και τελικά παρουσιάζονται μέσω Η/Υ με τη μορφή διαγράμματος έντασης – ενέργειας (Εικόνα 1.20) [41].



Εικόνα 1.20 Διάγραμμα έντασης – ενέργειας εκπεμπόμενων ακτίνων – X από εναπόθεση λεπτού στρώματος μετάλλου σε γυαλί, όπως απεικονίζεται στην οθόνη του Η/Υ μετά την ποιοτική ανάλυση της θέσης των κορυφών ανάλογα με τον αντίστοιχο φθορισμό των ακτίνων [146].

Το φάσμα λοιπόν αποτελείται από τις κορυφές που αντιστοιχούν στις χαρακτηριστικές ενέργειες των ακτίνων – X καθώς και το θόρυβο (background) όπως απεικονίζεται στην εικόνα 1.21 για το φάσμα ενός δείγματος καθαρού χαλκού (Cu).



Εικόνα 1.21 Φάσμα ακτίνων – X καθαρού χαλκού (Cu) όπου εμφανίζονται οι χαρακτηριστικές ενέργειες των K και L στοιβάδων καθώς και ο θόρυβος (bremsstrahlung ή continuum) [41].

Ο θόρυβος στο φάσμα αποτελείται από τον ηλεκτρομαγνητικό, καθώς και αυτόν που οφείλεται στο φαινόμενο της ακτινοβολίας bremsstrahlung. Η ακτινοβολία αυτή οφείλεται στην αλληλεπίδραση της δέσμης ηλεκτρονίων με τα ηλεκτρόνια των ατόμων του δείγματος μέσω των δυνάμεων Coulomb, με αποτέλεσμα την επιβράδυνση και την απώλεια ενέργειας της δέσμης. Η διαφορά ενέργειας ΔE για κάθε επιβράδυνση αποδίδεται με τη μορφή φωτονίου. Η ενέργεια του φωτονίου δίνεται από τη σχέση $\Delta E = h\nu$, με h την σταθερά του Planck και ν τη συχνότητα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Η ακτινοβολία bremsstrahlung μπορεί να πάρει οποιαδήποτε τιμή μεταξύ του μηδενός και της αρχικής ενέργειας της δέσμης E_0 , δημιουργώντας με αυτό τον τρόπο το συνεχές φάσμα του θορύβου. Η ένταση αυτού του φάσματος υπολογίστηκε από τον Kramers το 1923 [41] και δίνεται από τη σχέση

$$I_{cm} = I_p Z \frac{E_0 - E_\nu}{E_\nu} \quad (12)$$

όπου I_p είναι το ρεύμα της δέσμης ηλεκτρονίων, \bar{Z} ο μέσος ατομικός αριθμός των στοιχείων του δείγματος, E_0 η αρχική ενέργεια της δέσμης και E_ν η ενέργεια των φωτονίων του συνεχούς φάσματος θορύβου σε συγκεκριμένο σημείο του φάσματος.

Για την αναγνώριση των κορυφών και την ταυτοποίησή τους στις χαρακτηριστικές ενέργειες των μεταβάσεων κάθε ατόμου, χρησιμοποιείται κατάλληλο λογισμικό. Για τον αυτόματο προσδιορισμό των κορυφών ακολουθούνται τα εξής στάδια:

- 1) Αφαίρεση του background. Η αφαίρεση γίνεται μέσω δύο τεχνικών, ανάλογα με το λογισμικό, του φιλτραρίσματος ή της μοντελοποίησης του background. Με την τεχνική του φιλτραρίσματος μέσω μαθηματικής διαμόρφωσης συχνοτήτων γίνεται αφαίρεση του συνεχούς θορύβου. Ενώ με τη μοντελοποίηση ο συνεχής θόρυβος προσεγγίζεται μέσω μιας μαθηματικής εξίσωσης και αφαιρείται.
- 2) Ανίχνευση των κορυφών και προσδιορισμό της θέσης τους και του πλάτους τους.
- 3) Αναγνώριση των κορυφών μέσω της βάσης δεδομένων για τις αντίστοιχες ενέργειες της κάθε μετάβασης των ατόμων.
- 4) Λόγω της αλληλοεπικάλυψης πολλών κορυφών γίνεται αποσυνέλιξη (deconvolution) των κορυφών. Δηλαδή μέσω μαθηματικού αλγορίθμου αποκαλύπτονται οι κορυφές που επικαλύπτονται από άλλες.

Με βάση λοιπόν αυτά τα βήματα, το λογισμικό εμφανίζει αυτόματα τις πιθανές χαρακτηριστικές κορυφές κάθε στοιχείου του φάσματος (Εικόνα 1.20).

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του κάθε στοιχείου του δείγματος αποτελεί και αυτός με τη σειρά του μια μαθηματική διεργασία. Η ανάλυση στηρίζεται, όπως και η αναγνώριση των κορυφών, αρχικά στην αφαίρεση του background μέσω των δύο προηγούμενων τεχνικών. Επιπλέον, μέσω της τεχνικής της αποσυνέλιξης (deconvolution) των κορυφών αίρεται η αλληλοεπικάλυψή τους όπου αυτή υπάρχει. Έτσι η συγκέντρωση του κάθε στοιχείου στο δείγμα δίνεται ως ο λόγος

$$k_i = \frac{I_i}{I_{(i)}} \quad (13)$$

όπου I_i η ένταση της χαρακτηριστικής κορυφής του στοιχείου του δείγματος στο φάσμα και $I_{(i)}$ η ένταση της χαρακτηριστικής κορυφής του στοιχείου σε ένα πρότυπο δείγμα που χρησιμοποιείται για βαθμονόμηση [39].

Ο λόγος k_i αποτελεί μια πρώτη προσέγγιση της συγκέντρωσης του στοιχείου στο δείγμα και αυτό γιατί το δείγμα δεν αποτελείται μόνο από ένα άτομο ενός στοιχείου με αποτέλεσμα να αυξάνεται ο αριθμός των ελαστικών και μη ελαστικών σκεδάσεων της δέσμης στο δείγμα. Επιπλέον, για τον ίδιο λόγο επηρεάζεται η διάδοση των ακτίνων – X μέσα σε αυτό. Τα ανωτέρω έχουν ως αποτέλεσμα μια διόρθωση στο λόγο k_i βασισμένη σε μαθηματικούς υπολογισμούς να είναι αναγκαία και ονομάζεται διόρθωση ZAF. Το όνομά της το πήρε από τους παράγοντες που συνυπολογίζονται στο λόγο, δηλαδή από τον ατομικό αριθμό (Z), την απορρόφηση των ακτίνων – X (A) και τους δευτερογενείς φθορισμούς (F). Έτσι ο λόγος μετά τη διόρθωση γίνεται

$$k_i = [ZAF]_i \frac{I_i}{I_{(i)}} \quad (14)$$

και εφαρμόζεται για κάθε στοιχείο του δείγματος.

Η διόρθωση για τον ατομικό αριθμό Z περιλαμβάνει τους υπολογισμούς για τις ελαστικές και ανελαστικές σκεδάσεις των ηλεκτρονίων της δέσμης στο δείγμα οι οποίες μπορεί να προκαλέσουν επιπλέον παραγωγή ακτίνων – X. Ακόμη, περιέχει το βάθος παραγωγής των ακτίνων – X ως συνάρτηση του μέσου ατομικού αριθμού του δείγματος αλλά και της ενέργειας της αρχικής δέσμης. Η διόρθωση στην απορρόφηση αναφέρεται στην πιθανότητα να εξέλθει μια χαρακτηριστική ακτίνα – X από το δείγμα χωρίς να απορροφηθεί. Τέλος ο φθορισμός αναφέρεται στους δευτερογενείς φθορισμούς και την επιπλέον παραγωγή ακτίνων – X λόγω απορρόφησης των αρχικών ακτίνων από το δείγμα [39].

1.2.3. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΔΥΟ ΤΕΧΝΙΚΩΝ

Από την ανάλυση των δύο τεχνικών φασματοσκοπίας που χρησιμοποιούνται στην παρούσα εργασία προκύπτει ότι:

Η φασματοσκοπία Auger:

- 1) Είναι κατάλληλη για το χαρακτηρισμό επιφανειών αφού το βάθος ανάλυσης είναι της τάξης των μερικών nm.
- 2) Σε συνδυασμό με ιοντική δέσμη παρέχει πληροφορίες για ανάλυση του δείγματος σε βάθος.
- 3) Μπορεί να αναλύσει όλα σχεδόν τα στοιχεία του περιοδικού πίνακα ($Z > 2$).
- 4) Είναι κατάλληλη για τα προς ανάλυση στοιχεία P και Ca καθώς αυτά έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να εκπέμψουν ηλεκτρόνιο Auger.
- 5) Έχει υψηλή διακριτική και χωρική ικανότητα με αποτέλεσμα να συλλέγει πληροφορίες από μικρότερο όγκο.
- 6) Απαιτεί τη χρήση υπερύψηλου κενού (HUV) με αποτέλεσμα τα δείγματα να πρέπει να είναι άνυδρα. Έτσι για τα βιολογικά δείγματα απαιτείται η εισαγωγή τεχνικών ξήρανσης.

Το SEM – EDS:

- 1) Δίνει την οπτική απεικόνιση ενός δείγματος με πολύ μεγαλύτερη μεγέθυνση, μεγαλύτερο βάθος πεδίου και μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα από ένα οπτικό μικροσκόπιο.
- 2) Έχει υψηλή διακριτική ικανότητα.
- 3) Έχει μεγάλο βάθος ανάλυσης λόγω της ενεργητικότητας της δέσμης (μερικά μm). Έτσι παρέχει στοιχειακή ανάλυση από όλο σχεδόν τον όγκο του δείγματος.
- 4) Περιορίζει την στοιχειακή του ανάλυση για στοιχεία με ατομικό αριθμό $Z > 11$.
- 5) Εμφανίζει ενεργειακή αλληλοεπικάλυψη πολλών στοιχείων με αποτέλεσμα να δημιουργείται πρόβλημα στον ποσοτικό υπολογισμό τους. Οι ενέργειες φθορισμού όμως για το Ca και τον P (2,01 keV και 3,69 keV αντίστοιχα) δεν επικαλύπτονται από συνήθη στοιχεία όπως το οξυγόνο (O) (0,52 keV).
- 6) Έχει υψηλή ενεργητικότητα δέσμης ηλεκτρονίων και είναι δυνατόν να καταστρέψει τα δείγματα. Έτσι σε συνδυασμό με την απαίτηση για αγωγιμότητα

των δειγμάτων, απαιτείται η εναπόθεση στην επιφάνεια του δείγματος ενός λεπτού στρώματος μετάλλου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα οστά που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από βιοψίες οστών πειραματοζώων, του εκτροφείου πειραματοζώων του Παν/μιου Ιωαννίνων. Τα δείγματα ελήφθησαν από διαφορετικά μέρη τόσο υγιών όσο και οστεοπορωτικών ζώων. Με τον τρόπο αυτό εξετάζεται κατά πόσο ο λόγος Ca/P επηρεάζεται από το είδος του ζώου, τη θέση του οστού στο σκελετό, αλλά και την πάθηση. Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν για τον σκοπό αυτό παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα ανάλογα με τον αριθμό, το είδος, το φύλο, το βάρος και την ηλικία τους.

Αριθμός	Είδος	Φύλο	Βάρος (gr)	Ηλικία (μήνες)
10	Μύες (Swiss Albino)	Άρρεν	25,54±3,60	5
10		Θήλυ	25,17±3,08	
10		Άρρεν	30,10±3,48	14
10		Θήλυ	26,17±1,79	
10	Επίμυες (Wistars Albino)	Άρρεν	301,17±20,94	5
10		Θήλυ	222,26±11,46	
10		Άρρεν	405,70±30,76	14
10		Θήλυ	298,79±40,11	
10	Κόνικλοι (New Zealand)	Άρρεν	2900±350	8
10		Θήλυ	3000±430	
5		Θήλυ	2800±190	

Πίνακας 2.1 Κατάταξη πειραματοζώων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ανάλογα με τον αριθμό των ζώων, το είδος, το φύλο, το μέσο όρο του βάρους τους (M.O.±SD) και την ηλικία τους.

Όλα τα ζώα σιτίζονταν με την ίδια τροφή, ενώ στεγάζονταν κάτω από τις ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας 25°C στους χώρους του εκτροφείου. Στη συνέχεια, για τη

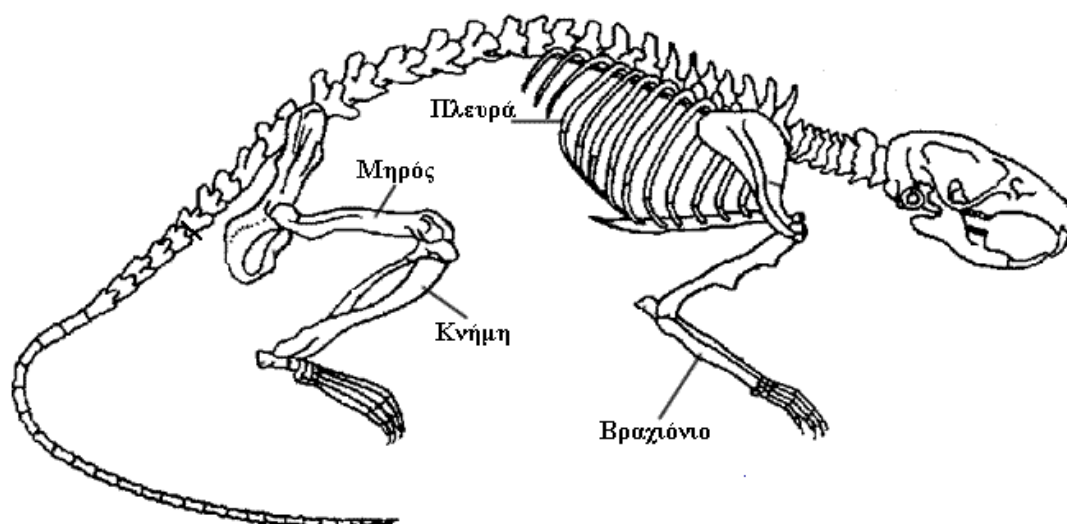
θανάτωσή τους, μεταφέρθηκαν διαδοχικά μέσα σε κατάλληλα κλουβιά στο Εργαστήριο Ιατρικής Φυσικής. Όλη η μελέτη είναι εγκεκριμένη από την Επιτροπή Προστασίας των Πειραματοζώων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

2.2 ΕΞΑΓΩΓΗ ΟΣΤΩΝ ΑΠΟ ΤΑ ΖΩΑ

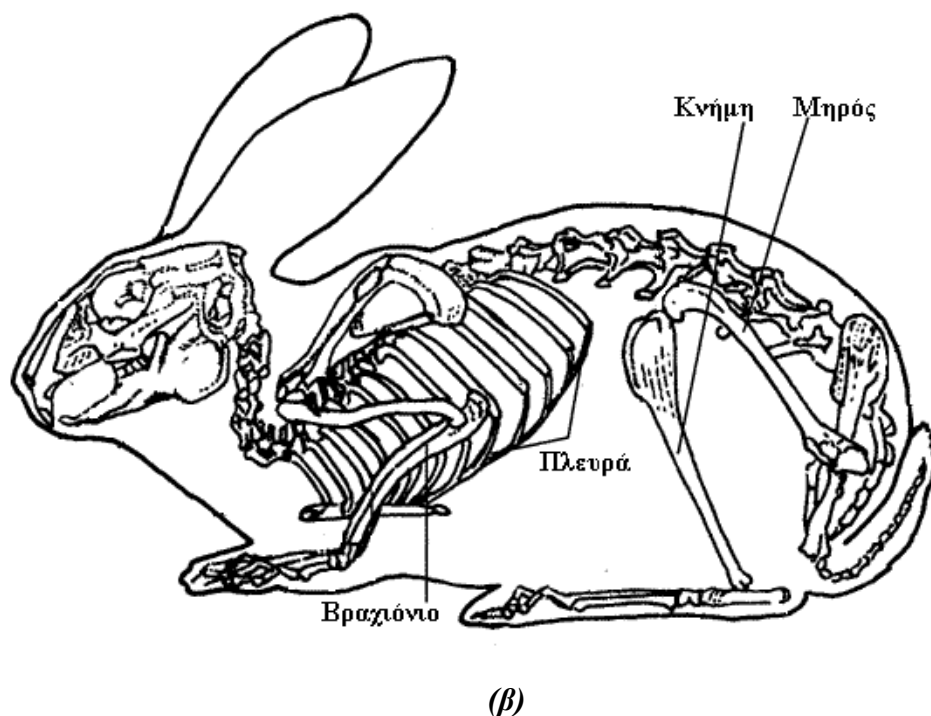
Η θανάτωση των πειραματοζώων πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ιατρικής Φυσικής με τη χρήση αιθέρα. Στη συνέχεια, με τη χρήση χειρουργικών εργαλείων έγινε η εξαγωγή των προς μελέτη οστών. Τα εργαλεία ήταν όλα αποστειρωμένα για τουλάχιστον 2 ώρες στους 250°C. Τα οστά που ελήφθησαν προέρχονται από τις εξής περιοχές:

- 1) αριστερό και δεξί βραχιόνιο
- 2) αριστερό και δεξί μηρό
- 3) αριστερή και δεξιά κνήμη
- 4) αριστερή και δεξιά πλευρά

Οι αντίστοιχες περιοχές για τα δύο είδη ζώων (επίμυες και κόνικλοι) απεικονίζονται στην εικόνα 2.1α,β.



(α)



Εικόνα 2.1 α) Σκελετικό σύστημα επίμου όπου εμφανίζονται τα οστά του μηρού, της κνήμης, του βραχιόνιου και των πλευρών.
β) Σκελετικό σύστημα κονίκλου όπου εμφανίζονται τα οστά του μηρού, της κνήμης, του βραχιόνιου και των πλευρών.

2.3 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΟΣΤΩΝ ΠΡΟΣ ΜΕΛΕΤΗ

2.3.1 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΟΣΤΩΝ

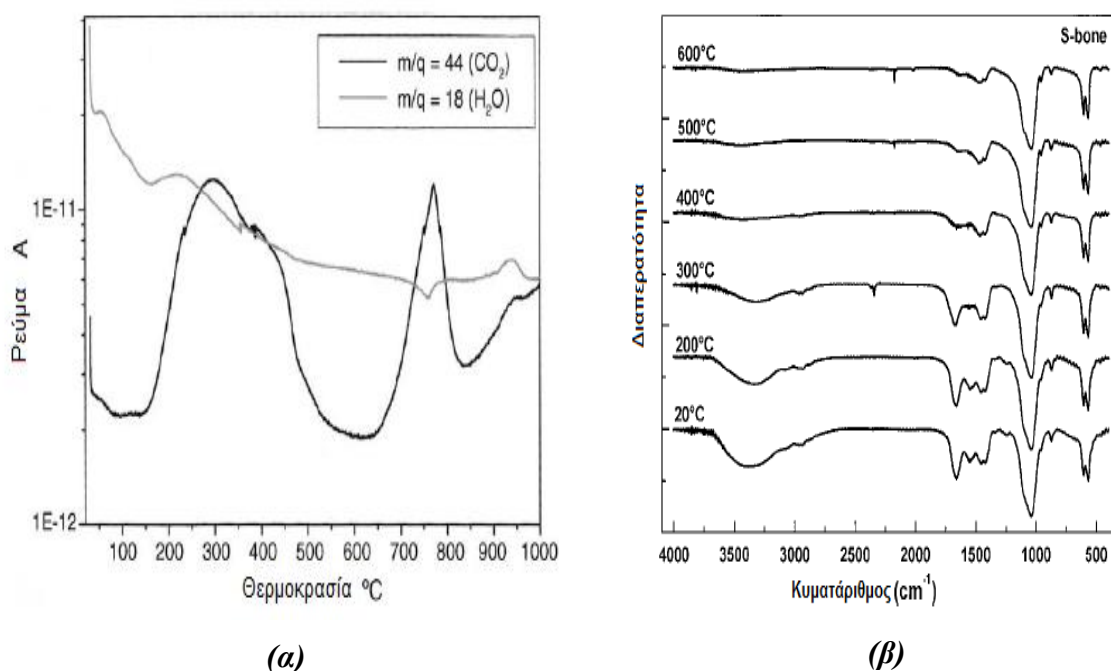
Τα προς μελέτη οστά μετά την εξαγωγή και αφού καθαρίστηκαν από τους ιστούς με τη χρήση αποστειρωμένου νυστεριού, τοποθετήθηκαν σε διπλά αποσταγμένο ύδωρ για 24 ώρες. Για τον καθαρισμό των οστών έγιναν επανειλημμένα πειράματα με διαφορετικές μεθόδους, ώστε να επιτευχθεί η καλύτερη και χωρίς αλλοίωση των αποτελεσμάτων αφαίρεση των ιστών καθώς και του μυελού με σκοπό την εισαγωγή τους στο υπέρ – υψηλό κενό (UHV) του θαλάμου Auger. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για τον καθαρισμό είναι τα εξής:

- 1) Εξαγωγή από το ύδωρ και καθαρισμός της επιφάνειάς τους από τους προσκολλημένους ιστούς με τη χρήση αποστειρωμένου νυστεριού.
- 2) Με τη βοήθεια ηλεκτρικού κόπτη αφαιρέθηκαν από το οστό οι επιφύσεις ώστε να μείνει μόνο το συμπαγές οστό.
- 3) Το συμπαγές οστό τοποθετήθηκε σε φυγόκεντρο (2500 rpm για 15 λεπτά) ώστε να αφαιρεθεί ο μυελός των οστών, το λίπος και τα υπόλοιπα υγρά.
- 4) Έκπλυση με αποσταγμένο ύδωρ.

2.3.2 ΞΗΡΑΝΣΗ ΟΣΤΩΝ

Το ύδωρ που περιέχεται στα οστά είναι αυτό που εμποδίζει την εισαγωγή των δειγμάτων στον UHV θάλαμο Auger. Για το λόγο αυτό πρέπει να αφαιρεθεί κάθε ίχνος υγρασίας από το οστό. Η αφαίρεση του ύδατος από τα οστά πρέπει να γίνει με τρόπο ώστε να μην αλλοιώνεται η χημική τους σύσταση και να είναι όσο το δυνατόν πιο κοντά στην αρχική τους (φυσιολογική) κατάσταση. Έτσι, δοκιμαστικά συμπαγή οστά τοποθετήθηκαν σε φούρνο με αρχική θερμοκρασία των 50°C η οποία σταδιακά αύξανε, ενώ μεγάλωνε η παραμονή τους σε αυτόν. Στη συνέχεια τοποθετούνταν στον προθάλαμο του Auger όπου δοκιμαζόταν η επίτευξη ή μη κενού. Η αποτυχία κενού σήμαινε την παρουσία ύδατος. Η προκαταρκτική αυτή διεργασία κατέληξε στη θερμοκρασία ξήρανσης 140°C και για παραμονή των οστών στο φούρνο για 4 μέρες.

Σύμφωνα με έρευνες, μέχρι τη θερμοκρασία των 200°C μπορεί να αφαιρεθεί το ύδωρ από τα οστά χωρίς να επηρεάζεται το οργανικό μέρος [45], [84], όπως παρατηρείται και στα γραφήματα 2.1α,β για μελέτη φασματοσκοπίας μάζας σε οστά χοίρων και φασματοσκοπίας υπερύθρου σε ανθρώπινα οστά. Από το γράφημα του φασματογράφου μάζας (Γράφημα 2.1α) διαπιστώνεται ότι μέχρι τη θερμοκρασία των 200°C υφίσταται μεγάλη ελάττωση της μάζας του ύδατος ενώ περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί μικρότερη απώλεια ύδατος με ταυτόχρονη όμως αλλοίωση και απώλεια του οργανικού μέρους των οστών (αύξηση κορυφών CO₂). Στη φασματοσκοπία υπερύθρου (Γράφημα 2.1β) παρατηρείται μείωση της κορυφής του OH⁻ (3400cm⁻¹) στους 200°C που συνεπάγεται απώλεια ύδατος χωρίς αλλοίωση των κορυφών των οργανικών ενώσεων (1600 – 400 cm⁻¹) η οποία όμως παρατηρείται σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες.



Γράφημα 2.1 α) Γράφημα φασματοσκοπίας μάζας από οστά χοίρων σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία. Παρατηρείται η ελάττωση της μάζας του ύδατος μέχρι τη θερμοκρασία των 200 °C ενώ παράλληλα περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί παραγωγή CO₂ που σημαίνει την απώλεια σε οργανικό μέρος του οστού [45].

β) Γράφημα φασματοσκοπίας υπερύθρου σε ανθρώπινα οστά σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία. Στα 3400 cm⁻¹ εμφανίζεται η κορυφή του OH όπου παρατηρείται ελάττωσή της με αύξηση της θερμοκρασίας. Στα 1600 – 400cm⁻¹ εμφανίζονται οι κορυφές των οργανικών ενώσεων όπου παρατηρείται έντονη μεταβολή τους για θερμοκρασία μεγαλύτερη των 200 °C [84].

2.3.3 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΡΟΣ ΜΕΛΕΤΗ

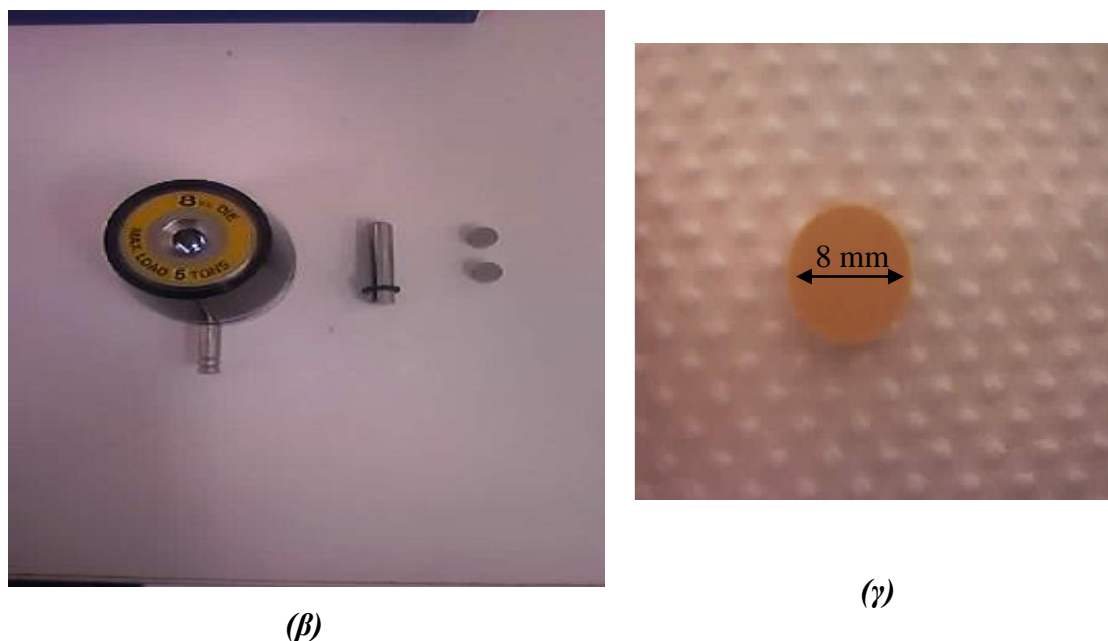
Στόχος της μελέτης του λόγου Ca/P στα οστά ήταν να μελετηθεί όλο το επιλεγόμενο οστό και όχι ένα μόνο μέρος του. Έτσι, για να υπάρχει ομογενοποίηση του οστού ώστε να μην επηρεάζεται ο λόγος Ca/P από την περιοχή του οστού, τα οστά κονιοροποιήθηκαν με αχάτινο ιγδίο. Στη συνέχεια επιλέχτηκε μια ικανή ποσότητα σκόνης, 250 mg, ώστε να δημιουργηθεί μια ομοιόμορφη παστίλια (pellet). Επιπλέον σύμφωνα με έρευνες [125] περιοχές των συμπαγών οστών εμφανίζουν αυξημένη απορρόφηση άνθρακα λόγω των «ευκίνητων» επιφανειακών ενώσεων ασβεστίου στον

απατίτη [118]. Με την κονιορτοποίηση απαλείφεται η πιθανότητα να επιλεγεί μια τέτοια περιοχή.

Η παστίλια παρασκευάστηκε με τη χρήση κατάλληλου καλουπιού μέσα στο οποίο τοποθετήθηκε η σκόνη και μέσω μιας υδραυλικής πρέσας, του Εργαστηρίου Ιατρικής Φυσικής της Εταιρείας Specac, υπό πίεση 3 – 4 tons (Εικόνα 2.2α,β). Έτσι από κάθε οστό παρασκευάστηκε παστίλια διαμέτρου 8 mm και πάχους 2 mm (Εικόνα 2.2γ). Οι διαστάσεις της παστίλιας είναι κατάλληλες για την τοποθέτησή της στους δειγματοφορείς του SEM και του Auger.



(α)



Εικόνα 2.2 α) Υδραυλική πρέσα του εργαστηρίου Ιατρικής Φυσικής όπου η σκόνη του οστού συμπιέζεται υπό πίεση 3 tons.
β) Καλούπι παστίλιας 8 mm όπου τοποθετείται η σκόνη του οστού.
γ) Παστίλια οστού διαμέτρου 8 mm.

2.4. ΠΡΟΚΛΗΤΗ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗ – ΜΕΘΟΔΟΣ IMO

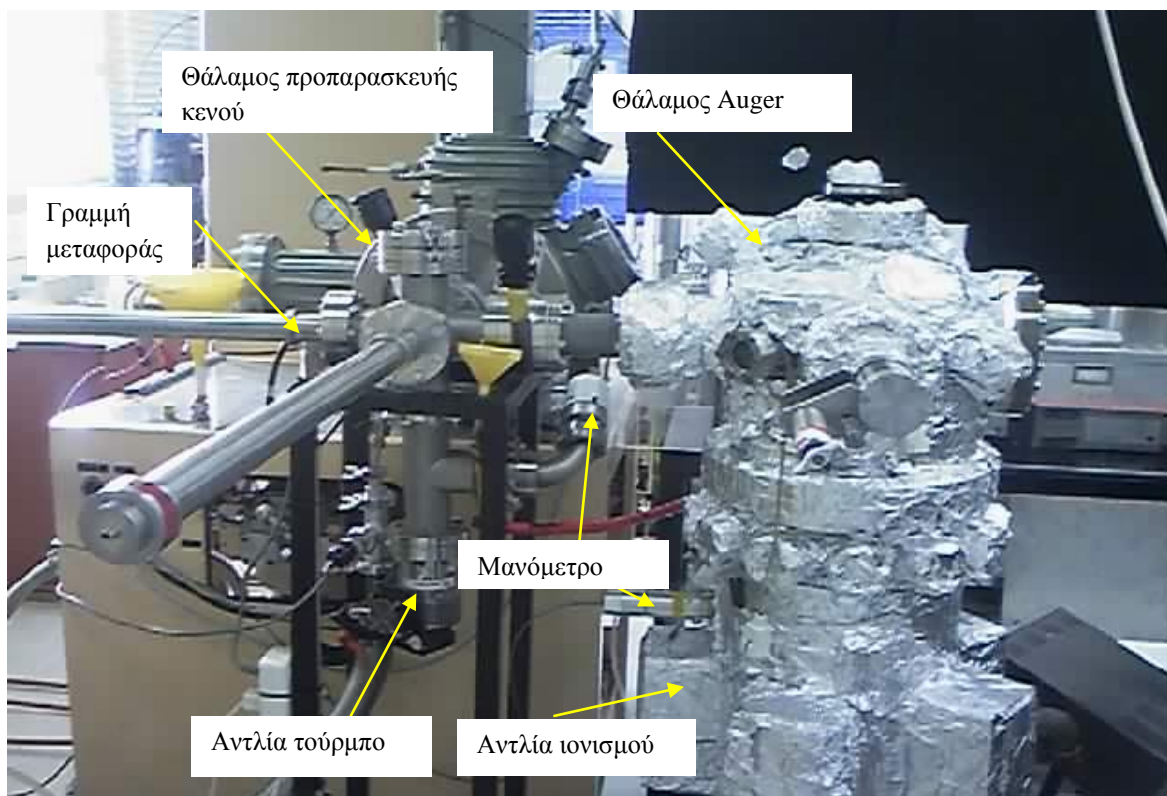
Για τη μελέτη των αλλαγών στα οστεοπορωτικά οστά, προκλήθηκε στην ομάδα των 5 θηλυκών κονίκλων οστεοπόρωση με τη μέθοδο IMO (Inflammation – Mediated Osteoporosis). Η μέθοδος αυτή βασίζεται σε διεθνώς αναγνωρισμένο πρωτόκολλο πρόκλησης οστεοπόρωσης σε πειραματόζωα [48]. Με τη μέθοδο IMO προκαλείται οστεοπόρωση με ενέσιμη χορήγηση πυριτικού μαγνησίου (magnesium silicate ή talc). Το μαγνήσιο αντικαθιστά το ασβέστιο με αποτέλεσμα αλλαγή στο μεταβολισμό των οστών, προκαλώντας οστεοπόρωση. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε με βάση τη μέθοδο IMO είναι το εξής:

- 1) Τα ζώα αρχικά ζυγίζονται.
- 2) Προετοιμάζεται το σκεύασμα για την ενέσιμη χορήγηση του πυριτικού μαγνησίου. Το σκεύασμα περιλαμβάνει διάλυμα πυριτικού μαγνησίου (talc) σε φυσιολογικό ορό (sodium chloride 0,9%). Η ποσότητα του πυριτικού μαγνησίου που απαιτείται είναι 2 gr για κάθε Kg ζώου. Πριν την ανάμιξη με τον ορό, το πυριτικό μαγνήσιο

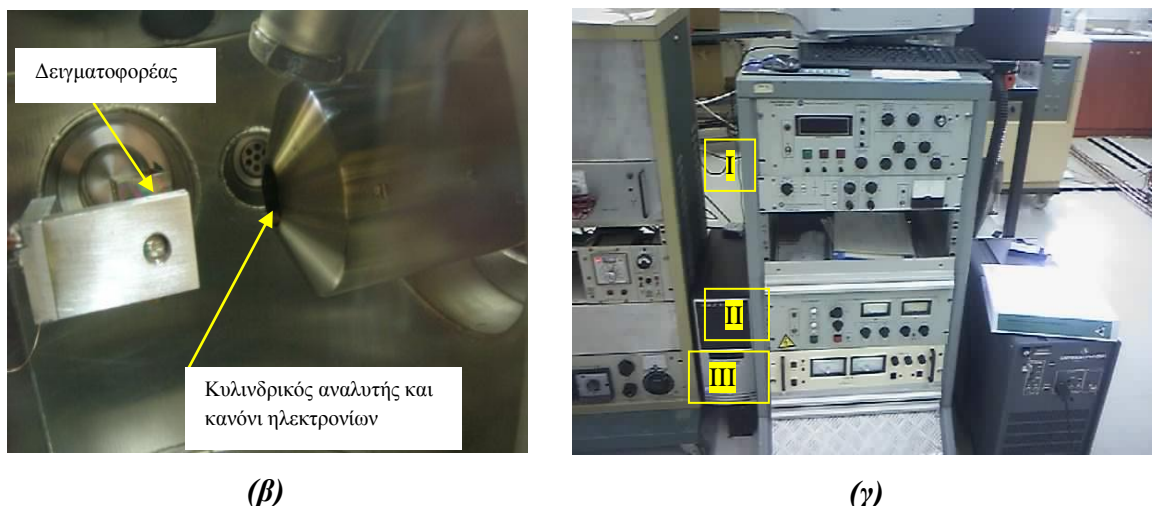
- αποστειρώνεται σε φούρνο στους 160°C για 1 ώρα. Στη συνέχεια παρασκευάζεται το διάλυμα με πυκνότητα 1gr πυριτικού μαγνησίου ανά 2,5 gr φυσιολογικού ορού.
- 3) Το διάλυμα τοποθετείται σε σύριγγες με βελόνα των 21 – gauge και χορηγείται υποδόρια στη ραχιαία περιοχή των ζώων. Η ποσότητα ισοκατανέμεται σε όλη τη ράχη. Τα σημεία που χορηγείται η ένεση απολυμαίνονται με οινόπνευμα 70%.
 - 4) Σε όλα τα ζώα γίνεται ένεση την ίδια μέρα και στη συνέχεια παραμένουν στο χώρο του εκτροφείου για 20 μέρες όπου σιτίζονται κανονικά.
 - 5) Την 21 μέρα τα ζώα θανατώνονται με αναισθησία, ζυγίζονται και γίνεται η εξαγωγή των οστών.

2.5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΤΑΞΗ AUGER

Οι μετρήσεις του λόγου Ca/P με τη φασματοσκοπία Auger πραγματοποιήθηκαν στη διάταξη φασματοσκοπίας Auger του Τμήματος Φυσικής. Η διάταξη παρουσιάζεται στην εικόνα 2.3.



(α)



Εικόνα 2.3 α) Διάταξη Auger που αποτελείται από: το θάλαμο προπαρασκευής κενού της τάξης του $10^{-7} - 10^{-8}$ mbar με τη χρήση μηχανικής αντλίας (rotary pump) και αντλίας τούρμπο (turbo pump), τη γραμμή μεταφοράς του δείγματος υπό κενό στο θάλαμο Auger και το θάλαμο Auger υπό συνεχές κενό μικρότερο του 5×10^{-9} mbar με τη χρήση αντλίας ιονισμού (ion pump). β) Εσωτερικό θαλάμου Auger όπου τοποθετείται ο δειγματοφορέας και μπροστά από αυτόν βρίσκεται το κανόνι ηλεκτρονίων με τον κυλινδρικό αναλυτή. γ) Μονάδα έλεγχου: I) του αναλυτή και II) του νήματος για την εκπομπή της αρχικής δέσμης ηλεκτρονίων, III) ενισχυτής σήματος.

Όπως απεικονίζεται, η διάταξη αποτελείται από ένα θάλαμο προπαρασκευής κενού, το θάλαμο Auger, τη διάταξη ελέγχου των παραμέτρων μέτρησης, τα μανόμετρα παρακολούθησης του κενού και τον Η/Υ όπου απεικονίζεται το φάσμα.

Αρχικά το δείγμα τοποθετείται στο δειγματοφορέα και μετά στο θάλαμο προπαρασκευής κενού. Στο θάλαμο αυτό επιτυγχάνεται κενό της τάξης του $10^{-7} - 10^{-8}$ mbar με τη χρήση μιας μηχανικής αντλίας (rotary pump) και μιας αντλίας τούρμπο (turbo pump). Στη συνέχεια μέσω μιας γραμμής μεταφοράς, ο δειγματοφορέας τοποθετείται στο θάλαμο Auger, ο οποίος βρίσκεται συνεχώς υπό κενό μικρότερο του 5×10^{-9} mbar. Εάν η ένδειξη του μανομέτρου είναι μεγαλύτερη από αυτή την τιμή σημαίνει ότι υπάρχουν ξένες προσμίξεις είτε στο δείγμα είτε στο εσωτερικό του θαλάμου. Οι τυχόν προσμίξεις μπορεί να επηρεάσουν τη λειτουργία του νήματος ηλεκτρονίων ή να αλλοιώσουν τη μέτρηση. Το κενό του θαλάμου Auger ρυθμίζεται μέσω μιας αντλίας ιονισμού (ion pump) βοηθούμενης από μια κρυοπαγίδα υγρού αζώτου προσαρμοσμένης στο επίπεδο του θαλάμου. Εφόσον απαιτείται ακόμη καλύτερο κενό χρησιμοποιείται επιπλέον μια αντλία τιτανίου. Στο

θάλαμο Auger είναι προσαρμοσμένο το κανόνι ηλεκτρονίων με τον κυλινδρικό αναλυτή, όπως φαίνεται από το εσωτερικό του θαλάμου της εικόνας 2.3β. Το δείγμα τοποθετείται κάθετα στη δέσμη ηλεκτρονίων.

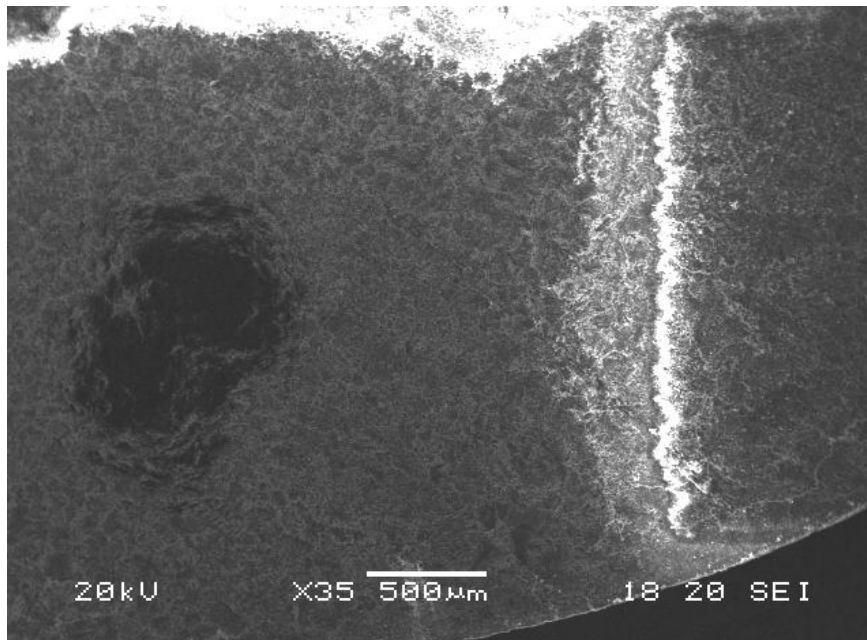
Τόσο το νήμα ηλεκτρονίων όσο και ο αναλυτής ρυθμίζονται από τη μονάδα ελέγχου της εικόνας 2.3γ, η οποία αποτελείται από τρεις τομείς. Ο πρώτος τομέας ελέγχει την τάση στις πλάκες του αναλυτή και καθορίζει το εύρος ανίχνευσης των ηλεκτρονίων Auger. Ο δεύτερος ρυθμίζει την εκπομπή των ηλεκτρονίων από το νήμα καθώς και την επιτάχυνσή τους. Ενώ ο τρίτος τομέας καθορίζει την ενίσχυση του σήματος του αναλυτή. Το φάσμα καταγράφεται μέσω του Η/Υ με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η ενεργητικότητα της δέσμης προκαλεί αλλοιώσεις στην επιφάνεια του δείγματος όπως αποσύνθεση, οξειδωση, διάχυση και θέρμανση. Οι αλλοιώσεις αυτές έχουν αντίκτυπο στο φάσμα και προκαλούν αλλαγές στις κορυφές των στοιχείων του φάσματος [22], [95]. Ιδιαίτερα στα μη αγώγιμα βιολογικά δείγματα τα φαινόμενα αυτά είναι εντονότερα [98]. Ειδικότερα στον υδροξυαπατίτη η εκτεταμένη παρουσία του φωσφόρου κατά την αλληλεπίδραση της δέσμης προκαλεί εξάχνωση του φωσφόρου στο σημείο εστίασης [87]. Για αποφυγή των παραπάνω, οι Van Raemdonck W. et al (1984) [133] ορίζουν ως κατώφλι ενέργειας στο σημείο εστίασης της δέσμης τα $5 \times 10^{-2} \text{ A/cm}^2$.

Συνεπώς για τις μετρήσεις, η ενέργεια της δέσμης ηλεκτρονίων ρυθμίστηκε στα 1 keV ενώ το ρεύμα ηλεκτρονίων στα 0,5 mA. Η εστία της δέσμης στο δείγμα είναι ελλειψοειδούς σχήματος με το μεγαλύτερο άξονα σε μήκος 1 mm. Η περίοδος σάρωσης των ενεργειών στον αναλυτή είναι 5 min με βήμα 1 eV/sec. Κατά συνέπεια η συνολική ενέργεια της δέσμης στο σημείο εστίασης είναι μικρότερη από το κατώφλι ενέργειας και η αλλοίωση στις κορυφές του φάσματος δεν είναι σημαντική. Το φάσμα καταγράφεται υπό μορφή $d(N(E))/dE$ στον Η/Υ και η ένταση στο φάσμα μετράται από κορυφή σε κορυφή.

2.6. ΕΝΑΠΟΘΕΣΗ ΑΝΘΡΑΚΑ ΓΙΑ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΣΤΟ SEM

Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 1.2.2.2 τα βιολογικά δείγματα δεν είναι αγώγιμα με αποτέλεσμα τη συσσώρευση φορτίου στην επιφάνειά τους, ενώ η ενεργητικότητα της δέσμης ηλεκτρονίων προκαλεί αλλοιώσεις στην επιφάνεια και πολλές φορές εξάχνωσή της [30], [31]. Έτσι, πριν τη μελέτη των δειγμάτων στο SEM γίνεται εναπόθεση στην επιφάνειά τους ενός μετάλλου με τη μέθοδο της εξάχνωσης. Τα μέταλλα που εξαχνώνονται είναι συνήθως χρυσός (Au) ή άνθρακας (C). Χαρακτηριστική βλάβη που προκαλεί η ενεργητικότητα της δέσμης, είναι η εικόνα 2.4, όπου απεικονίζεται η βλάβη στην επιφάνεια μιας παστίλιας οστού χωρίς την εναπόθεση κάποιου μετάλλου.

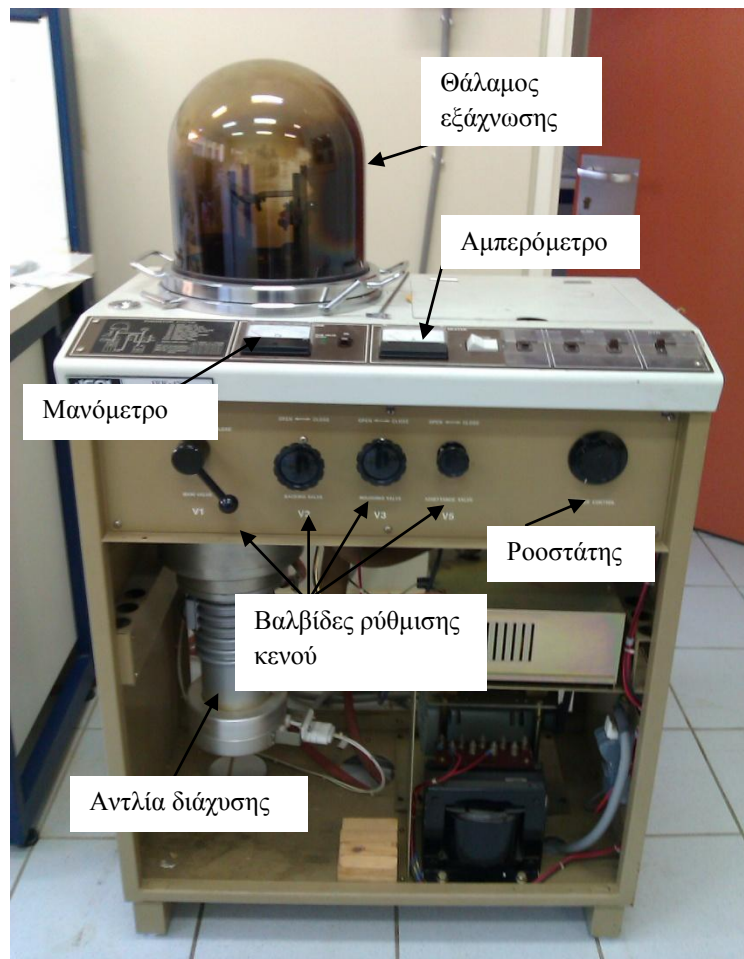


Εικόνα 2.4 Βλάβη στην επιφάνεια οστού (παστίλια) εξαιτίας της ενεργητικότητας της δέσμης.

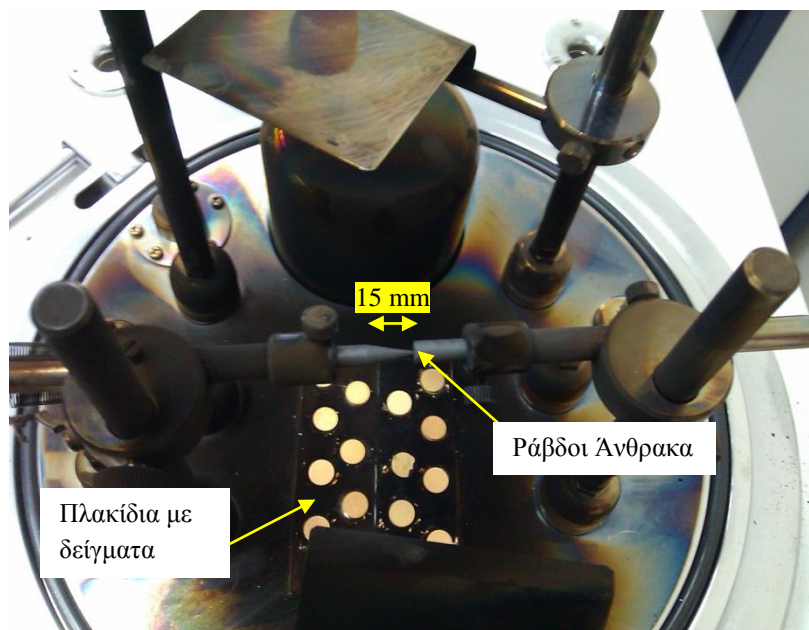
Για το λόγο αυτό και για καλύτερη απεικόνιση των λεπτομερειών της επιφάνειας των οστών, στα δείγματα, πριν τη μελέτη τους στο SEM, έγινε εναπόθεση λεπτού στρώματος C. Ο λόγος για τον οποίο επιλέχθηκε C και όχι Au είναι ότι κατά τη φασματοσκοπική μελέτη η κορυφή του άνθρακα δεν επικαλύπτεται με καμία από τις κορυφές του ασβεστίου (Ca) και του φωσφόρου (P). Η κορυφή του C για την $K_{\alpha 1}$ μετάβαση εμφανίζεται στα 277 eV, ενώ του Ca και του P για την ίδια μετάβαση στα 2,01

keV και 3,69 keV αντίστοιχα. Αντίθετα, παρόλο που οι κορυφές του Au για τις $K_{\alpha 1}$ μεταβάσεις εμφανίζονται πολύ ψηλά, παρουσιάζει κορυφή για τη $M_{\alpha 1}$ μετάβαση στα 2,12 keV που επικαλύπτεται με αυτή του Ca.

Η εναπόθεση του άνθρακα πραγματοποιήθηκε με εξάχνωση στη διάταξη Physical Vapor Deposition (PVD) του Εργαστηρίου Ιατρικής Φυσικής της Εταιρείας JEOL JEE – 4X όπως αυτή φαίνεται στην εικόνα 2.5α.



(α)



(β)

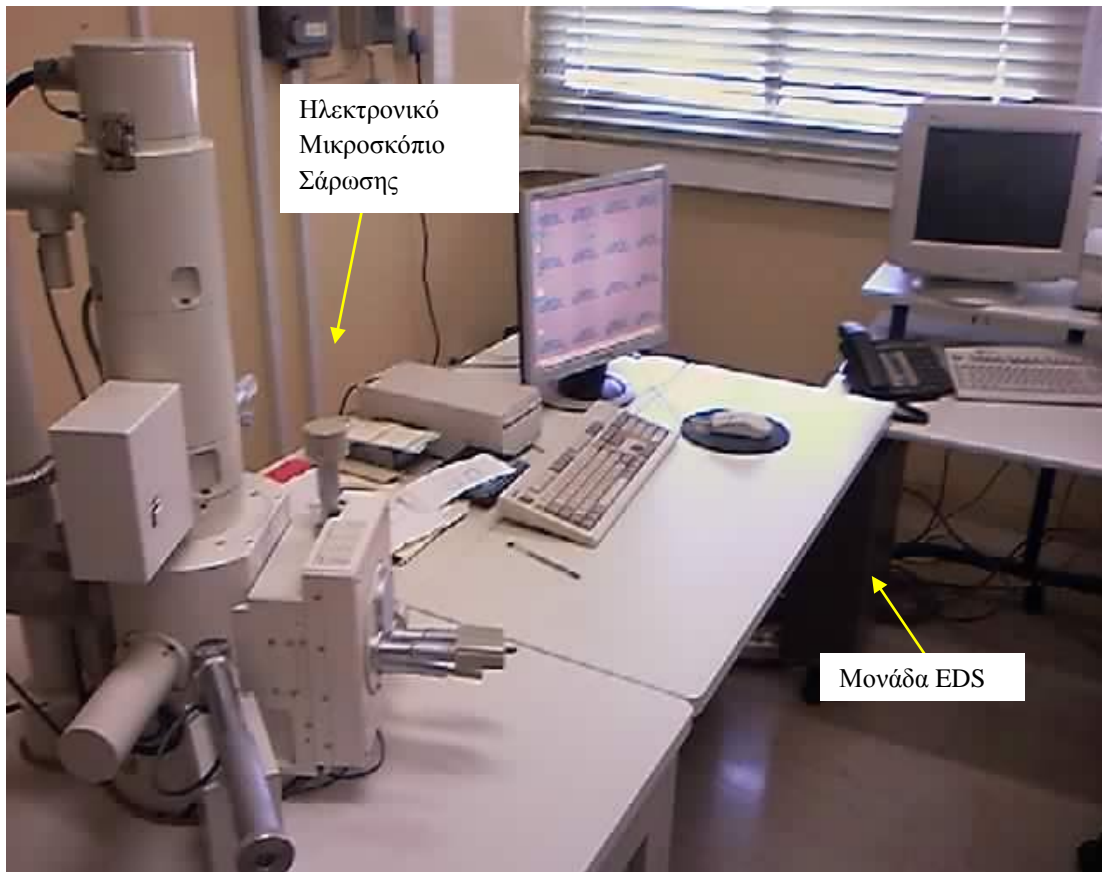
Εικόνα 2.5 α) Διάταξη εξάχνωσης άνθρακα (PVD) της Εταιρείας JEOL JEE – 4X.
β) Εσωτερικό του θαλάμου εξάχνωσης.

Η διάταξη, όπως απεικονίζεται, αποτελείται από ένα θάλαμο υπό κενό της τάξης του 10^{-4} – 10^{-3} mbar συνδεδεμένο με τις αντλίες κενού. Η ύπαρξη κενού είναι απαραίτητη για την επικάλυψη των δειγμάτων με άνθρακα χωρίς ξένες προσμίξεις και επιπλέον η απουσία οξυγόνου προκαλεί εξάχνωση και όχι ανάφλεξη. Για την επίτευξη του κενού χρησιμοποιούνται δύο ειδών αντλίες συνδεδεμένες διαδοχικά, όπως φαίνεται και στην εικόνα 2.5, μιας μηχανικής αντλίας (rotary pump) και μιας αντλίας διάχυσης (diffusion pump).

Στο εσωτερικό του θαλάμου τοποθετούνται τα δείγματα πάνω σε πλακίδια (Εικόνα 2.5β) και πάνω από αυτά στερεώνονται δύο ράβδοι άνθρακα (carbon rods). Η μια ράβδος είναι επίπεδη, ενώ στην άλλη που εφάπτεται δημιουργείται αιχμή μήκους 15 mm. Έτσι αφού δημιουργηθεί το κενό, μέσω ενός ροοστάτη διαπερνά τις ράβδους ρεύμα έντασης 40A που προκαλεί ηλεκτρική εκκένωση στην αιχμή με αποτέλεσμα την εξάχνωση του C. Το πάχος της εναπόθεσης στα δείγματα ρυθμίζεται από την απόσταση των ράβδων από τα δείγματα καθώς και από τη διάρκεια της εξάχνωσης.

2.7 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΤΑΞΗ SEM – EDS

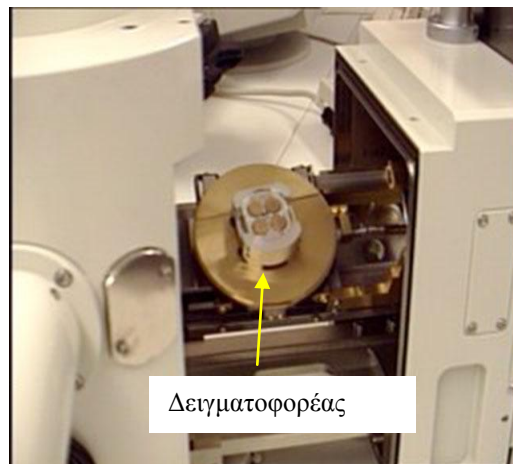
Για τη μικροσκοπική ανάλυση των οστών, αλλά και για τη μέτρηση του λόγου Ca/P με τη φασματοσκοπία EDS χρησιμοποιήθηκε η μονάδα SEM του Τμήματος Χημείας. Η διάταξη της μονάδας φαίνεται στην εικόνα 2.6.



(α)



(β)



(γ)

Εικόνα 2.6 α) Μονάδα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης τύπου JEOL JSM-5600 εφοδιασμένο με τον ανιχνευτή ακτίνων - X τύπου Link ISIS 300.
β) Θάλαμος κενού του μικροσκοπίου σάρωσης με τη στήλη του μικροσκοπίου και τους ανιχνευτές των ηλεκτρονίων.
γ) Εσωτερικό του θαλάμου του μικροσκοπίου σάρωσης.

Όπως απεικονίζεται, η μονάδα SEM (Εικόνα 2.6α) αποτελείται από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης τύπου JEOL JSM-5600 εφοδιασμένο με τον ανιχνευτή ακτίνων – X τύπου Link ISIS 300 της Εταιρείας OXFORD Instruments.

Το SEM περιλαμβάνει το θάλαμο όπου τοποθετούνται τα δείγματα υπό κενό πάνω σε ειδικό δειγματοφορέα (Εικόνα 2.6γ). Πάνω στο θάλαμο είναι προσαρμοσμένη η στήλη του μικροσκοπίου, ενώ είναι εφοδιασμένος με τους ανιχνευτές ακτίνων – X και δευτερογενών ηλεκτρονίων (Εικόνα 2.6β). Το κενό της τάξης του 10^{-4} mbar στο θάλαμο επιτυγχάνεται με τη χρήση μιας μηχανικής αντλίας και μιας αντλίας διάχυσης. Ο θάλαμος περιλαμβάνει ακόμα τους μεταφορείς κίνησης του δειγματοφορέα με δυνατότητα μετακίνησης μερικών μικρών στις τρεις διαστάσεις καθώς και περιστροφής του. Η όλη λειτουργία του SEM όπως η ρύθμιση του κενού, η επιτάχυνση των ηλεκτρονίων και η διάμετρος της δέσμης γίνεται με τη χρήση H/Y. Επίσης στον H/Y εμφανίζεται η εικόνα των δειγμάτων που δημιουργείται με την ανίχνευση των δευτερογενών ηλεκτρονίων ενώ καθαρίζονται και οι ρυθμίσεις της απεικόνισης όπως η μεγέθυνση, η εστίαση και η περιοχή παρατήρησης. Με το SEM επιτυγχάνεται μια ευρεία ζώνη μεγεθύνσεων από X35 – X300.000. Η διακριτική του ικανότητα φτάνει τα 3,5 mm. Επιπλέον παρέχει τη δυνατότητα πληροφορίας για το τοπογραφικό ανάγλυφο του δείγματος μέσω της εικόνας οπισθοσκεδαζόμενων ηλεκτρονίων.

Η λειτουργία του ανιχνευτή ακτίνων – X ρυθμίζεται από ένα δεύτερο H/Y όπου αποτυπώνεται το φάσμα των ακτίνων – X ενώ ταυτόχρονα παρέχεται η στοιχειακή ανάλυση του δείγματος και υπολογίζεται, αυτόματα, η συγκέντρωση του κάθε στοιχείου. Η πληροφορία μεταφέρεται μέσω της σύνδεσης του ανιχνευτή με τον H/Y του SEM και έτσι επιτυγχάνεται η *in situ* μελέτη των περιοχών του δείγματος. Η δυνατότητα ανίχνευσης περιλαμβάνει πολύ ελαφρά στοιχεία μέχρι και το βόριο ($Z > 5$). Κατά τη μέτρηση της συγκέντρωσης των στοιχείων παρέχεται αυτόματα η διόρθωση ZAF μέσω λογισμικού (SEMQuant, Oxford Instruments).

Για τις μετρήσεις, η ενέργεια της δέσμης ηλεκτρονίων ήταν 20 keV ενώ η απόσταση του δείγματος από το κανόνι ηλεκτρονίων 20 mm. Η μεγέθυνση που χρησιμοποιήθηκε είναι X35 ώστε να συλλέγονται ακτίνες – X από μια ευρύτερη περιοχή του δείγματος. Ο χρόνος έκθεσης του δείγματος στη δέσμη προσαρμόστηκε στα 60 sec ώστε να ελαχιστοποιηθούν αλλοιώσεις στην επιφάνεια των δειγμάτων προερχομένων από την επίδραση της δέσμης [13].

2.8 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση H/Y και κατάλληλου στατιστικού πακέτου. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε είναι το GRAPH PAD PRISM της Εταιρείας GRAPHPAD Software, San Diego, CA, USA. Τα αποτελέσματα αναγράφονται ως μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση (M.O. \pm S.D.). Ο έλεγχος των αποτελεσμάτων ως προς την κανονικότητα έγινε με το D' Agostino – Pearson τεστ κανονικότητας. Για τον έλεγχο της σημαντικότητας των διαφορών των αποτελεσμάτων έγινε χρήση του μη παραμετρικού t – test και της ανάλυσης της μεταβλητότητας (one – way analysis of variance – ANOVA). Το όριο σημαντικότητας των διαφορών των αποτελεσμάτων ορίστηκε για $P \leq 0,05$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

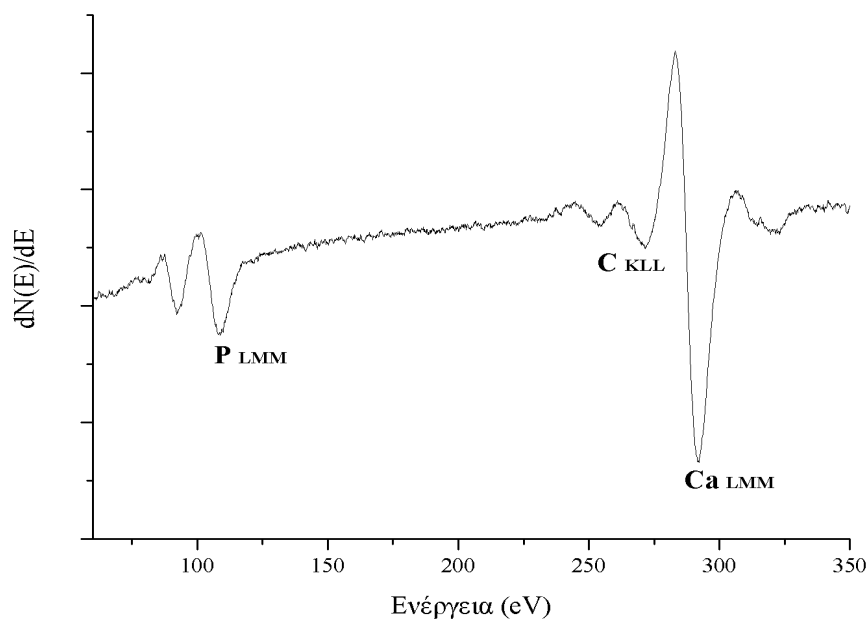
3.1 ΜΕΛΕΤΗ ΛΟΓΟΥ Ca/P ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΟΣΤΑ

Αρχικά η μελέτη στηρίχτηκε στη μέτρηση του λόγου Ca/P σε φυσιολογικά οστά διαφόρων ειδών ζώων μέσω της φασματοσκοπίας Auger και EDS. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων αφορά την εξάρτηση του λόγου από τις διαφορετικές θέσεις των οστών και ηλικιών του ίδιου πειραματόζωου και στη συνέχεια από το είδος του πειραματόζωου.

3.1.1 ΜΕΤΡΗΣΗ ΛΟΓΟΥ Ca/P ΣΤΟΥΣ ΕΠΙΜΥΕΣ

3.1.1.1 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ AUGER

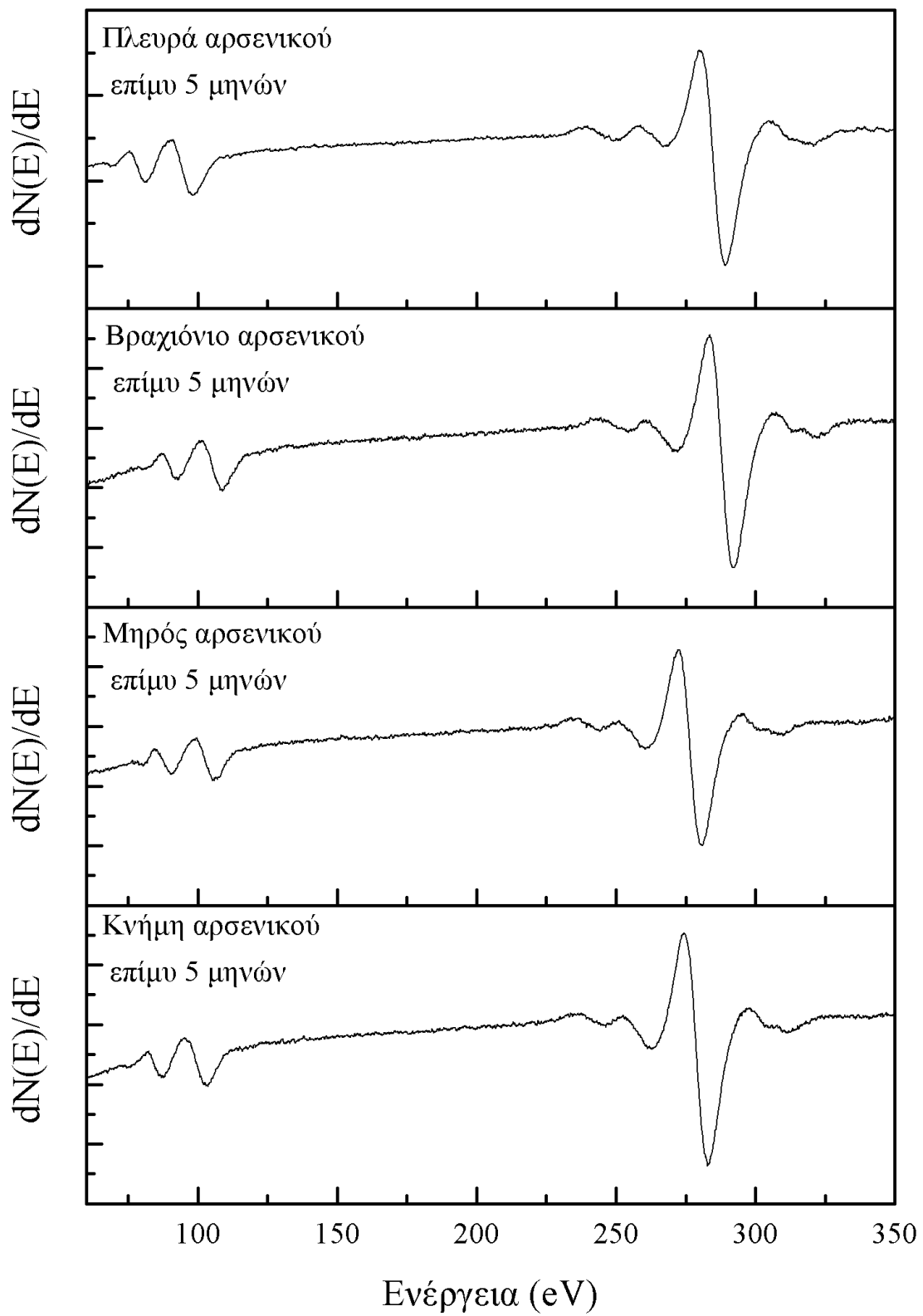
Τα συμπαγή οστά των επίμυων, δηλαδή κνήμη, μηρός και βραχιόνιο, καθώς και τα σπογγώδη των πλευρών τους, αφού επεξεργάστηκαν θερμικά, μορφοποιήθηκαν σε παστίλιες (Βλ. υλικά και μέθοδοι) των οποίων μετρήθηκε ο λόγος Ca/P με φασματοσκοπία Auger. Χαρακτηριστικό φάσμα Auger ομογενοποιημένης παστίλιας συμπαγούς οστού κνήμης αρσενικού επίμυος 14 μηνών είναι αυτό του γραφήματος 3.1.



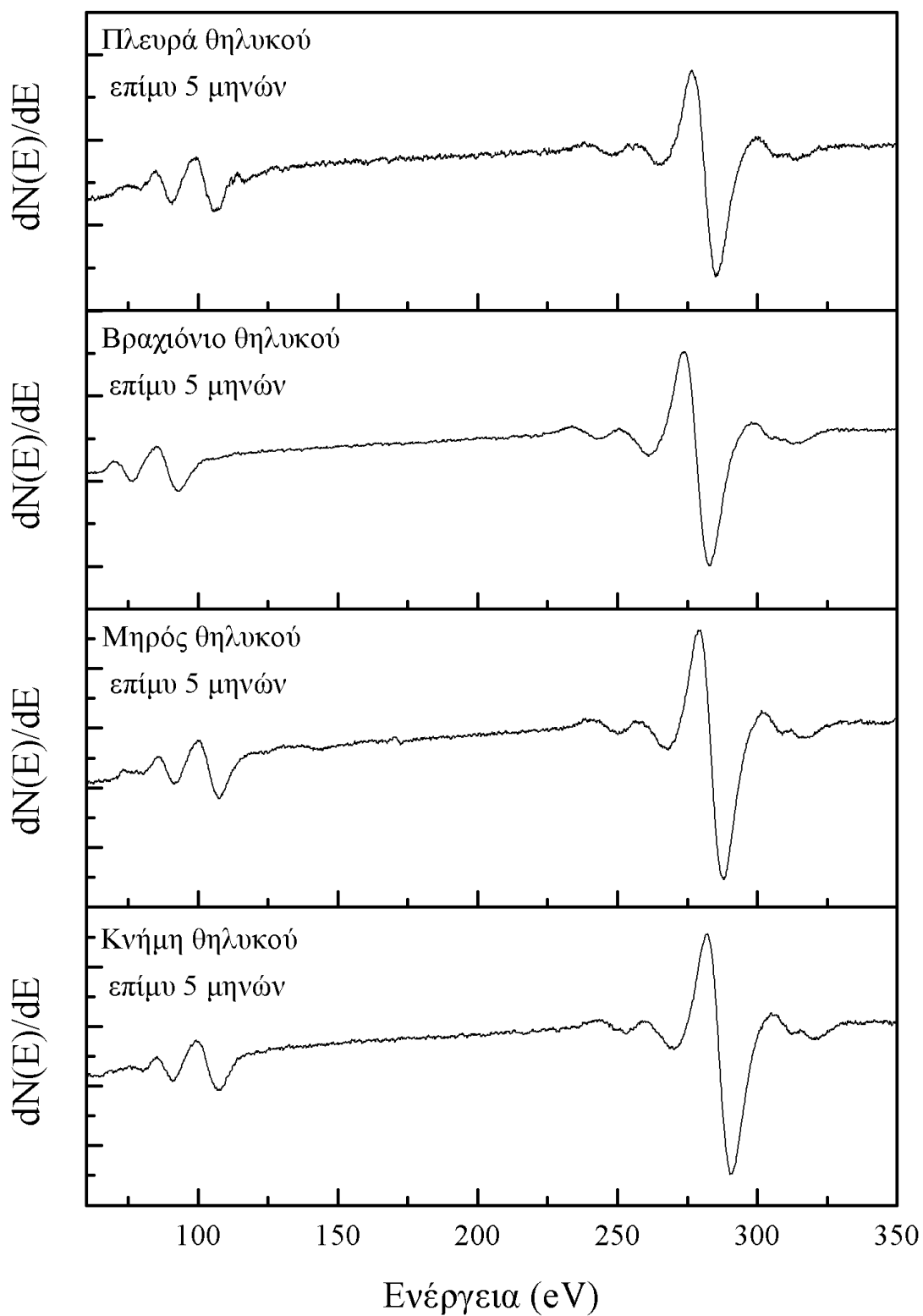
Γράφημα 3.1 Φάσμα Auger παστίλιας συμπαγούς οστού κνήμης αρσενικού επίμυ 14 μηνών.

Το φάσμα είναι υπό τη μορφή $dN(E)/dE$ για την ελαχιστοποίηση του θορύβου που οφείλεται στην ανελαστική σκέδαση των δευτερογενών ηλεκτρονίων όπως συζητήθηκε στην εισαγωγή. Παρόμοια φάσματα δίνουν όλα τα οστά, των προς εξέταση ζώων. Στα παρακάτω γραφήματα 3.2, 3.3 και 3.4 απεικονίζονται ενδεικτικά τα φάσματα Auger για τα οστά αρσενικών και θηλυκών επίμυων και των δύο ηλικιών καθώς και μεταξύ δεξιού και αριστερού μέρους. Συγκεκριμένα στα γραφήματα 3.2 γίνεται σύγκριση των φασμάτων συμπαγών οστών διαφόρων θέσεων, καθώς και μεταξύ σπογγώδους και συμπαγούς οστού για αρσενικά πειραματόζωα (Γράφημα 3.2α) και θηλυκά (Γράφημα 3.2β)

Από τα φάσματα παρατηρείται ότι όλα είναι παρόμοια με αυτό του γραφήματος 3.1. Παρατηρούνται ωστόσο κάποιες διαφορές οι οποίες κυρίως έγκεινται στο σχετικό ύψος των κορυφών των δύο στοιχείων (Ca και P), αλλά όχι στη θέση των κορυφών. Έτσι, σε όλα τα φάσματα η κορυφή του ασβεστίου (Ca), για τη μετάβαση LMM, εμφανίζεται στα 280 – 290 eV. Στα 90 – 110 eV εμφανίζεται η κορυφή του φωσφόρου (P) για τη μετάβαση LMM. Στα 260 eV παρατηρείται η κορυφή του άνθρακα (C) για την KLL μετάβαση. Η αλληλοεπικάλυψη των κορυφών ασβεστίου και άνθρακα δεν είναι σημαντική, ο δε άνθρακας προέρχεται από την ανθρακική συνεισφορά στον απατίτη.

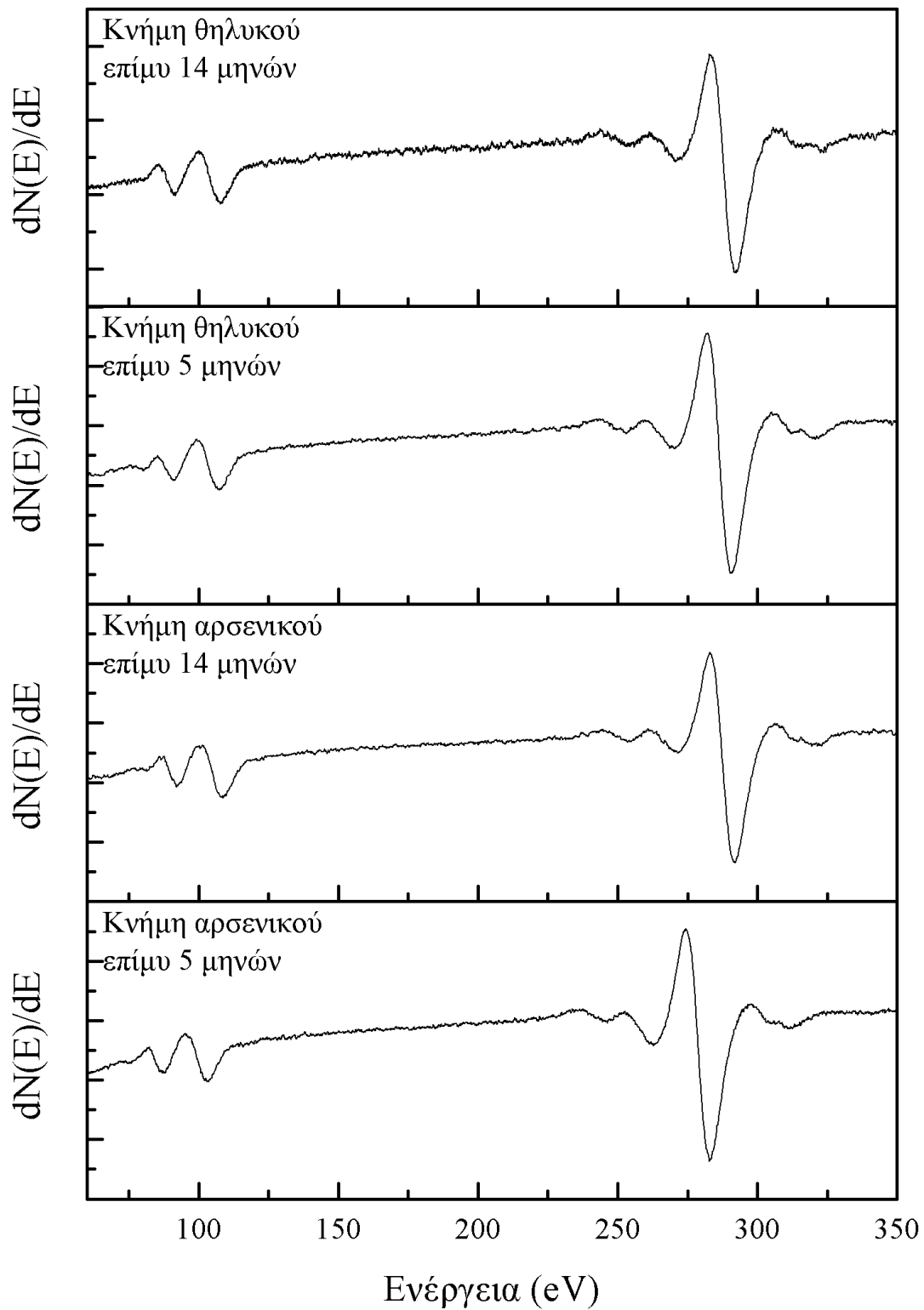


(a)

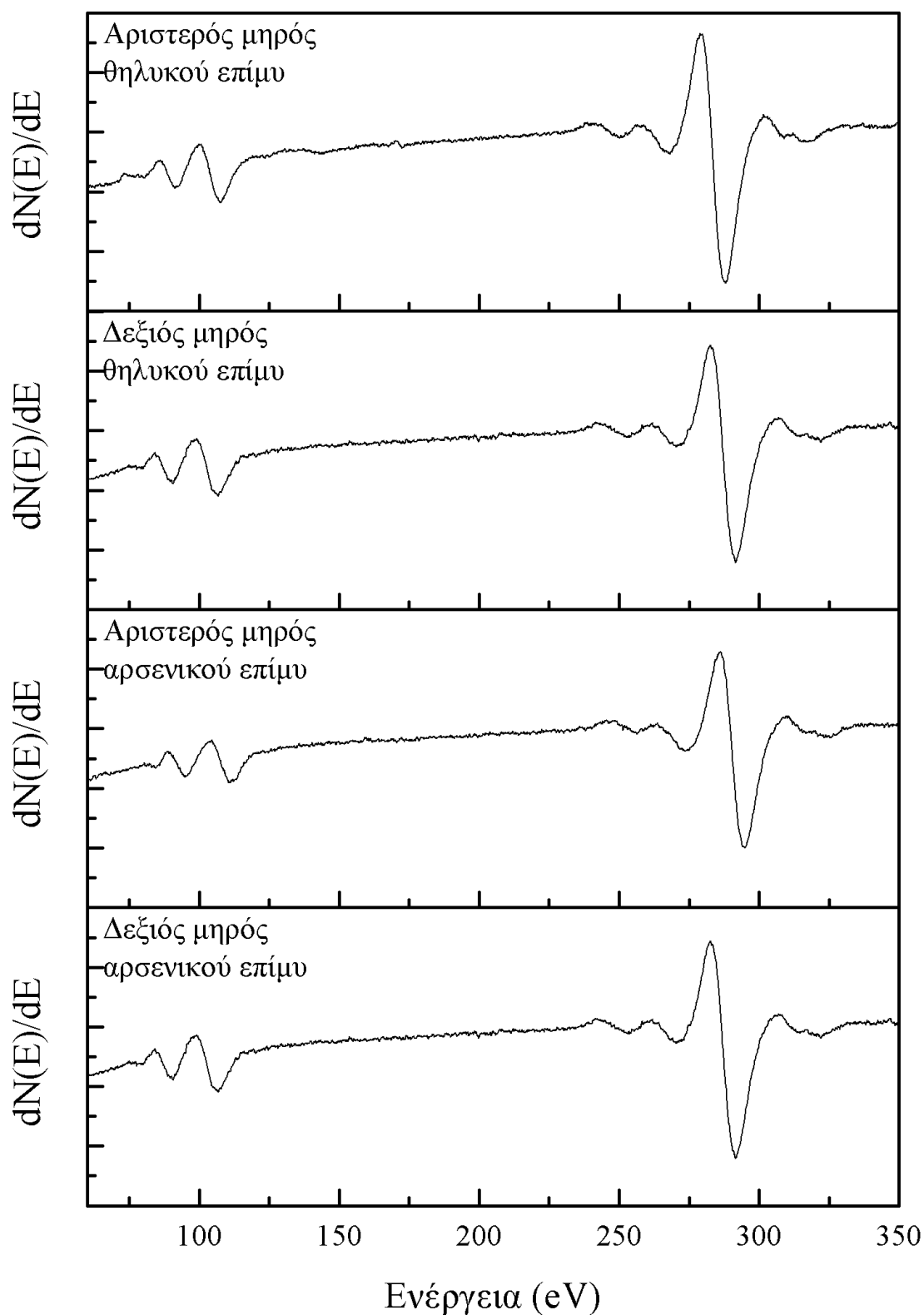


(β)

Γράφημα 3.2 Φάσματα Auger από παστίλια οστών **α)** αρσενικών επίμυων ηλικίας 5 μηνών **β)** θηλυκών επίμυων ηλικίας 5 μηνών.



Γράφημα 3.3 Φάσματα Auger από παστίλια οστών κνήμης **α)** αρσενικών επίμυων ηλικίας 5 και 14 μηνών **β)** θηλυκών επίμυων ηλικίας 5 και 14 μηνών.



Γράφημα 3.4 Φάσματα Auger από παστίλια οστών μηρού αριστερού και δεξιού μέρους **α)** αρσενικών επίμυων ηλικίας 5 μηνών **β)** θηλυκών επίμυων ηλικίας 5 μηνών.

Στα φάσματα του γραφήματος 3.3 γίνεται σύγκριση των ηλικιών ενώ σε αυτά του γραφήματος 3.4 του αριστερού και του δεξιού μέρους. Παρατηρώντας και τα δύο γραφήματα δεν διαπιστώνονται εμφανείς διαφορές στις κορυφές των προς μελέτη στοιχείων (Ca και P).

Από το ύψος των κορυφών του ασβεστίου και του φωσφόρου συγκρινόμενο με το αντίστοιχο ύψος από τα φάσματα βαθμονόμησης για το κάθε στοιχείο, όπως δίνεται στο βιβλίο του κατασκευαστή [26], συνυπολογιζόμενης της ευαισθησίας μέτρησης του κάθε στοιχείου, προκύπτει ο λόγος Ca/P. Για να είναι τα αποτελέσματα πιο ακριβή πρέπει να συνυπολογιστούν ορισμένοι παράγοντες διόρθωσης όπως η ατομική πυκνότητα, ο παράγοντας οπισθοσκέδασης και το μήκος ελεύθερης διαδρομής μεταξύ δυο γεγονότων σκέδασης (inelastic mean free path – IMFP) [47], [110]. Ο παράγοντας οπισθοσκέδασης εκφράζει την αύξηση του σήματος Auger ως συνέπεια των πρόσθετων ιονισμών μέσω της οπισθοσκέδασης των πρωτογενών ηλεκτρονίων. Εξαρτάται από το λόγο της πρωτογενούς ενέργειας προς την ενέργεια σύνδεσης, καθώς και από τον ατομικό αριθμό (Z) του κάθε στοιχείου [63], [64], [132]. Ωστόσο, ο παράγοντας αυτός ισχύει για πρωτογενή ενέργεια ηλεκτρονίων που κυμαίνεται από 3 έως 10 keV [65], [112], οπότε δεν υπεισέρχεται για την ενέργεια των πειραμάτων που είναι το 1 keV (βλ. υλικά και μέθοδοι). Ο βασικότερος παράγοντας που επηρεάζει τα αποτελέσματα είναι η ανελαστική σκέδαση που υφίστανται τα ηλεκτρόνια μέχρι να εξέλθουν από το δείγμα. Έτσι, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η πιθανότητα να ανιχνευτούν μόνο τα ηλεκτρόνια που δεν έχουν υποστεί ανελαστική σκέδαση και συνεπώς να υπολογιστεί το μήκος ελεύθερης διαδρομής μεταξύ δυο γεγονότων σκέδασης (IMFP) για το δείγμα. Για τον υπολογισμό του IMFP χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση των Tannuma – Powell – Penn (TPP – 2M) [120], [121] η οποία δίνεται ως:

$$\lambda = E / \{ E_p^2 [\beta \ln(\gamma E) - (C/E) + (D/E^2)] \} \quad (15)$$

$$\text{όπου } \beta = -0,0216 + 0,944 / (E_p^2 + E_g^2)^{1/2} + 7,39 \times 10^{-4} \rho$$

$$\gamma = 0,191 \rho^{-0,5}$$

$$C = 1,97 - 0,91U$$

$$D = 53,4 - 20,8U$$

$$U = E_p / 892,4$$

$$E_p = 28,8(N_V\rho/M)$$

με λ το IMFP (σε Å), E η ενέργεια του ηλεκτρονίου (eV), E_p η ενέργεια πλάσματος (eV), E_g το ενεργειακό χάσμα, ρ η ατομική πυκνότητα ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$), N_V τα ηλεκτρόνια σθένους και M η ατομική μάζα.

Η $TPP - 2M$ προέρχεται από την προσαρμογή στην εξίσωση του Bethe [121] για το IMFP που υπολογίστηκε από πειραματικά δεδομένα και δίνεται ως:

$$\lambda = E/[E_p^2\beta \ln(\gamma E)] \quad (16)$$

$$\text{όπου } E_p = 28,8(N_V\rho/M)$$

$$\beta = -2,52 \times 10^{-2} + 1,05/(E_p^2 + E_g^2)^{1/2} + 8,10 \times 10^{-4}\rho$$

$$\gamma = 0,151\rho^{-0,49}$$

Ο υπολογισμός του IMFP από την εξίσωση (15) αποτελεί πολύπλοκη διεργασία, για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού. Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε είναι του οργανισμού NIST (National Institute of Standards and Technology) και πρόκειται για το Simulation of Electron Spectra for Surface Analysis (SESSA v.1) [114]. Η επιλογή του λογισμικού έγινε ώστε να συνυπολογιστεί η επίδραση των άλλων στοιχείων του υδροξυαπατίτη του οστού στο IMFP πέρα από το ασβέστιο και το φώσφορο. Η σύνθεση του υδροξυαπατίτη που χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο είναι αυτή του καθαρού υδροξυαπατίτη ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), ο οποίος δεν παρεκκλίνει σημαντικά από τη σύνθεση του απατίτη του οστού [77]. Επιπλέον, εξετάστηκε αν παρουσιάζεται συστηματικό σφάλμα του οργάνου Auger με τη χρήση πρότυπου δείγματος ($\text{CaHPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Έτσι, ενώ η στοιχειομετρική αναλογία δίνει λόγο $\text{Ca/P} = 1$, μετά τη μέτρηση στο Auger υπολογίστηκε $\text{Ca/P} = 1,04$, που σημαίνει ότι υπάρχει συστηματικό σφάλμα της τάξης του 4%.

Ο υπολογισμός των λόγων Ca/P και τα αποτελέσματα για τα διάφορα οστά των επίμυων παρουσιάζονται στον πίνακα 3.1. Σε αυτόν εμφανίζεται ο λόγος Ca/P για τα συμπαγή οστά (κνήμη, μηρός, βραχιόνιο) και για τα σπογγώδη (πλευρά). Η σύγκριση γίνεται ανάλογα με την ηλικία, το φύλο και τη θέση του οστού των επίμυων. Μελετάται επίσης αν υπάρχει διαφορά του λόγου μεταξύ αριστερού και δεξιού μέρους για του επίμυες

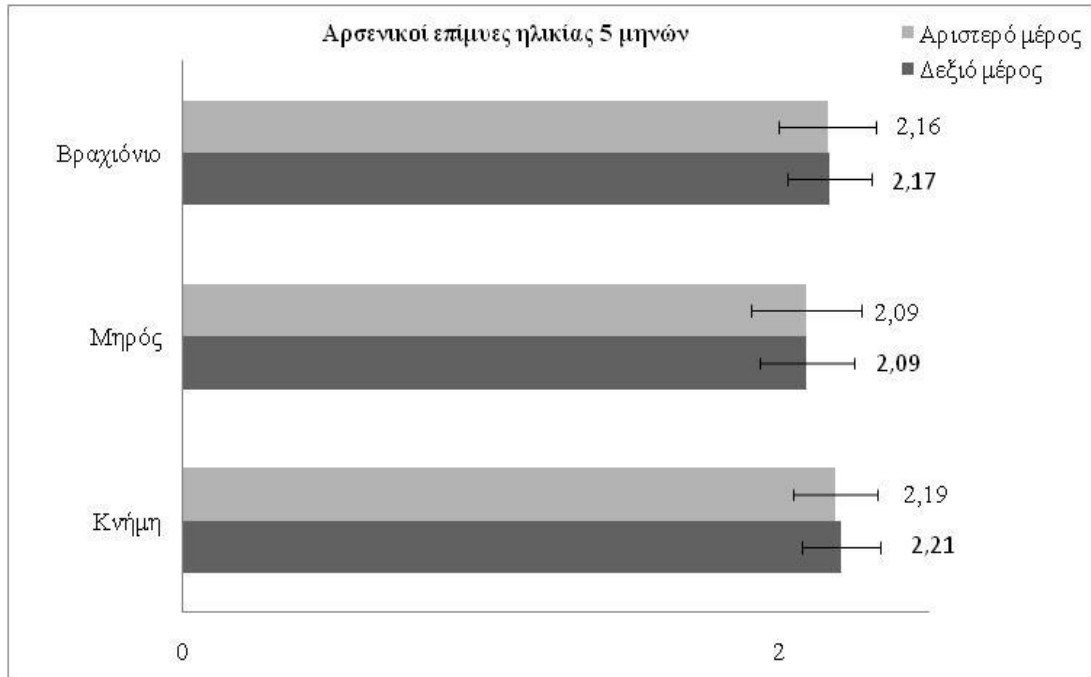
ηλικίας 5 μηνών. Τα αποτελέσματα είναι γραμμένα υπό τη μορφή μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση (mean \pm S.D.)

Ηλικία (Μήνες)	Φύλο	Οστά			
		Αριστερή κνήμη	Δεξιά κνήμη	Αριστερός μηρός	Δεξιός μηρός
5	Άρρεν	2,19 \pm 0,14	2,21 \pm 0,13	2,09 \pm 0,18	2,09 \pm 0,16
14		-	1,93 \pm 0,05	-	2,02 \pm 0,09
5	Θήλυ	2,18 \pm 0,17	2,17 \pm 0,12	2,06 \pm 0,21	2,06 \pm 0,21
14		-	1,89 \pm 0,09	-	1,99 \pm 0,07
		Αριστερό βραχιόνιο	Δεξιό βραχιόνιο	Πλευρά	
5	Άρρεν	2,16 \pm 0,16	2,17 \pm 0,14	1,89 \pm 0,11	
14		-	1,93 \pm 0,06	1,88 \pm 0,08	
5	Θήλυ	2,11 \pm 0,17	2,13 \pm 0,16	1,91 \pm 0,08	
14		-	1,91 \pm 0,03	1,87 \pm 0,05	

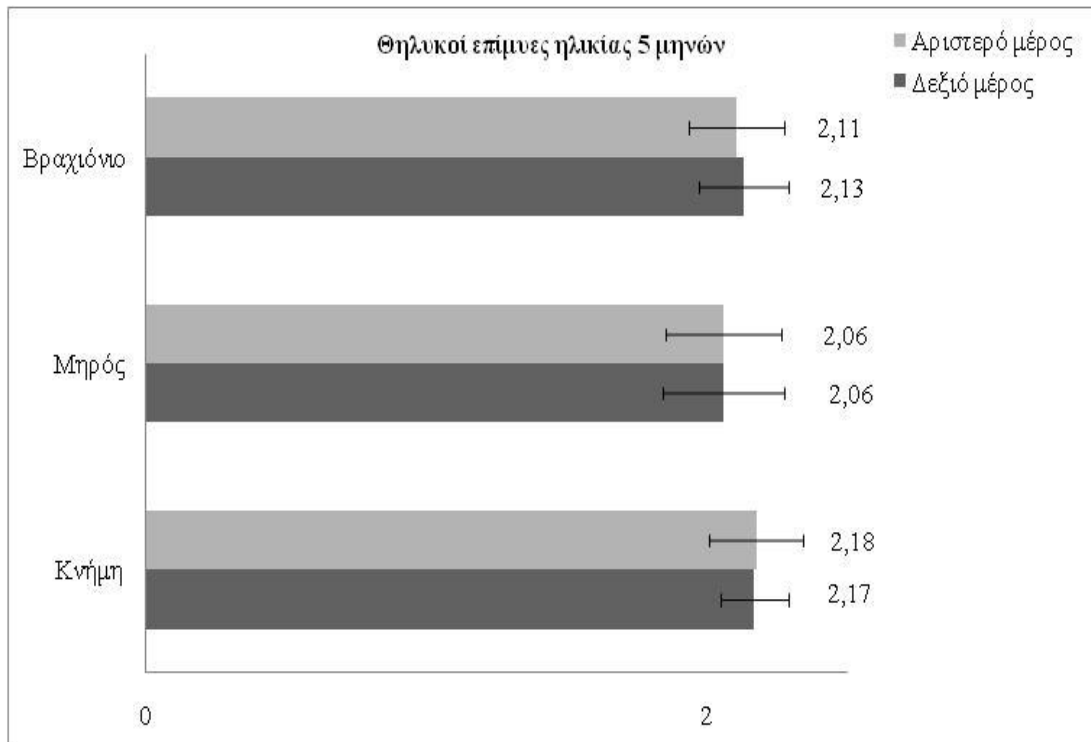
Πίνακας 3.1 Αποτελέσματα του λόγου Ca/P στους επίμυες μέσω φασματοσκοπίας Auger ταξινομημένα ανάλογα με την ηλικία, το φύλο του επίμυος και το είδος του οστού. Γίνεται επίσης σύγκριση αριστερού και δεξιού μέρους στην ηλικία των 5 μηνών. Τα αποτελέσματα είναι υπό τη μορφή μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση (mean \pm S.D.)

Αρχικά στα παρακάτω γραφήματα 3.5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα και η στατιστική ανάλυση των διαφορών των λόγων μεταξύ αριστερού και δεξιού μέρους για την ομάδα των 10 αρσενικών και 10 θηλυκών επίμυων ηλικίας 5 μηνών.

Κεφάλαιο 3 – Αποτελέσματα



(α)



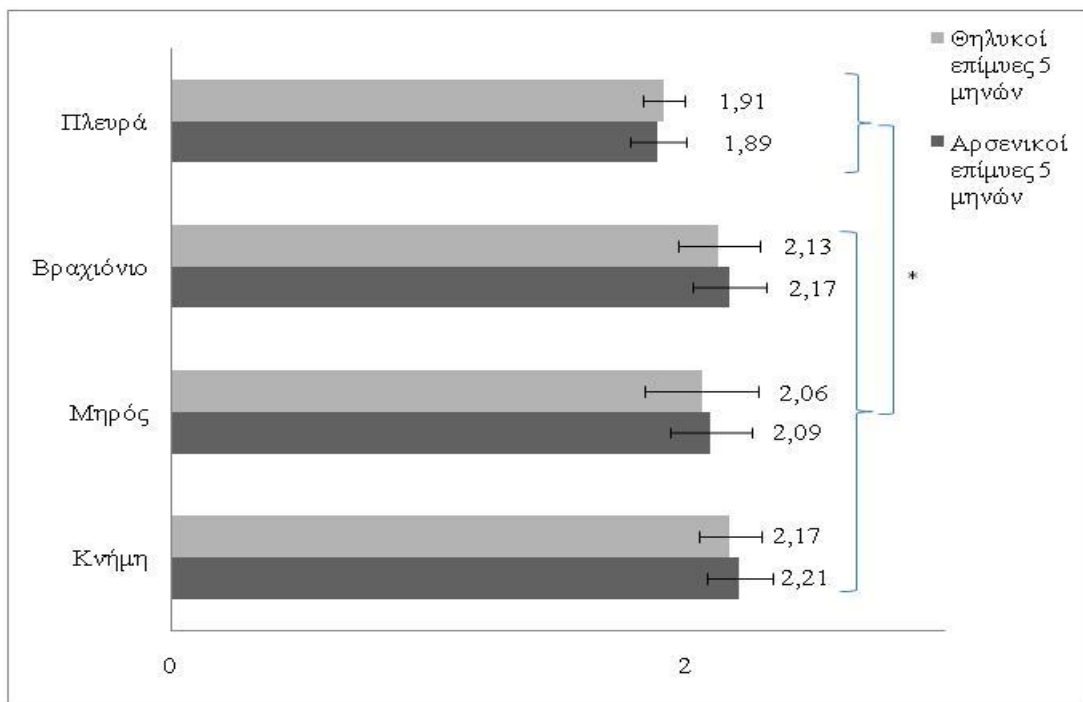
(β)

Γράφημα 3.5 Σύγκριση αποτελεσμάτων του λόγου Ca/P μέσω φασματοσκοπίας Auger μεταξύ του δεξιού και αριστερού μέρους **α)** αρσενικοί επίμυες ηλικίας 5 μηνών **β)** θηλυκοί επίμυες ηλικίας 5 μηνών.

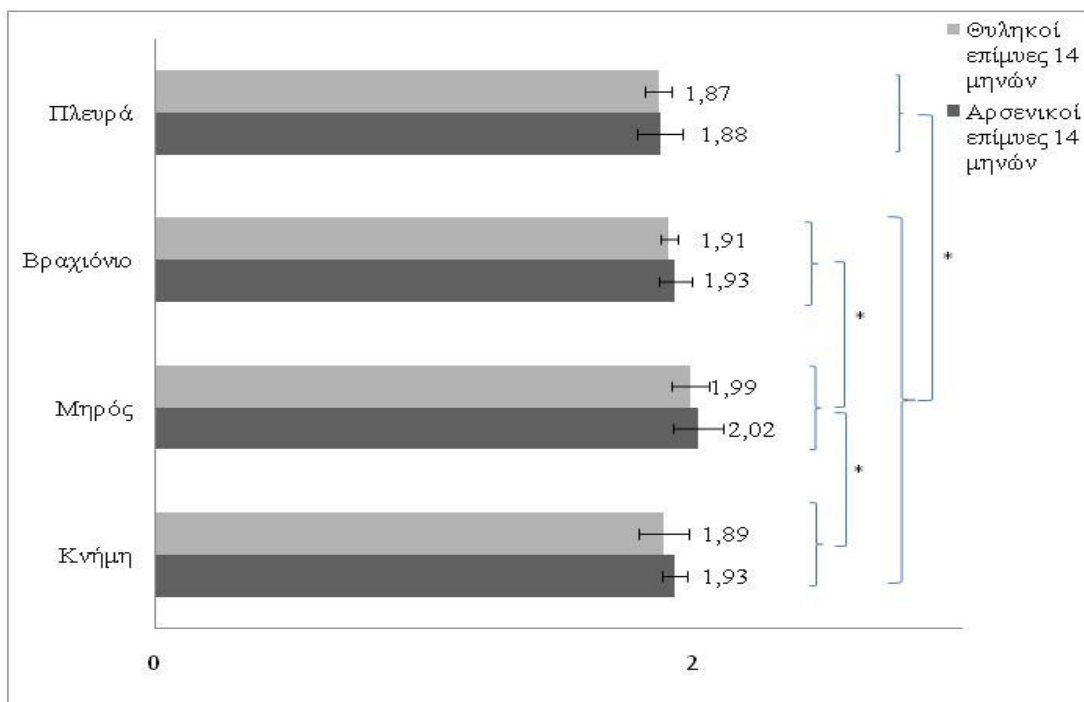
Κεφάλαιο 3 – Αποτελέσματα

Από τα γραφήματα αυτά, για τα διαφορετικά μέρη των συμπαγών οστών μεταξύ του δεξιού και του αριστερού μέρους, προκύπτει ότι ο λόγος είναι περίπου ίδιος για το αντίστοιχο οστό με μικρές διαφορές. Η στατιστική ανάλυση (μη παραμετρικό t – test) των αποτελεσμάτων καταδεικνύει ότι οι μικρές αυτές διαφορές δεν είναι στατιστικά σημαντικές ($0,6 < P < 1,0$). Συνεπώς, η επιλογή οστών ενός μέρους δεν επηρεάζει τα αποτελέσματα. Έτσι, για την περαιτέρω μελέτη επιλέχθηκαν οστά του δεξιού μέρους του ζώου.

Στη συνέχεια στα παρακάτω γραφήματα 3.6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα και η στατιστική ανάλυση των διαφορών των λόγων μεταξύ αρσενικών και θηλυκών επίμυων και για τις δύο ηλικίες. Επίσης, απεικονίζονται τα αποτελέσματα και η στατιστική ανάλυση για τα αντίστοιχα συμπαγή και σπογγώδη οστά και των δύο φύλων.



(a)



(β)

Γράφημά 3.6 Σύγκριση αποτελεσμάτων του λόγου Ca/P μέσω φασματοσκοπίας Auger μεταξύ αρσενικών και θηλυκών επίμυων **α)** ηλικίας 5 μηνών **β)** ηλικίας 14 μηνών. (*: $P \leq 0,05$)

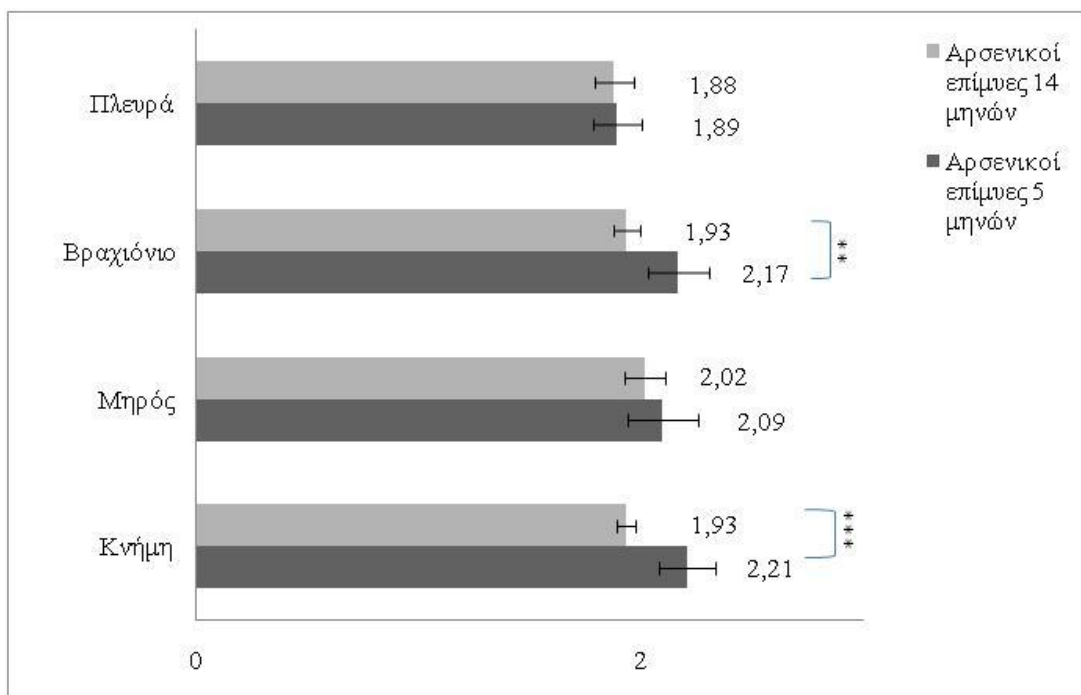
Από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων του λόγου Ca/P, για τα αντίστοιχα συμπαγή και σπογγώδη οστά μεταξύ αρσενικών και θηλυκών επίμυων και στις δύο ηλικίες προκύπτει ότι οι λόγοι είναι περίπου ίδιοι για τα αντίστοιχα οστά με μικρές διαφορές. Η στατιστική ανάλυση (μη παραμετρικό t – test) καταλήγει ότι οι διαφορές μεταξύ των οστών των δύο φύλων τόσο στην ηλικία των 5 μηνών ($0,2 < P < 1,0$) όσο και στην ηλικία των 14 μηνών ($0,1 < P < 0,6$) δεν είναι στατιστικώς σημαντικές.

Επίσης, γίνεται σύγκριση των αποτελεσμάτων ανάμεσα στα συμπαγή οστά τόσο στους αρσενικούς όσο και στους θηλυκούς ηλικίας των 5 μηνών επίμυες. Η στατιστική ανάλυση (μη παραμετρικό t – test), οδηγεί στο ότι δεν εμφανίζονται στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των συμπαγών οστών τόσο των αρσενικών ($0,2 < P < 0,6$) όσο και των θηλυκών επίμυων ($0,6 < P < 0,8$).

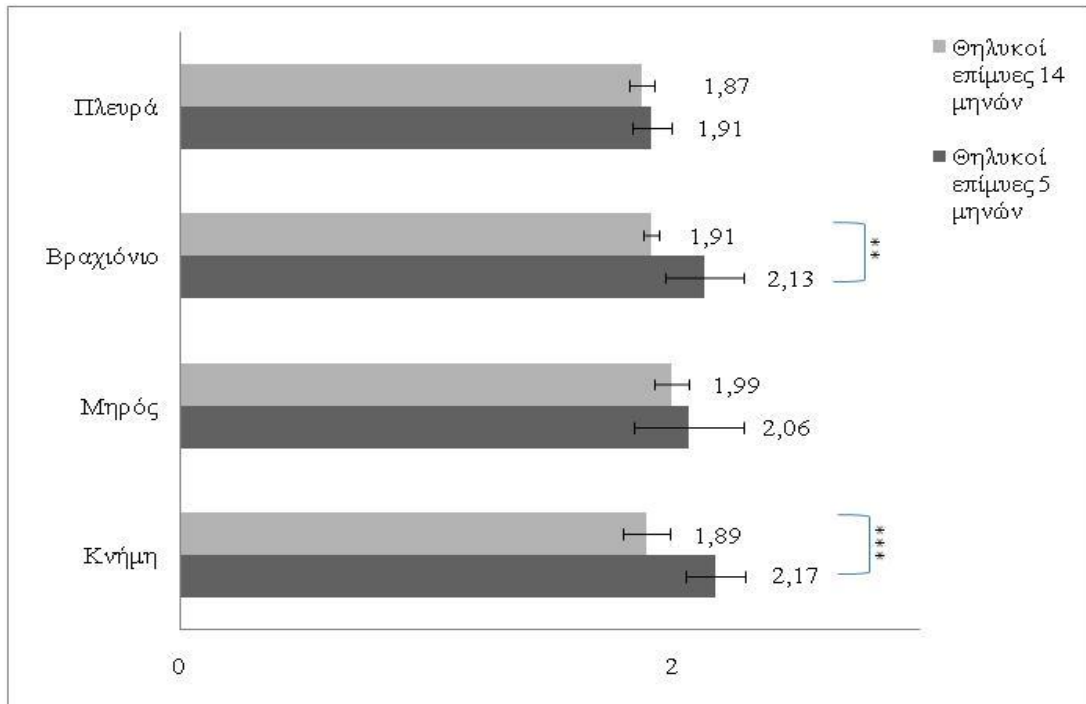
Αντίθετα στην ηλικία των 14 μηνών οι διαφορές μεταξύ των συμπαγών οστών στους αρσενικούς και στους θηλυκούς επίμυες είναι εμφανείς. Έτσι, προκύπτουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές (μη παραμετρικό t – test) μεταξύ του μηρού και του βραχιονίου, αλλά και του μηρού και της κνήμης ($0,02 < P < 0,04$) (Γράφημα 3.6β).

Εξετάζεται ακόμα, το σύνολο των συμπαγών οστών συγκριτικά με τα σπογγώδη. Οι διαφορές στο λόγο είναι εμφανείς και στις δύο ηλικίες και στα δύο φύλα. Η στατιστική ανάλυση (ANOVA) οδηγεί στο ότι ο λόγος στα σπογγώδη οστά είναι στατιστικώς σημαντικά μικρότερος από αυτόν των συμπαγών οστών ($0,01 < P < 0,03$) και για τα δύο φύλα και τις δύο ηλικίες.

Τέλος στα παρακάτω γραφήματα 3.7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα και η στατιστική ανάλυση των διαφορών των λόγων μεταξύ των αντίστοιχων οστών των δύο ηλικιών για τους αρσενικούς και θηλυκούς επίμνες.



(α)



(β)

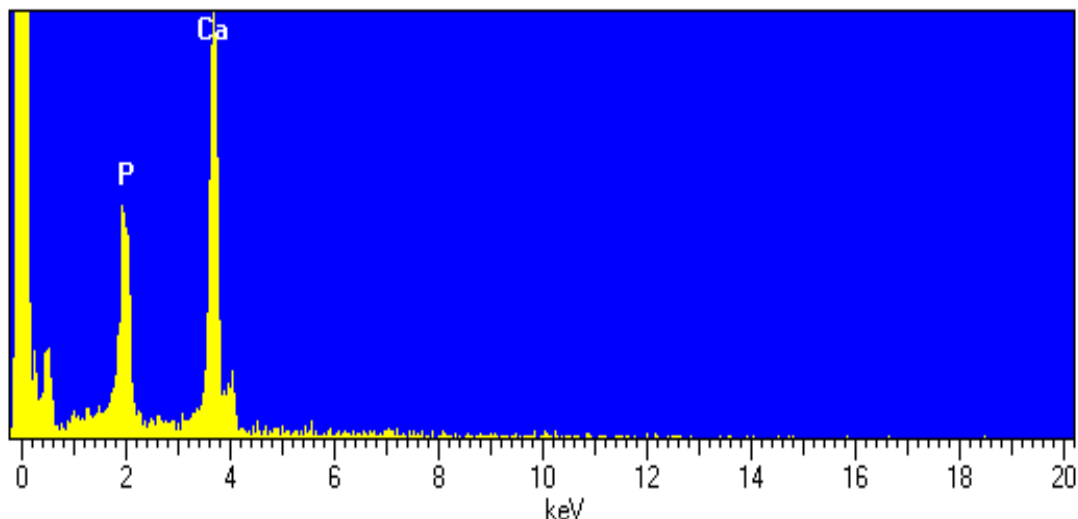
Γράφημα 3.7 Σύγκριση αποτελεσμάτων του λόγου Ca/P μέσω φασματοσκοπίας Auger μεταξύ των ηλικιών 5 και 14 μηνών **α)** αρσενικοί επίμυες **β)** θηλυκοί επίμυες. (** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$)

Όπως απεικονίζεται στα γραφήματα από τη στατιστική ανάλυση (μη παραμετρικό t – test) προκύπτει ότι εμφανίζεται στατιστικώς σημαντική διαφορά στις κνήμες και στα βραχιόνια ($P < 0,0001$ και $0,001 < P < 0,08$ αντίστοιχα) ανάμεσα στις δύο ηλικίες τόσο στους αρσενικούς όσο και στους θηλυκούς επίμυες. Η ίδιας τάξης διαφορά οφείλεται στο ότι ο λόγος Ca/P στους αρσενικούς και στους θηλυκούς επίμυες είναι ίδιος, όπως συζητήθηκε παραπάνω. Αντίθετα στο μηρό όπως και στα πλευρά δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά και στα δύο φύλα ($0,2 < P < 0,3$ και $0,4 < P < 0,6$ αντίστοιχα).

3.1.1.2 SEM – EDS

Για τη μέτρηση του λόγου Ca/P με φασματοσκοπία EDS (Energy – Dispersive X – ray Spectroscopy), επιλέχθηκαν οι αντίστοιχες παστίλιες οστών του δεξιού μέρους από πέντε επίμυες για κάθε φύλο και ηλικία. Όπως αναφέρθηκε, δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά του λόγου μεταξύ του δεξιού και αριστερού μέρους. Στη συνέχεια

πραγματοποιήθηκε εναπόθεση άνθρακα στην επιφάνειά τους (βλ. υλικά και μέθοδοι) και τοποθετήθηκαν στο SEM, όπου μετρήθηκε ο λόγος Ca/P με τη φασματοσκοπία EDS. Χαρακτηριστικό φάσμα από παστίλια συμπαγούς οστού κνήμης αρσενικού επίμυος 14 μηνών είναι αυτό του γραφήματος 3.5.



Γράφημα 3.8 Φάσμα EDS από παστίλια συμπαγούς οστού κνήμης αρσενικού επίμυ 14 μηνών.

Στο φάσμα απεικονίζονται, μετά την ποιοτική αναγνώριση, οι κορυφές του Ca για την $K_{\alpha 1}$ μετάβαση στα 2,01 keV και του P για την ίδια μετάβαση στα 3,69 keV. Στα 0,27 keV και 0,52 keV εμφανίζονται οι κορυφές του C και του O αντίστοιχα, οι οποίες δεν επηρεάζουν αυτές των προς μελέτη στοιχείων.

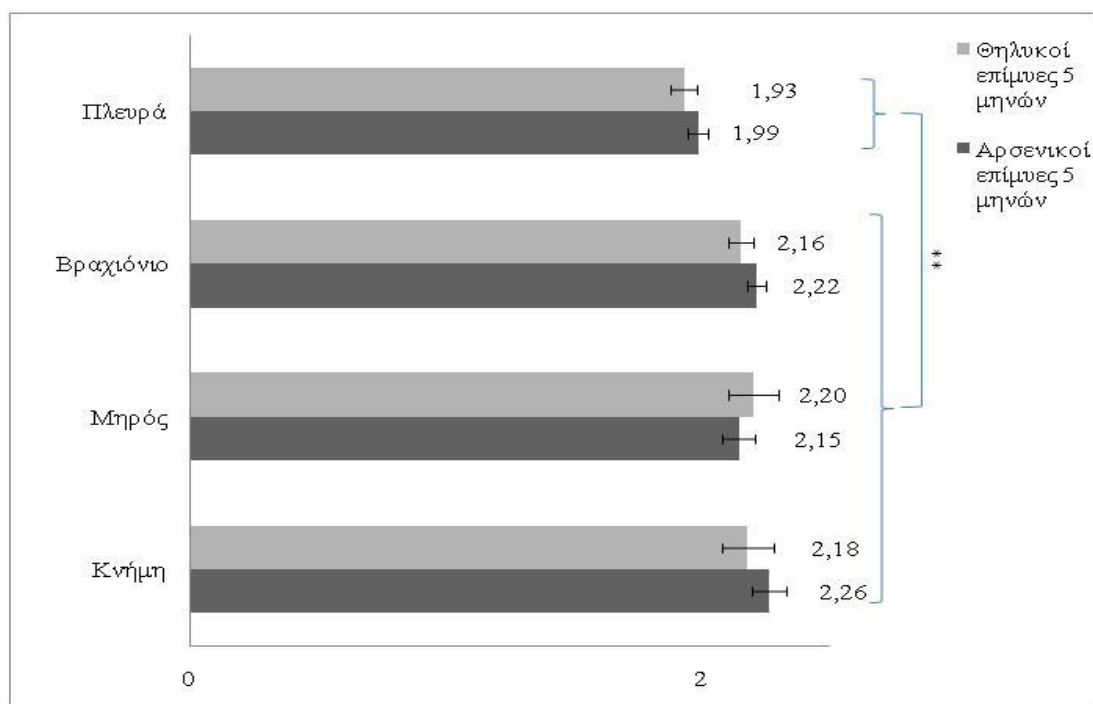
Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των στοιχείων συνυπολογίστηκε η διόρθωση ZAF από το λογισμικό και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 3.2. Σε αυτόν εμφανίζεται ο λόγος Ca/P για τα συμπαγή και τα σπογγώδη οστά ανάλογα με την ηλικία, το φύλο και τη θέση του οστού των επίμυων, ενώ τα αποτελέσματα είναι γραμμένα υπό τη μορφή μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση (mean \pm S.D.).

Κεφάλαιο 3 – Αποτελέσματα

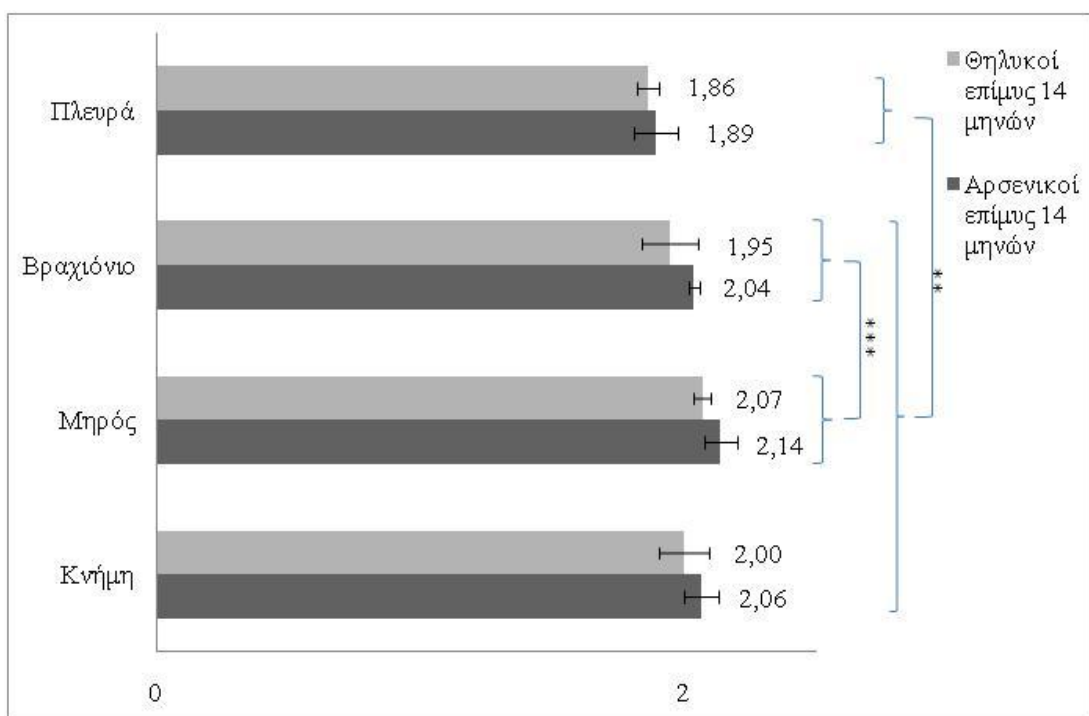
Ηλικία (Μήνες)	Φύλο	Οστά			
		Κνήμη	Μηρός	Βραχιόνιο	Πλευρά
5	Άρρεν	2,26±0,07	2,15±0,06	2,22±0,04	1,99±0,04
14		2,06±0,07	2,14±0,06	2,04±0,02	1,89±0,08
5	Θήλυ	2,18±0,10	2,20±0,10	2,16±0,05	1,93±0,05
14		2,00±0,09	2,07±0,04	1,95±0,11	1,86±0,04

Πίνακας 3.2 Αποτελέσματα του λόγου Ca/P μέσω φασματοσκοπίας EDS στους επίμυες ταξινομημένα ανάλογα με την ηλικία, το φύλο του επίμυος και το είδος του οστού. Τα αποτελέσματα είναι υπό τη μορφή μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (mean ± S.D.)

Αρχικά στα παρακάτω γραφήματα 3.9 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα και η στατιστική ανάλυση των διαφορών των τιμών ανάμεσα στα δύο φύλα για τις δύο διαφορετικές ηλικίες.



(α)



(β)

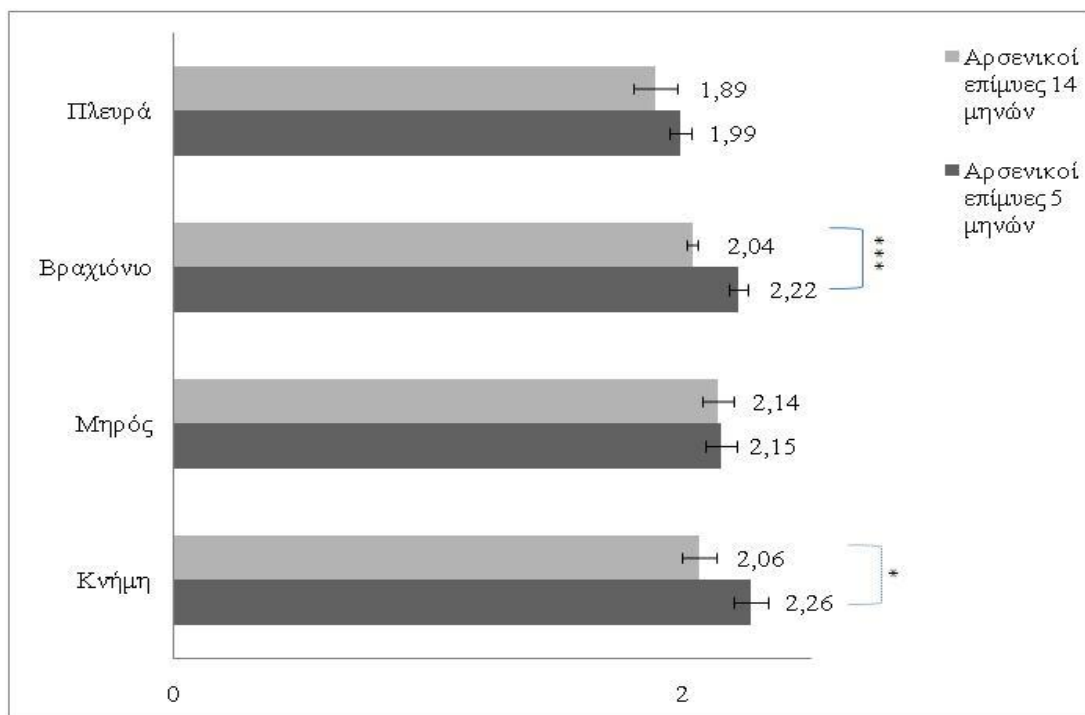
Γράφημά 3.9 Σύγκριση αποτελεσμάτων του λόγου Ca/P μέσω φασματοσκοπίας EDS μεταξύ αρσενικών και θηλυκών επίμυων *α)* ηλικίας 5 μηνών *β)* ηλικίας 14 μηνών. (** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$)

Από τους λόγους Ca/P των οστών για τους 5 αρσενικούς και 5 θηλυκούς επίμυες ηλικίας 5 μηνών αλλά και τους αντίστοιχους ηλικίας 14 μηνών, προκύπτει ότι δεν υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές (μη παραμετρικό t – test) για τα συμπαγή και τα σπογγώδη οστά μεταξύ των δύο φύλων στις δύο ηλικίες ($0,2 < P < 0,7$). Στην ηλικία των 14 μηνών, τόσο στους αρσενικούς όσο και στους θηλυκούς επίμυες, εμφανίζεται στατιστικώς σημαντική (μη παραμετρικό t – test) διαφορά μεταξύ του βραχιόνιου και του μηριαίου συμπαγούς οστού ($P < 0,0001$).

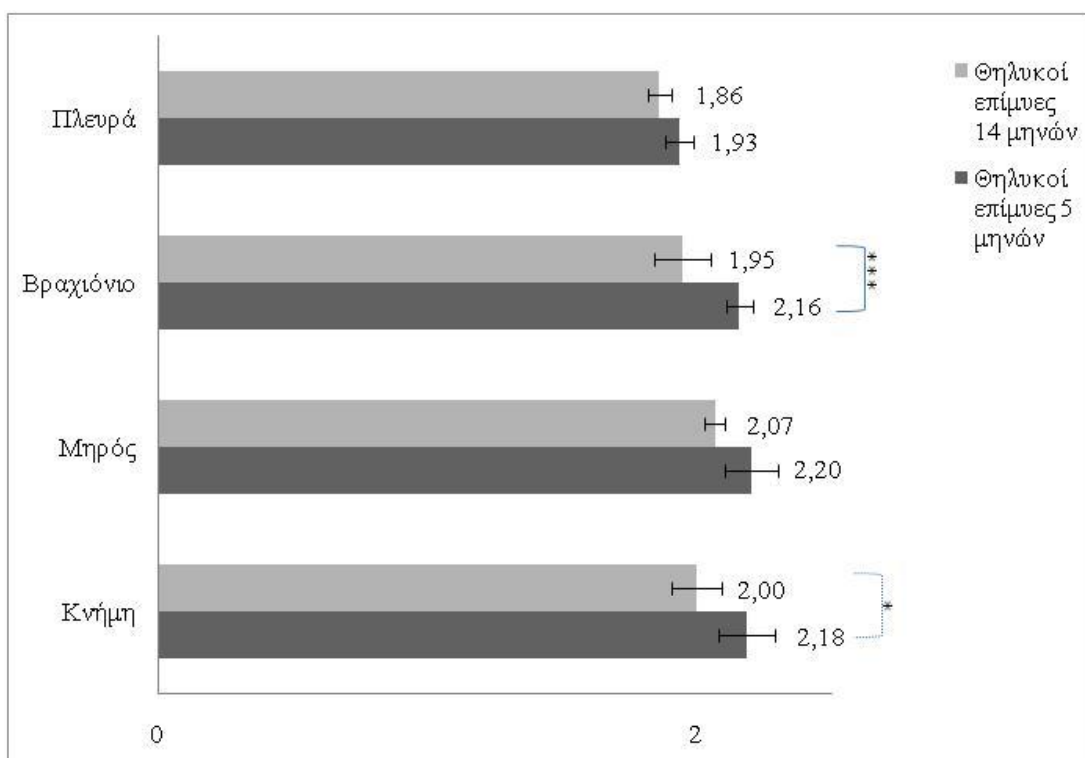
Για το σύνολο των συμπαγών οστών σε σχέση με τα σπογγώδη προκύπτει ότι ο λόγος στα σπογγώδη οστά είναι στατιστικώς σημαντικά μικρότερος (ANOVA) από αυτόν των συμπαγών οστών ($0,002 < P < 0,04$) και για τα δύο φύλα στις δύο ηλικίες

Τέλος στα παρακάτω γραφήματα 3.10 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα και η στατιστική ανάλυση των διαφορών των τιμών ανάμεσα στα αντίστοιχα οστά μεταξύ των δύο ηλικιών για τα δύο φύλα.

Κεφάλαιο 3 – Αποτελέσματα



(α)



(β)

Γράφημα 3.10 Σύγκριση αποτελεσμάτων του λόγου Ca/P μέσω φασματοσκοπίας EDS μεταξύ των ηλικιών 5 και 14 μηνών **α)** αρσενικοί επίμνες **β)** θηλυκοί επίμνες. (* $P \leq 0,05$, *** $P \leq 0,001$)

Από τη σύγκριση των ηλικιών στα δύο φύλα, προκύπτουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές (μη παραμετρικό t - test) μεταξύ των βραχιόνων ($P < 0,0001$) και των κνημών ($P = 0,05$). Ενώ στα υπόλοιπα συμπαγή οστά όπως και στα σπογγώδη ο λόγος παρουσιάζει αριθμητικά μικρή διαφορά χωρίς στατιστική σημαντικότητα ($0,6 < P < 1,0$).

3.1.1.3 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ AUGER ΚΑΙ SEM

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω, τα αποτελέσματα του λόγου Ca/P μετρούμενα και με τις δύο φασματοσκοπικές τεχνικές βρίσκονται σε πλήρη συμφωνία. Έτσι, τόσο η φασματοσκοπία Auger όσο και η φασματοσκοπία EDS καταλήγει ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές των λόγων ανάμεσα στα αντίστοιχα οστά αρσενικών και θηλυκών επίμυων. Επιπλέον, οι δύο τεχνικές συμφωνούν ότι δεν υπάρχει στατιστική σημαντική διαφορά των λόγων μεταξύ των συμπαγών οστών για τους επίμυες ηλικίας 5 μηνων.

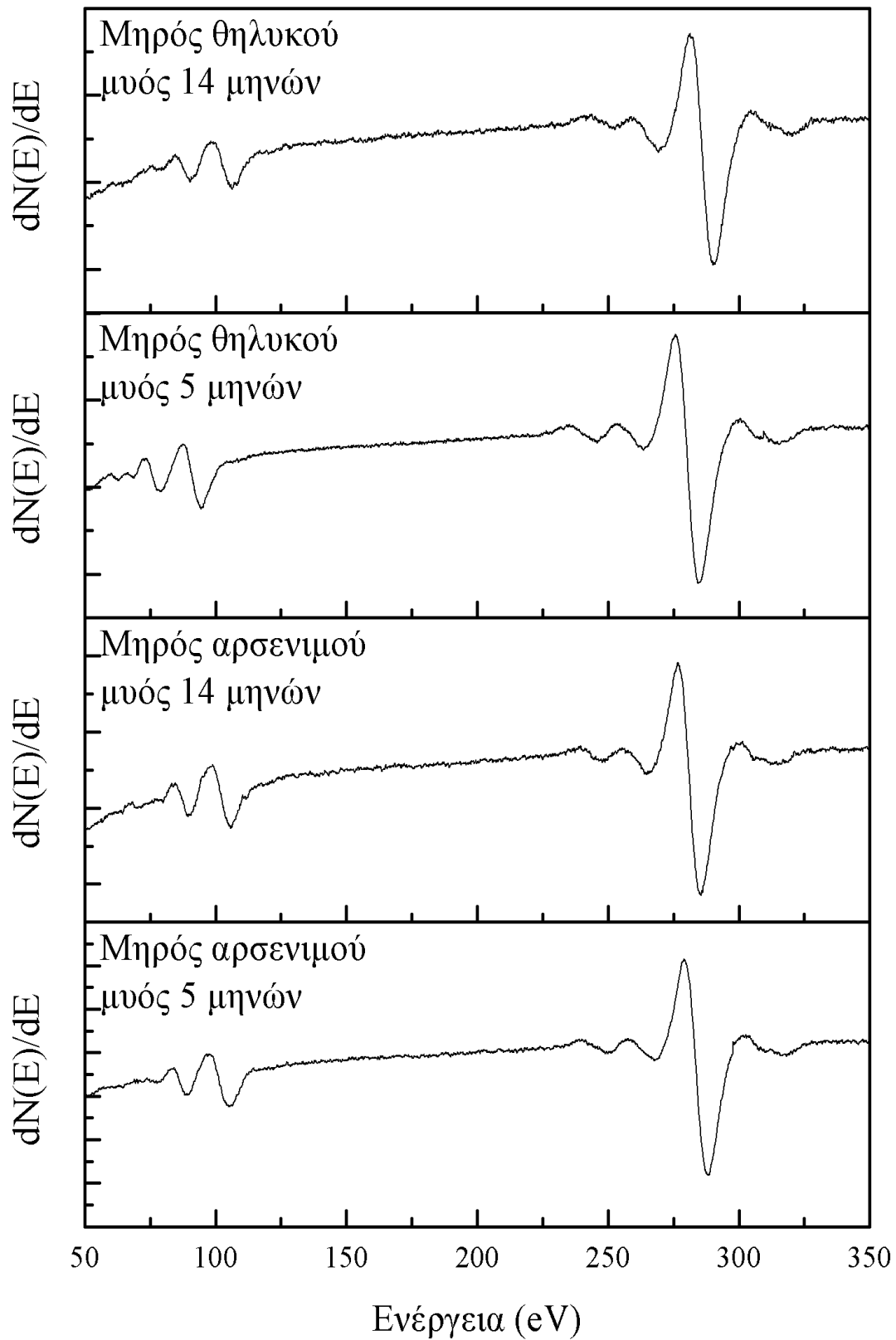
Στους επίμυες ηλικίας 14 μηνών και στα δύο φύλα οι δύο φασματοσκοπικές τεχνικές οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο λόγος Ca/P εμφανίζει σημαντική διαφορά ανάμεσα στους μηρούς και στα βραχιόνια. Η φασματοσκοπία Auger όμως, οδηγεί επιπλέον στο συμπέρασμα ότι ο λόγος είναι σημαντικά μικρότερος στην κνήμη σε σχέση με το μηρό σε αυτή την ηλικία. Στη φασματοσκοπία EDS, αν και ο λόγος είναι μικρότερος στην κνήμη σε σχέση με το μηρό, παρατηρείται οριακά στατιστικώς σημαντική διαφορά λόγω της μεγαλύτερης τυπικής απόκλισης που παρουσιάζουν οι μετρήσεις.

Επίσης οι δύο φασματοσκοπικές τεχνικές συμφωνούν στα αποτελέσματα των λόγων Ca/P ανάμεσα στις δύο ηλικίες. Έτσι, εμφανίζουν το λόγο Ca/P στα βραχιόνια και στις κνήμες στατιστικά σημαντικά μικρότερο στη μεγαλύτερη ηλικία και στα δύο φύλα.

Τέλος, όπως φαίνεται στα αποτελέσματα των δύο τεχνικών στα δύο φύλα και τις δύο ηλικίες, ο λόγος στα σπογγώδη οστά είναι στατιστικά σημαντικά μικρότερος σε σχέση με τα συμπαγή.

3.1.2 ΜΕΤΡΗΣΗ ΛΟΓΟΥ Ca/P ΣΤΟΥΣ ΜΥΕΣ

Για τους μύες επιλέχθηκαν προς μελέτη τα συμπαγή οστά των άκρων (κνήμη, μηρός, βραχιόνιο). Στη συνέχεια τα οστά επεξεργάστηκαν θερμικά για την αφαίρεση του ύδατος από αυτά, κονιορτοποιήθηκαν και η σκόνη συμπίεστηκε στη μορφή της παστίλιας (βλ. υλικά και μέθοδοι). Κάθε μια από τις παστίλιες μελετήθηκε με τη φασματοσκοπία Auger. Ενδεικτικά στο παρακάτω γράφημα παρουσιάζονται τα φάσματα κνήμης τόσο αρσενικού όσο και θηλυκού μύος για τις δύο ηλικίες.



Γράφημα 3.11 Φάσματα Auger μηρού αρσενικών και θηλυκών μυών ηλικίας 5 και 14 μηνών.

Όπως φαίνεται στο παραπάνω γράφημα, τα φάσματα δεν παρουσιάζουν εμφανείς διαφορές και είναι όλα παρόμοια με αυτό του γραφήματος 3.1. Η διαφορά τους έγκειται ως προς το σχετικό ύψος των κορυφών των δύο στοιχείων (Ca και P), αλλά όχι ως προς τη θέση των κορυφών. Η θέση των κορυφών είναι στα ίδια όρια με αυτά των επίμυων της προηγούμενης παραγράφου (280 – 290 eV και 90 – 110 eV για το Ca και P αντίστοιχα). Παρόμοια φάσματα εμφανίζουν και όλα τα προς μελέτη οστά των μυών.

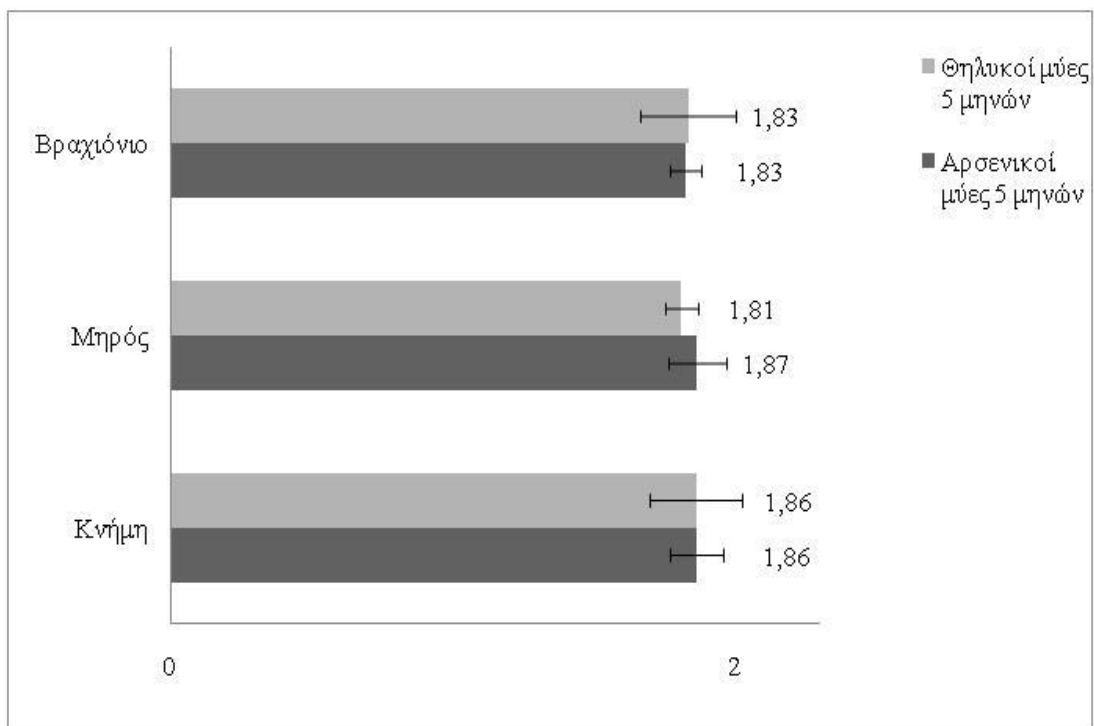
Ο λόγος Ca/P μετρήθηκε για κάθε είδος οστού με τις απαραίτητες διορθώσεις, όπως αυτές αναφέρθηκαν στο κεφάλαιο 3.1.1.1. Τα αποτελέσματα για τα δύο φύλα παρουσιάζονται στον πίνακα 3.3 όπου αναγράφονται με τη μορφή μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (mean ± S.D.).

Ηλικία (Μήνες)	Φύλο	Οστά		
		Κνήμη	Μηρός	Βραχιόνιο
5	Άρρεν	1,86±0,09	1,87±0,10	1,83±0,05
14		1,86±0,10	1,77±0,04	1,83±0,07
5	Θήλυ	1,86±0,17	1,79±0,07	1,83±0,17
14		1,78±0,09	1,77±0,07	1,85±0,12

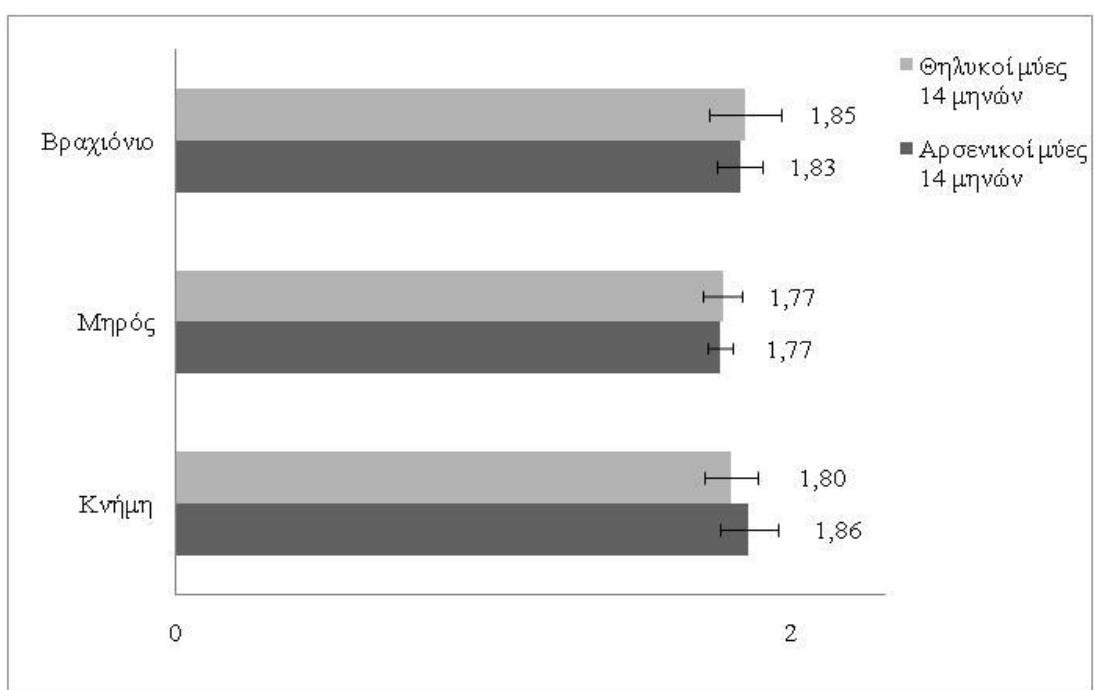
Πίνακας 3.3 Αποτελέσματα του λόγου Ca/P μέσω φασματοσκοπίας Auger στους μύες ταξινομημένα ανάλογα με την ηλικία, το φύλο και το είδος του οστού. Τα αποτελέσματα είναι υπό την μορφή μέσος όρος ± τυπική απόκλιση (mean ± S.D.)

Στα παρακάτω γραφήματα 3.12 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα και η στατιστική ανάλυση των διαφορών των λόγων ανάμεσα στα δύο φύλα και στις δύο ηλικίες.

Κεφάλαιο 3 – Αποτελέσματα



(α)



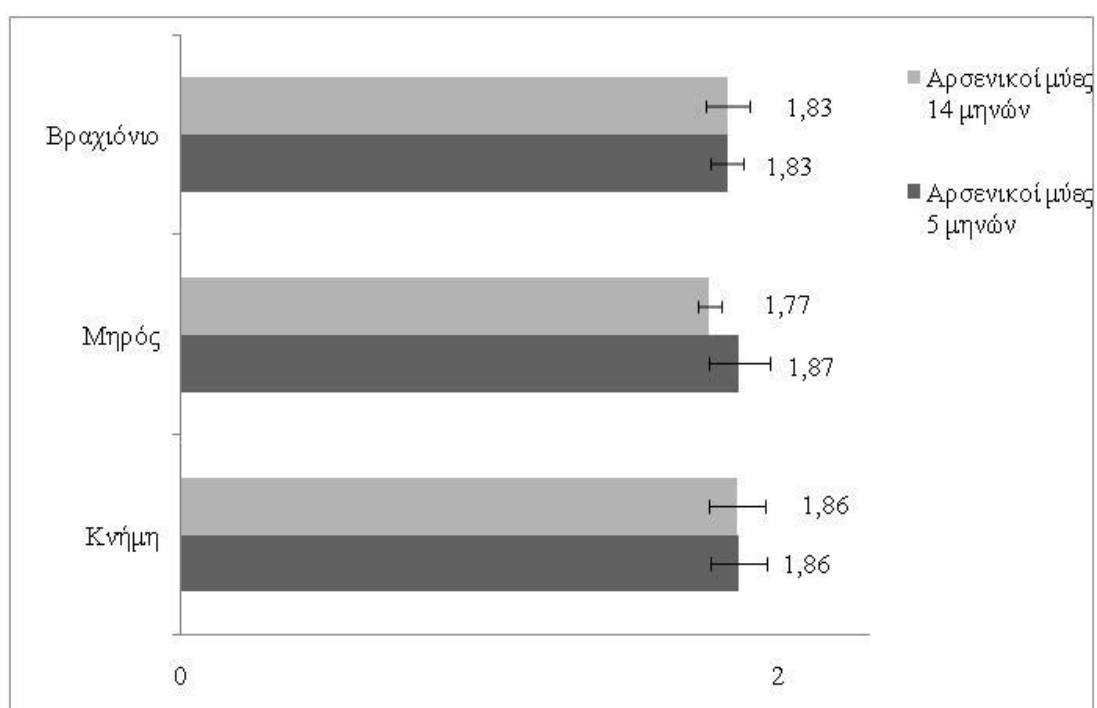
(β)

Γράφημα 3.12 Σύγκριση αποτελεσμάτων του λόγου Ca/P των οστών μέσω φασματοσκοπίας Auger μεταξύ αρσενικών και θηλυκών μυών **α)** ηλικίας 5 μηνών **β)** ηλικίας 14 μηνών.

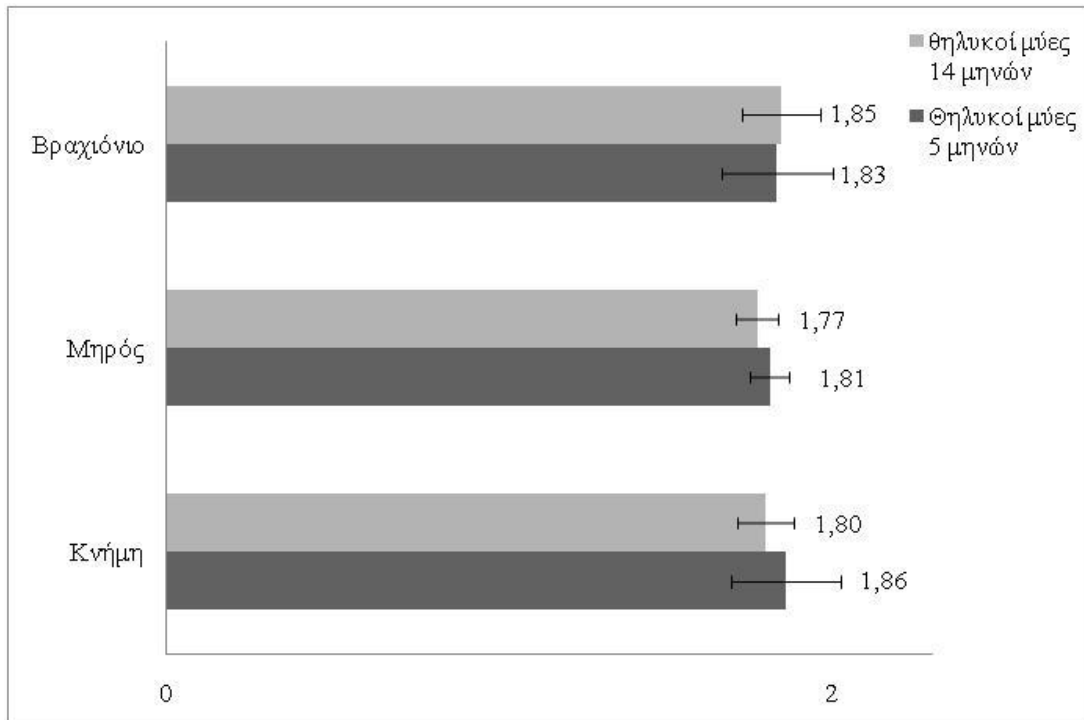
Κεφάλαιο 3 – Αποτελέσματα

Όπως απεικονίζεται δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές (μη παραμετρικό t – test) μεταξύ των οστών του ίδιου φύλου τόσο στην ηλικία των 5 μηνών ($0,5 < P < 1,0$) όσο και στην ηλικία των 14 μηνών ($0,2 < P < 0,8$). Επιπλέον συγκρίνοντας τα αντίστοιχα οστά των δύο φύλων στις δύο ηλικίες, οι λόγοι εμφανίζουν μικρές διαφορές μεταξύ τους, οι οποίες από τη στατιστική ανάλυση (μη παραμετρικό t – test) προκύπτει ότι δεν είναι σημαντικές ($0,2 < P < 1,0$).

Επιπλέον στα επόμενα γραφήματα 3.13 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα και η στατιστική ανάλυση μεταξύ των δύο ηλικιών και για τα δύο φύλα.



(α)



(β)

Γράφημα 3.13 Σύγκριση αποτελεσμάτων του λόγου Ca/P των οστών μέσω φασματοσκοπίας Auger μεταξύ των ηλικιών 5 και 14 μηνών **α)** αρσενικοί μύες **β)** θηλυκοί μύες.

Στα γραφήματα 3.13 φαίνεται ότι μεταξύ των οστών του ίδιου φύλου ανάμεσα στις δύο ηλικίες οι διαφορές δεν είναι σημαντικές ($0,08 < P < 1,0$). Ο λόγος στο μηρό στην ηλικία των 14 μηνών στους αρσενικούς μύες εμφανίζεται μικρότερος σε σχέση με την ηλικία των 5 μηνών, αλλά δεν είναι στατιστικά σημαντικός ($P = 0,08$). Επιπλέον ο λόγος στην ηλικία των 14 μηνών στους θηλυκούς μύες εμφανίζει μια πτώση σε σύγκριση με αυτόν της νεαρότερης ηλικίας χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντικός ($P = 1,0$).

3.1.3 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΛΟΓΩΝ Ca/P ΑΝΑΜΕΣΑ ΣΤΑ ΤΡΩΚΤΙΚΑ

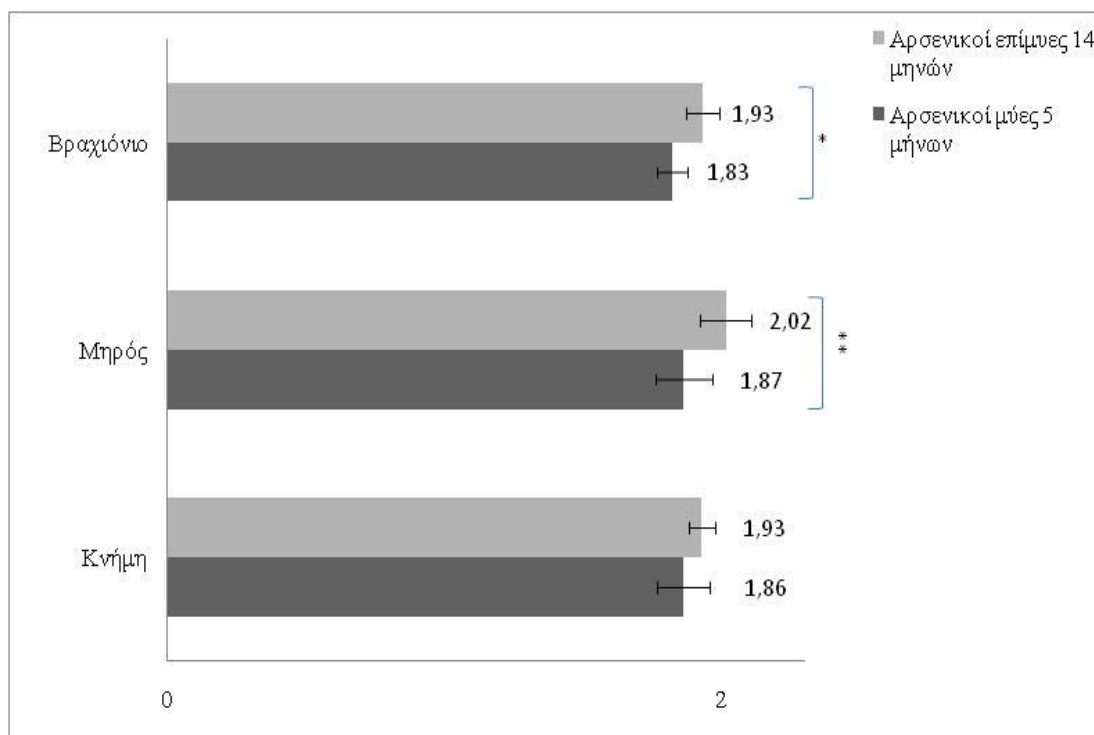
Τα τρωκτικά χρησιμοποιούνται ευρέως στην έρευνα λόγω της εύκολης στέγασής τους και του μικρού κόστους συντήρησης και απόκτησής τους. Ιδιαίτερα σήμερα ο επίμυς είναι το πιο διαδεδομένο ζωικό πρότυπο για τη μελέτη της οστεοπόρωσης [78]. Ως προς την οστική τους ανάπτυξη όμως, τα δύο κύρια είδη τρωκτικών που χρησιμοποιούνται

Κεφάλαιο 3 – Αποτελέσματα

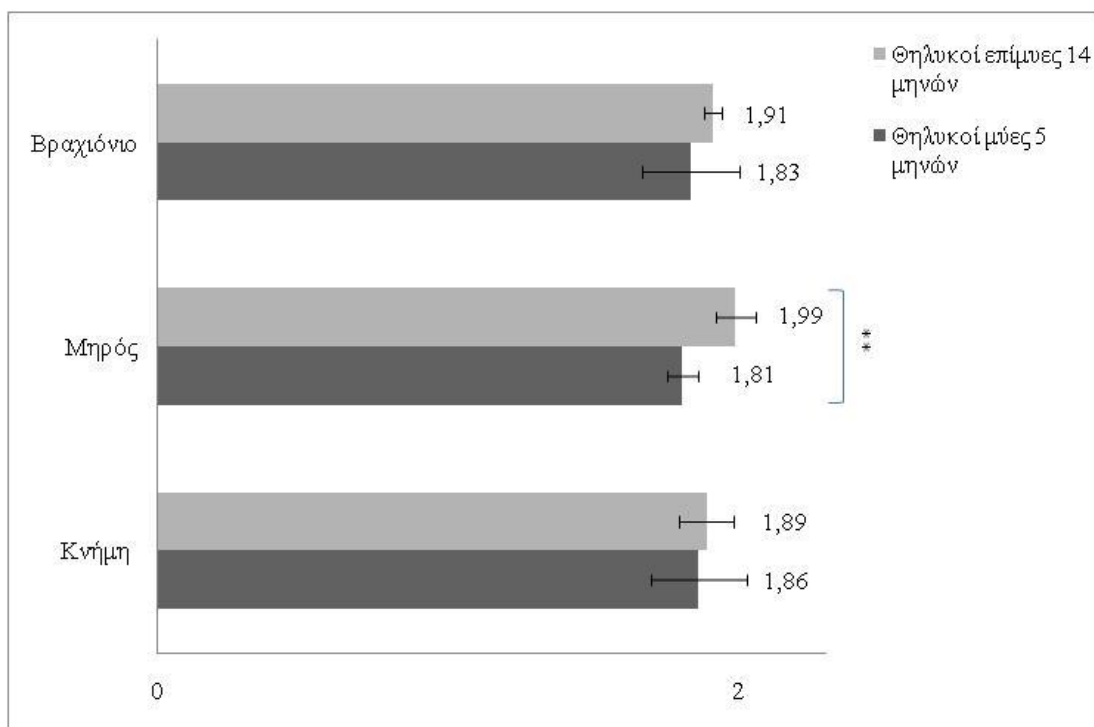
(μύες, επίμυες), παρουσιάζουν διαφορές. Έτσι, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [80], [141] η οστική ανάπτυξη φτάνει στο μέγιστο σε διαφορετική ηλικία για τους μύες και τους επίμυες. Κρίνεται λοιπόν, σκόπιμο η σύγκριση των λόγων Ca/P μεταξύ των δύο ειδών στην ηλικία της μέγιστης οστικής πυκνότητας, ώστε να καταδειχτούν οι τυχόν διαφορές στο λόγο, λόγω της διαφορετικότητας του ζώου.

Η σύγκριση των λόγων, μέσω φασματοσκοπίας Auger, γίνεται ανάμεσα στα συμπαγή οστά (κνήμη, μηρός, βραχιόνιο) για την ηλικία των 5 μηνών για τους μύες και των 14 μηνών για τους επίμυες. Οι ηλικίες αυτές είναι κοντά στην ηλικία μέγιστης οστικής πυκνότητας για το κάθε είδος ζώου.

Τα αποτελέσματα της σύγκρισης τόσο για τα αρσενικά όσο και τα θηλυκά ζώα παρουσιάζονται στα παρακάτω γραφήματα.



(α)



(β)

Γράφημα 3.14 Σύγκριση αποτελεσμάτων του λόγου Ca/P των οστών μέσω φασματοσκοπίας Auger μεταξύ των τρωκτικών **α)** αρσενικοί μύες ηλικίας 5 μηνών και αρσενικοί επίμυες ηλικίας 14 μηνών, **β)** θηλυκοί μύες ηλικίας 5 μηνών και θηλυκοί επίμυες ηλικίας 14 μηνών. (** $P \leq 0,01$, * $P \leq 0,05$)

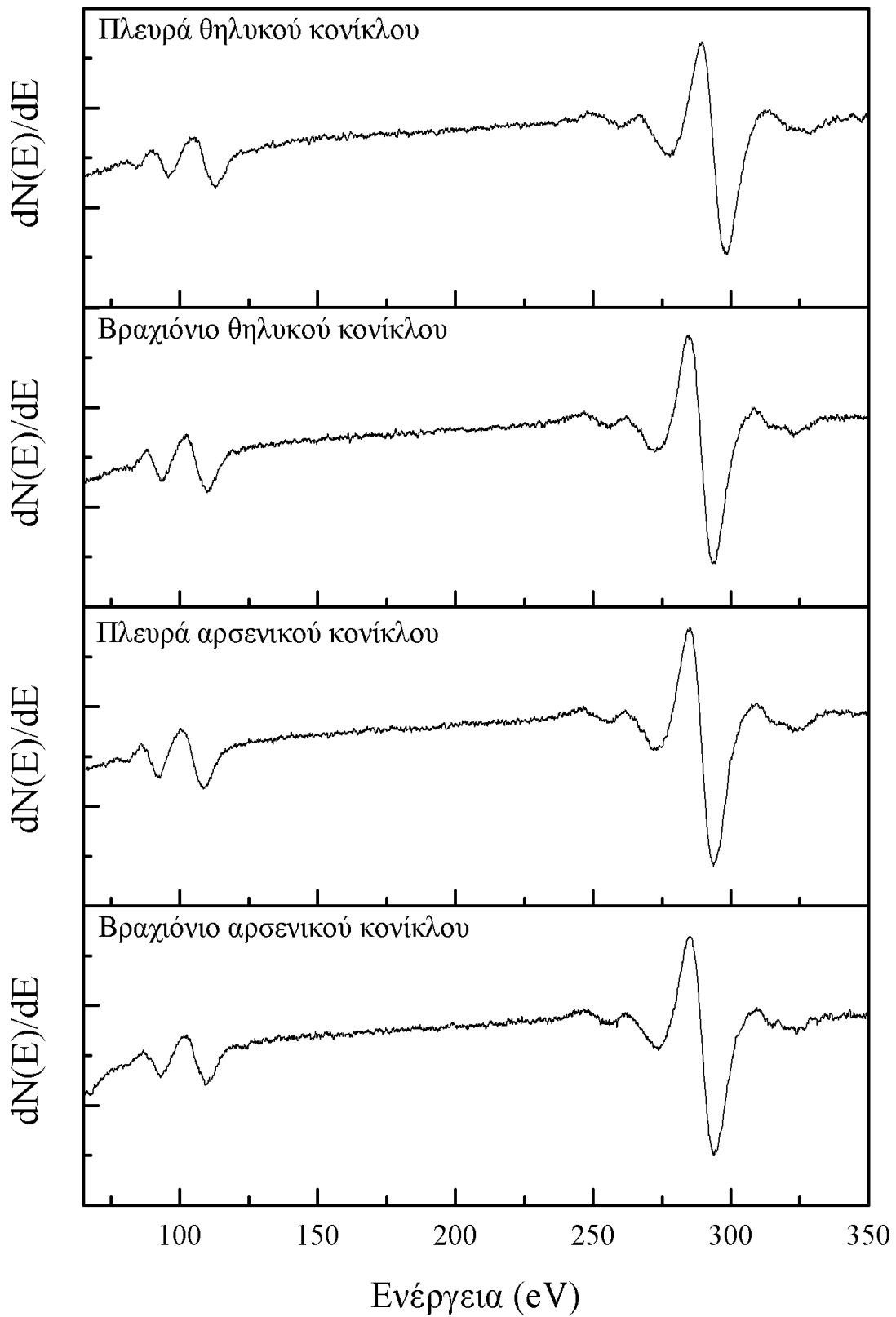
Στα γραφήματα 3.14 φαίνεται ότι από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων για τα συμπαγή οστά μεταξύ των δύο ζώων στα δύο φύλα, στην ηλικία της οστικής ενηλικίωσης δεν προκύπτουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές (μη παραμετρικό t – test) για τα οστά των κνημών ($0,2 < P < 0,9$). Στα οστά των μηρών αντίθετα, τόσο στα αρσενικά όσο και στα θηλυκά ζώα, προκύπτει από τη στατιστική ανάλυση σημαντική διαφορά ($0,008 < P < 0,009$). Τέλος, ανάμεσα στα βραχιόνια των δύο αρσενικών ζώων εμφανίζονται στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($P < 0,01$), ενώ αντίθετα ανάμεσα στα βραχιόνια των δύο θηλυκών ζώων δεν προκύπτουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($P > 0,1$) αν και ο λόγος εμφανίζεται μειωμένος.

3.1.4 ΜΕΤΡΗΣΗ ΛΟΓΟΥ Ca/P ΣΤΟΥΣ ΚΟΝΙΚΛΟΥΣ

Όπως στα τρωκτικά, έτσι και στους κονίκλους επιλέχθηκαν τα συμπαγή οστά των άκρων (κνήμη, μηρός, βραχιόνιο) και των πλευρών του δεξιού μέρους των ζώων. Στη συνέχεια, τα οστά επεξεργάστηκαν θερμικά για την αφαίρεση του ύδατος από αυτά, κονιορτοποιήθηκαν και η σκόνη συμπίεστηκε στη μορφή της παστίλιας (βλ υλικά και μέθοδοι).

3.1.4.1 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ AUGER

Κάθε μια από τις παστίλιες μελετήθηκε με τη φασματοσκοπία Auger. Ενδεικτικά τα φάσματα από τα οστά του βραχιονίου και των πλευρών αρσενικών και θηλυκών κονίκλων απεικονίζονται στο παρακάτω γράφημα (3.15). Τα φάσματα αυτά είναι όλα παρόμοια με αυτό του γραφήματος 3.1. Οι διαφορές τους έγκεινται στο σχετικό ύψος των κορυφών των δύο στοιχείων (Ca και P), αλλά όχι στη θέση των κορυφών. Η θέση των κορυφών είναι στα ίδια όρια με αυτά των τρωκτικών (280 – 290 eV και 90 – 110 eV για το Ca και P αντίστοιχα). Παρόμοια φάσματα εμφανίζουν και όλα τα προς μελέτη οστά των κονίκλων.



Γράφημα 3.15 Φάσματα Auger βραχίονιου και πλευρών αρσενικών και θηλυκών κονίκλων.

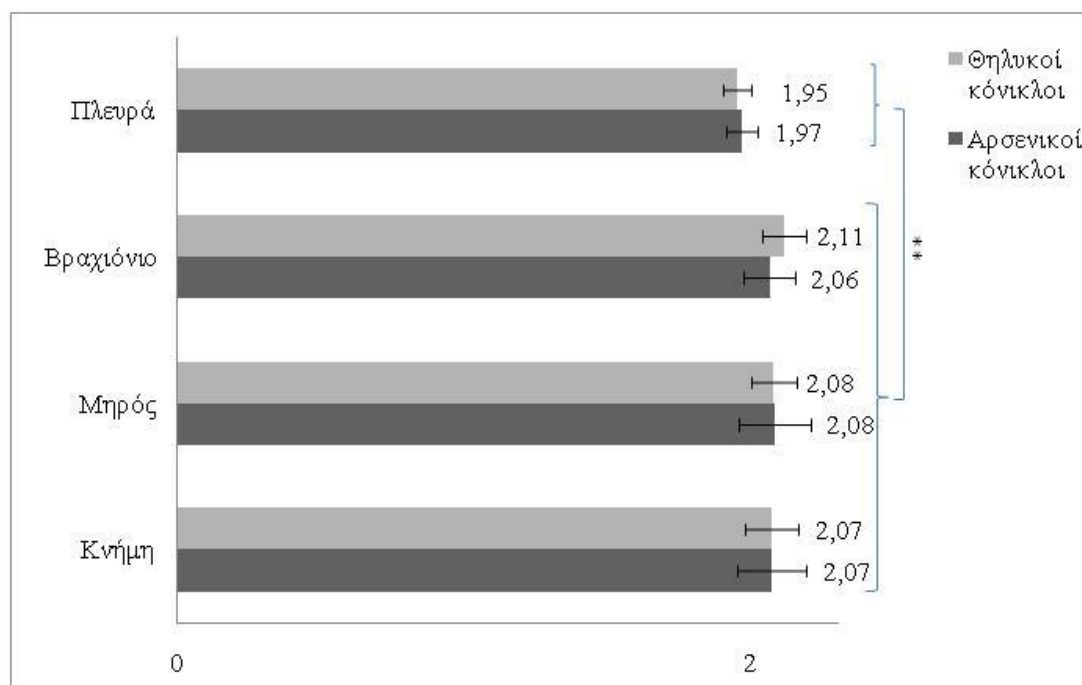
Κεφάλαιο 3 – Αποτελέσματα

Στα φάσματα μετρήθηκε ο λόγος Ca/P για κάθε είδος οστού με τις απαραίτητες διορθώσεις, όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 3.1.1.1. Τα αποτελέσματα για τα δύο φύλα παρουσιάζονται στον πίνακα 3.4 όπου αναγράφονται με τη μορφή μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση (mean \pm S.D.).

Φύλο	Οστά			
	Κνήμη	Μηρός	Βραχιόνιο	Πλευρά
Άρρεν	2,07 \pm 0,12	2,08 \pm 0,13	2,06 \pm 0,09	1,97 \pm 0,05
Θήλυ	2,07 \pm 0,09	2,08 \pm 0,08	2,11 \pm 0,08	1,95 \pm 0,05

Πίνακας 3.4 Αποτελέσματα του λόγου Ca/P μέσω φασματοσκοπίας Auger στους κονίκλους για τα δύο φύλα ανάλογα με το είδος του οστού. Τα αποτελέσματα είναι υπό τη μορφή μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση (mean \pm S.D.)

Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα και η στατιστική ανάλυση των διαφορών των τιμών του λόγου Ca/P μεταξύ των δύο φύλων, καθώς και μεταξύ των αντίστοιχων οστών των κονίκλων παρουσιάζονται στο γράφημα 3.16.



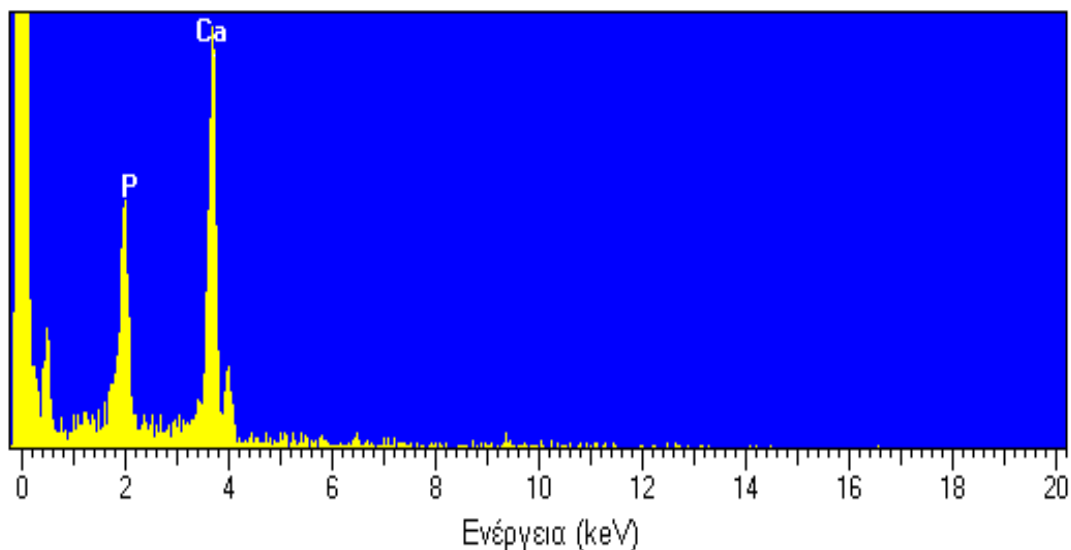
Γράφημά 3.16 Σύγκριση αποτελεσμάτων του λόγου Ca/P των μετρηθέντων οστών μεταξύ αρσενικών και θηλυκών κονίκλων. (** P \leq 0,01)

Από το παραπάνω γράφημα είναι σαφές ότι οι λόγοι Ca/P μεταξύ των συμπαγών οστών τόσο στους αρσενικούς όσο και στους θηλυκούς κονίκλους εμφανίζουν μικρές διαφορές χωρίς όμως οι διαφορές αυτές να είναι στατιστικώς σημαντικές ($0,2 < P < 0,9$). Μελετώντας το σύνολο των συμπαγών σε σύγκριση με τα σπογγώδη οστά των πλευρών ο λόγος εμφανίζεται σημαντικά μικρότερος στα πλευρά και στα δύο φύλα ($P \leq 0,01$).

Παρατηρώντας το λόγο μεταξύ των δύο φύλων, για τα αντίστοιχα οστά, εμφανίζονται μικρές αποκλίσεις. Οι διαφορές αυτές, μεταξύ αρσενικών και θηλυκών κονίκλων, σύμφωνα με την στατιστική ανάλυση (μη παραμετρικό t – test) δεν είναι σημαντικές για τα αντίστοιχα συμπαγή και σπογγώδη οστά ($0,3 < P < 0,9$).

3.1.4.2 SEM – EDS

Από τις παστίλιες των οστών των κονίκλων επιλέχθηκαν 3 για κάθε είδος και φύλο. Πραγματοποιήθηκε εναπόθεση λεπτού στρώματος άνθρακα στην επιφάνειά τους (βλ. υλικά και μέθοδοι) και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στο SEM για να μελετηθούν στοιχειακά με τη φασματοσκοπία EDS. Στο παρακάτω γράφημα 3.17 παρουσιάζεται ένα χαρακτηριστικό φάσμα από οστό κνήμης αρσενικού κονίκλου.



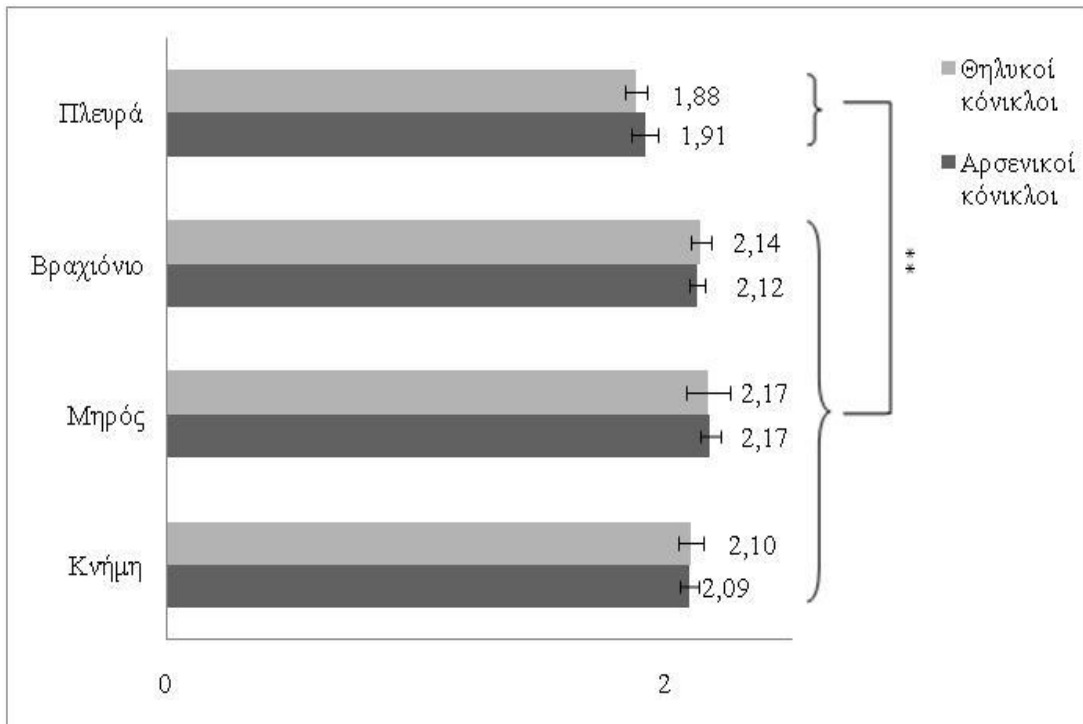
Γράφημα 3.17 Φάσμα EDS από παστίλια συμπαγούς οστού κνήμης αρσενικού κονίκλου.

Το φάσμα είναι παρόμοιο με αυτό των τρωκτικών (γράφημα 3.7) αλλάζει όμως ο προς τη συγκέντρωση των δύο στοιχείων (Ca και P) μετά τη μαθηματική επεξεργασία (βλ. εισαγωγή). Τα φάσματα όλων των δειγμάτων είναι παρόμοια με αυτά του γραφήματος 3.16. Οι μόνες διαφορές οφείλονται στη συγκέντρωση των στοιχείων αλλά όχι στη θέση των κορυφών τους (Ca για την $K_{\alpha 1}$ στα 2,01 keV και του P για την ίδια μετάβαση στα 3,69 keV). Στη μέτρηση των λόγων συνυπολογίστηκε η διόρθωση ZAF από το λογισμικό όμοια με το κεφάλαιο 3.1.1.2. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα 3.5 υπό τη μορφή μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση (mean \pm S.D.).

Φύλο	Οστά			
	Κνήμη	Μηρός	Βραχιόνιο	Πλευρά
Άρρεν	2,09 \pm 0,04	2,17 \pm 0,04	2,12 \pm 0,03	1,91 \pm 0,05
Θήλυ	2,10 \pm 0,05	2,17 \pm 0,09	2,14 \pm 0,04	1,88 \pm 0,04

Πίνακας 3.5 Αποτελέσματα του λόγου Ca/P μέσω φασματοσκοπίας EDS στους κονίκλους για τα δύο φύλα ανάλογα με το είδος του οστού. Τα αποτελέσματα είναι υπό τη μορφή μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση (mean \pm S.D.)

Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα και η στατιστική ανάλυση των διαφορών των τιμών του λόγου Ca/P μεταξύ των δύο φύλων καθώς και των διαφόρων οστών τους παρουσιάζονται στο γράφημα 3.18.



Γράφημά 3.18 Σύγκριση αποτελεσμάτων του λόγου Ca/P των οστών μέσω φασματοσκοπίας EDS μεταξύ αρσενικών και θηλυκών κόνικλων (** $P \leq 0,01$)

Στο παραπάνω γράφημα παρατηρείται ότι οι λόγοι Ca/P μεταξύ των συμπαγών οστών στους αρσενικούς και στους θηλυκούς κόνικλους εμφανίζουν μικρές διαφορές. Οι διαφορές αυτές σύμφωνα με την στατιστική ανάλυση (μη παραμετρικό t - test) δεν είναι στατιστικά σημαντικές ($0,3 < P < 1,0$). Μελετώντας το σύνολο των συμπαγών σε σύγκριση με τα σπογγώδη οστά των πλευρών ο λόγος είναι εμφανώς μικρότερος στα σπογγώδη. Έτσι, στατιστικά (ANOVA) προκύπτει ότι ο λόγος είναι σημαντικά μικρότερος στα σπογγώδη οστά και στα δύο φύλα ($P \leq 0,01$).

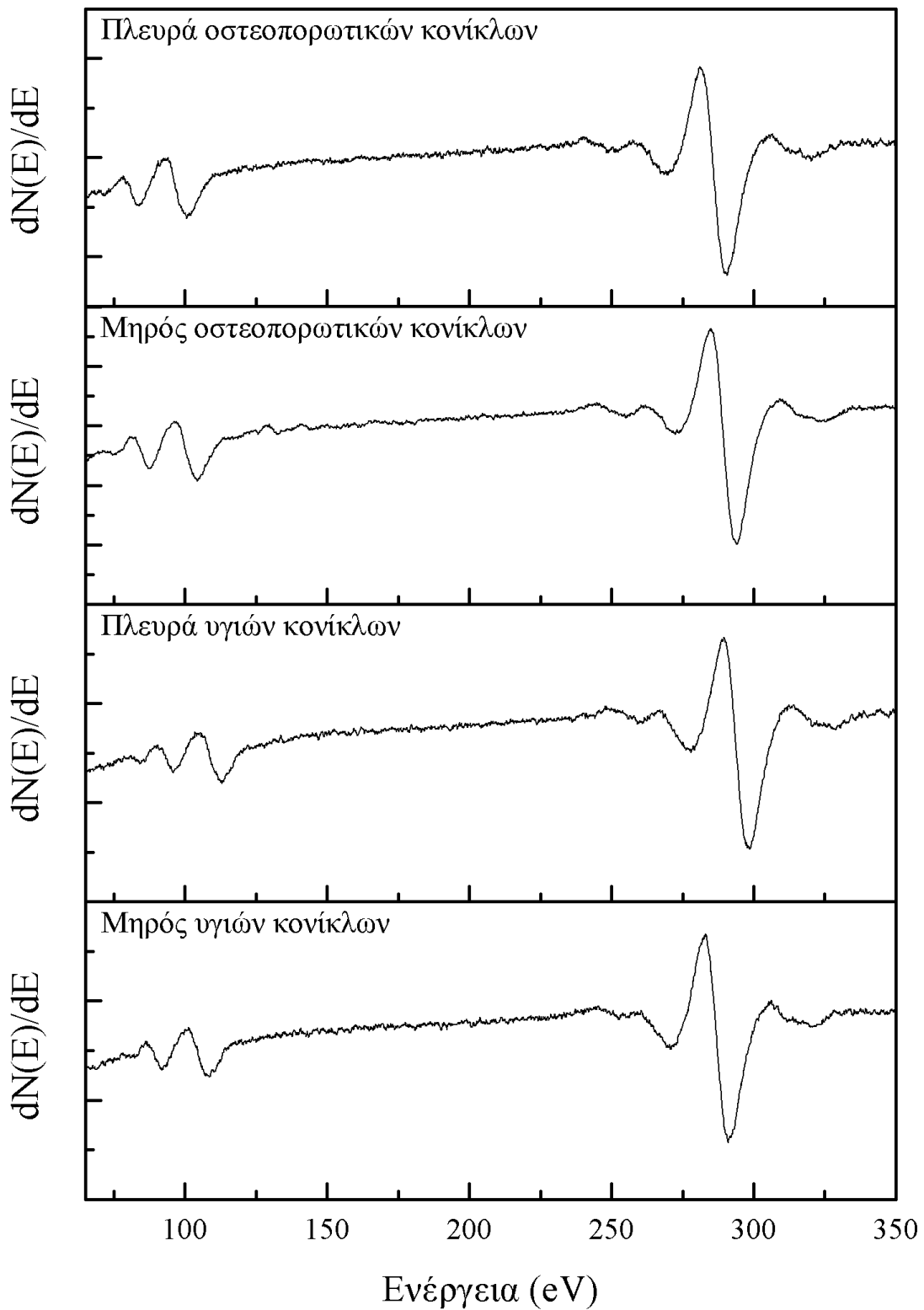
Παρατηρώντας το λόγο μεταξύ των δύο φύλων παρουσιάζονται μικρές αποκλίσεις μεταξύ των αντίστοιχων οστών. Οι διαφορές αυτές δεν είναι σημαντικές τόσο στα συμπαγή όσο στα σπογγώδη οστά ($0,6 < P < 1,0$).

3.2 ΜΕΛΕΤΗ ΛΟΓΟΥ Ca/P ΣΕ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΤΙΚΑ ΟΣΤΑ

Στην ομάδα των 5 θηλυκών κονίκλων προκλήθηκε οστεοπόρωση στηριζόμενη στη μέθοδο προκλητής οστεοπόρωσης ΙΜΟ. Στη συνέχεια τα οστά του δεξιού μέρους επεξεργάστηκαν θερμικά για την αφαίρεση του ύδατος από αυτά, κονιορτοποιήθηκαν και η σκόνη συμπιέστηκε στη μορφή της παστίλιας (βλ. υλικά και μέθοδοι).

3.2.1 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ AUGER

Κάθε μια από τις παστίλιες μελετήθηκε με τη φασματοσκοπία Auger. Στο γράφημα 3.19 απεικονίζονται τα φάσματα από συμπαγή οστά μηρού και από σπογγώδη οστά πλευρών οστεοπορωτικών και φυσιολογικών κονίκλων. Τα φάσματα δεν παρουσιάζουν εμφανείς διαφορές και είναι όλα παρόμοια με αυτό του γραφήματος 3.1. Η διαφορά τους έγκειται ως προς το σχετικό ύψος των κορυφών των δύο στοιχείων (Ca και P) αλλά όχι ως προς τη θέση των κορυφών. Η θέση των κορυφών είναι στα ίδια όρια με αυτά των φυσιολογικών κονίκλων της προηγούμενης παραγράφου (280 – 290 eV και 90 – 110 eV για το Ca και P αντίστοιχα). Παρόμοια φάσματα εμφανίζουν και όλα τα προς μελέτη οστά των οστεοπορωτικών κονίκλων.



Γράφημα 3.19 Φάσματα Auger μηρού και πλευρών οστεοπορωτικών και φυσιολογικών κονίκλων.

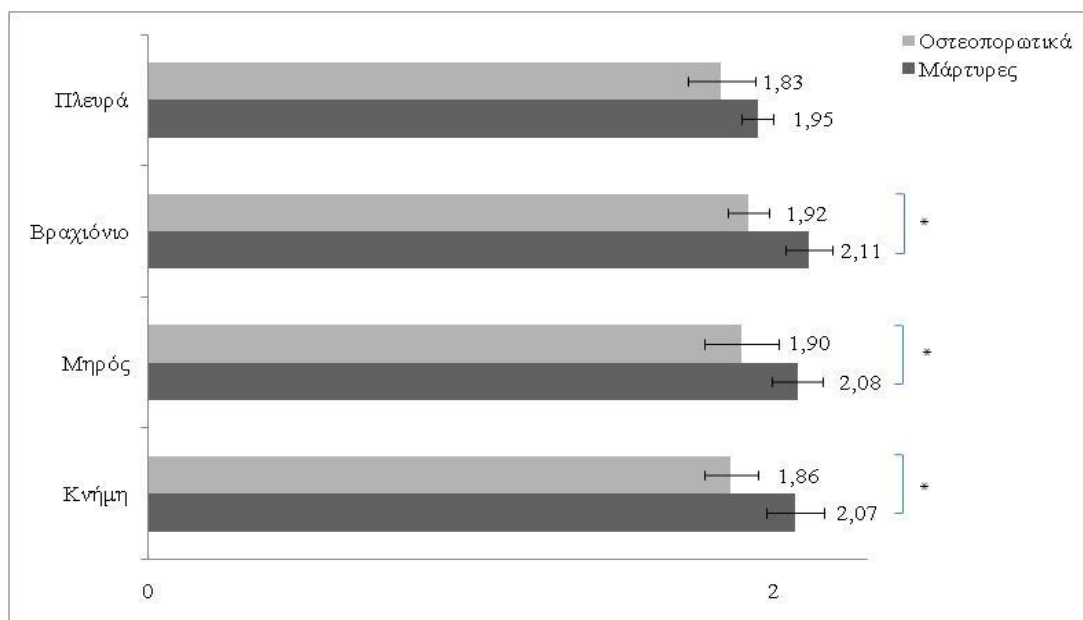
Κεφάλαιο 3 – Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα των λόγων, μαζί με αυτά των 10 φυσιολογικών κονίκλων που μετρήθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο και αποτελούν τους μάρτυρες για τη σύγκριση, παρουσιάζονται στον πίνακα 3.6. Τα αποτελέσματα είναι υπό τη μορφή μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση (mean \pm S.D.).

Είδος	Οστά			
	Κνήμη	Μηρός	Βραχιόνιο	Πλευρά
Μάρτυρες	2,07 \pm 0,09	2,08 \pm 0,08	2,11 \pm 0,08	1,95 \pm 0,05
Οστεοπορωτικά	1,86 \pm 0,09	1,90 \pm 0,12	1,92 \pm 0,07	1,83 \pm 0,11

Πίνακας 3.6 Αποτελέσματα του λόγου Ca/P μέσω φασματοσκοπίας Auger για τους μάρτυρες και τους οστεοπορωτικούς κονίκλους ανάλογα με το είδος του οστού. Τα αποτελέσματα είναι υπό τη μορφή μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση (mean \pm S.D.)

Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα και η στατιστική ανάλυση των διαφορών των τιμών του λόγου Ca/P μεταξύ μαρτύρων και οστεοπορωτικών κονίκλων παρουσιάζονται στο παρακάτω γράφημα 3.20.



Γράφημα 3.20 Σύγκριση αποτελεσμάτων του λόγου Ca/P μέσω φασματοσκοπίας Auger μεταξύ μαρτύρων και οστεοπορωτικών κονίκλων. (* $P \leq 0,05$)

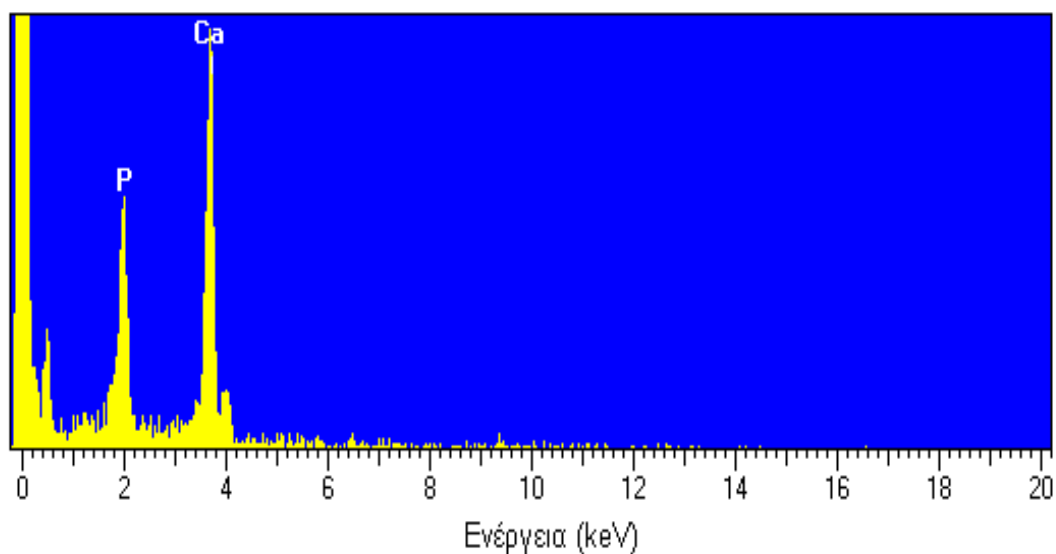
Όπως απεικονίζεται στο παραπάνω γράφημα, σε όλα τα οστεοπορωτικά οστά ο λόγος εμφανίζεται μειωμένος σε σχέση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά. Μελετώντας τη μείωση αυτή στατιστικά (μη παραμετρικό $t - test$), προκύπτει ότι ο λόγος Ca/P στα συμπαγή οστεοπορωτικά οστά είναι σημαντικά μικρότερος από τον αντίστοιχο των φυσιολογικών οστών ($0,01 < P < 0,03$). Αντίθετα, στα σπογγώδη οστά των πλευρών η μείωση στα οστεοπορωτικά οστά σε σχέση με τα φυσιολογικά είναι μικρότερη από την αντίστοιχη των συμπαγών οστεοπορωτικών οστών. Ως αποτέλεσμα, μετά τη στατιστική ανάλυση (μη παραμετρικό $t - test$), ο λόγος Ca/P στα οστεοπορωτικά σπογγώδη οστά σε σύγκριση με τα φυσιολογικά δεν είναι σημαντικά μειωμένος ($P = 0,07$).

Επιπλέον, παρατηρώντας την τάση των τιμών στα οστεοπορωτικά οστά γίνεται εμφανές ότι η μείωση του λόγου εξαρτάται από τη θέση των οστών. Όσο περισσότερο τα οστά συμμετέχουν στην κίνηση (κνήμη), τόσο μικρότερος εμφανίζεται ο λόγος και λιγότερο σε αυτά που στηρίζουν το σώμα (μηρός) ή σε αυτά που συμμετέχουν λιγότερο στην κίνηση (βραχιόνια). Η ίδια τάση του λόγου Ca/P παρατηρείται και στα φυσιολογικά ζώα.

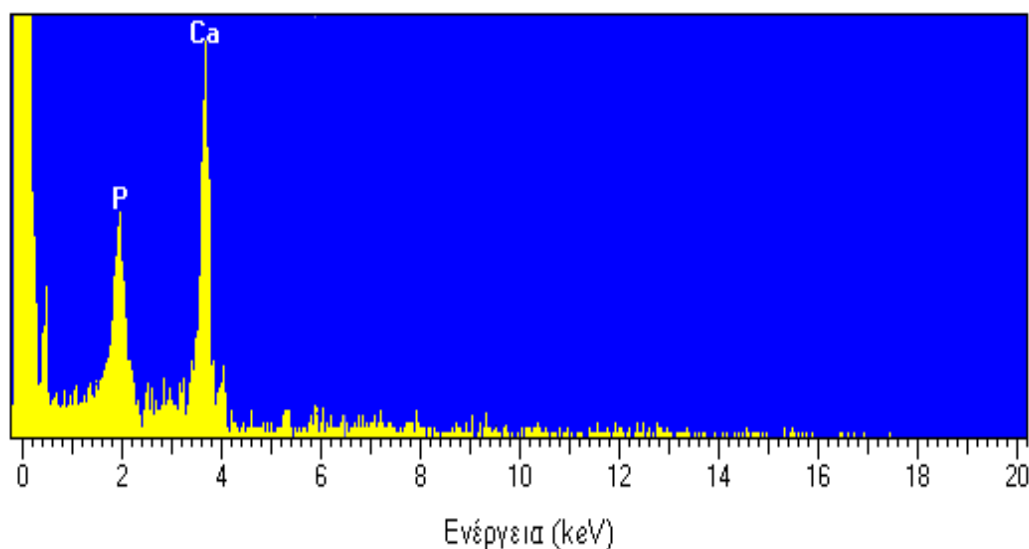
Τέλος, η τιμή του λόγου Ca/P για τα σπογγώδη οστεοπορωτικά οστά παρουσιάζεται μειωμένη αλλά όχι στατιστικά σημαντική σε σχέση με αυτή των συμπαγών οστών. Έτσι, από τη στατιστική ανάλυση (ANOVA) προκύπτει ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P = 0,6$) ανάμεσα στα συμπαγή και σπογγώδη οστεοπορωτικά οστά. Αντίθετα, όπως μελετήθηκε στο κεφάλαιο 3.1.4.1, στα φυσιολογικά οστά ο λόγος Ca/P εμφανίζεται σημαντικά μειωμένος στα σπογγώδη σε σχέση με τα συμπαγή οστά.

3.2.2 SEM – EDS

Από τις παστίλιες των οστών των οστεοπορωτικών κονίκλων επιλέχθηκαν 3 για κάθε είδος οστού και φύλο. Σε αυτές πραγματοποιήθηκε στην επιφάνειά τους εναπόθεση λεπτού στρώματος άνθρακα (βλ. υλικά και μέθοδοι) και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στο SEM για να μελετηθούν στοιχειακά με τη φασματοσκοπία EDS. Στο παρακάτω γράφημα 3.21 παρουσιάζονται δύο χαρακτηριστικά φάσματα από οστό μηρού οστεοπορωτικού και φυσιολογικού κονίκλου.



(α)



(β)

Γράφημα 3.21 Φάσμα EDS από παστίλια συμπαγούς οστού μηρού **α)** φυσιολογικού κονίκλου, **β)** οστεοπορωτικού κονίκλου.

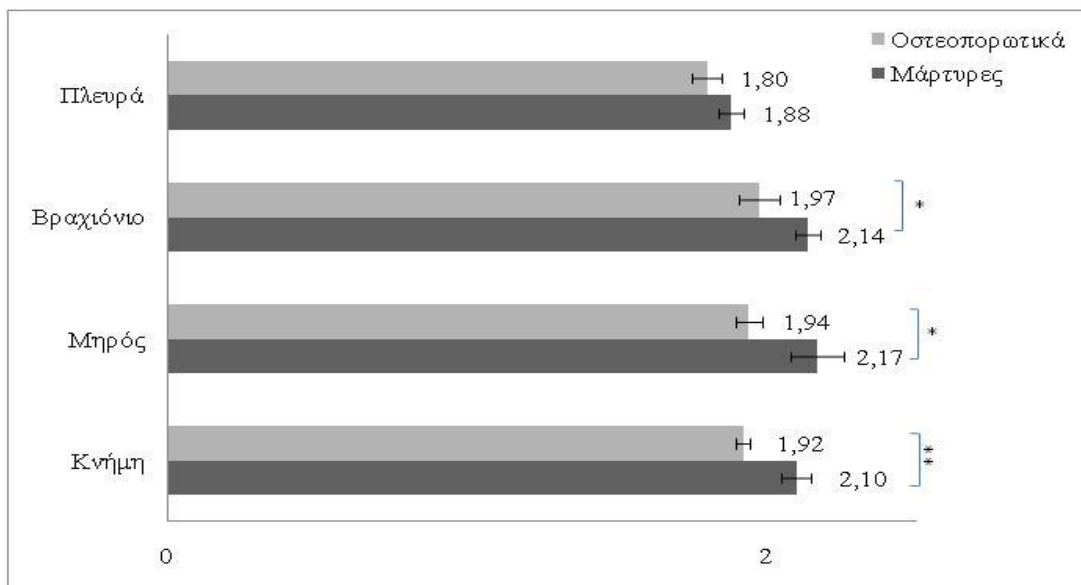
Όπως παρατηρείται, τα φάσματα εκ πρώτης όψεως είναι παρόμοια. Μετά όμως τη μαθηματική επεξεργασία (βλ. εισαγωγή) προκύπτουν διαφορές που οφείλονται στη συγκέντρωση των δύο στοιχείων (Ca και P). Παραστατικά, τα φάσματα όλων των οστεοπορωτικών οστών είναι όμοια με αυτό του γραφήματος 3.20β, διαφέρουν όμως μεταξύ τους ως προς τη συγκέντρωση των στοιχείων, αλλά όχι ως προς τη θέση τους (Ca για την $K_{\alpha 1}$ στα 2,01 keV και του P για την ίδια μετάβαση στα 3,69 keV). Στη μέτρηση 132

των λόγων Ca/P συνυπολογίστηκε η διόρθωση ZAF από το λογισμικό όμοια με το κεφάλαιο 3.1.1.2. Οι λόγοι Ca/P για τα οστά από τους θηλυκούς κονίκλους που προέκυψαν από την προηγούμενη μελέτη του SEM, του κεφαλαίου 3.1.4.2, αποτέλεσαν τους μάρτυρες για τη σύγκριση με τα οστεοπορωτικά. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα 3.7 υπό τη μορφή μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση (mean \pm S.D.).

Είδος	Οστά			
	Κνήμη	Μηρός	Βραχιόνιο	Πλευρά
Μάρτυρες	2,10 \pm 0,05	2,17 \pm 0,09	2,14 \pm 0,04	1,88 \pm 0,04
Οστεοπορωτικά	1,92 \pm 0,03	1,94 \pm 0,04	1,97 \pm 0,07	1,80 \pm 0,05

Πίνακας 3.7 Αποτελέσματα του λόγου Ca/P μέσω της φασματοσκοπία EDS για τους μάρτυρες και τους οστεοπορωτικούς κονίκλους ανάλογα με το είδος του οστού. Τα αποτελέσματα είναι υπό τη μορφή μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση (mean \pm S.D.)

Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα και η στατιστική ανάλυση των διαφορών των τιμών του λόγου Ca/P μεταξύ οστεοπορωτικών και φυσιολογικών οστών παρουσιάζεται στο γράφημα 3.22.



Γράφημα 3.22 Σύγκριση αποτελεσμάτων του λόγου Ca/P μέσω φασματοσκοπίας EDS μεταξύ μαρτύρων και οστεοπορωτικών κονίκλων. (* P \leq 0,05)

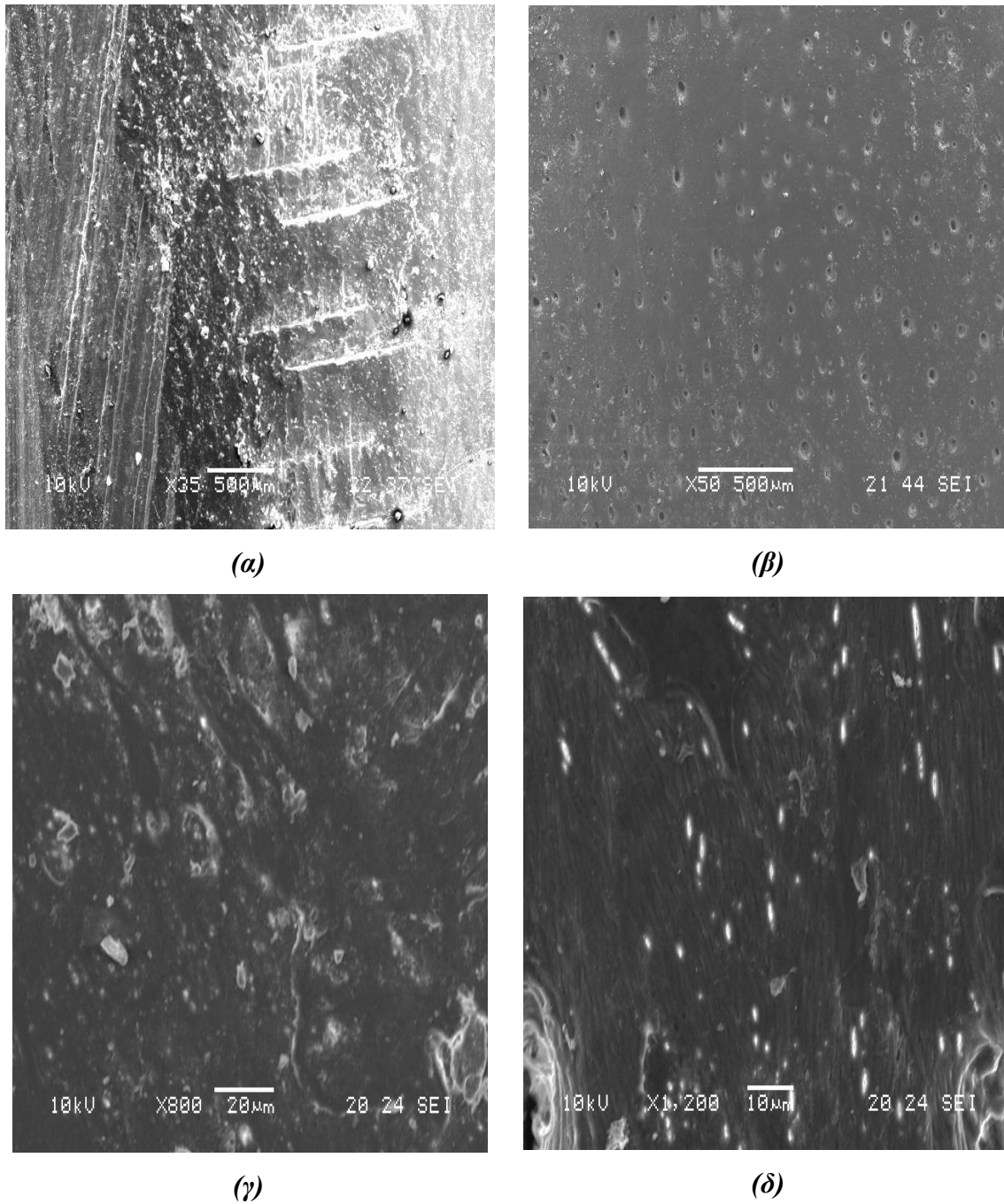
Στο γράφημα 3.22 παρατηρείται μείωση στις τιμές του λόγου Ca/P στα οστεοπορωτικά οστά σε σχέση με τα φυσιολογικά. Η μείωση αυτή για όλα τα συμπαγή οστά είναι της ίδιας τάξης και από τη στατιστική ανάλυση (μη παραμετρικό t – test) προκύπτει ότι ο λόγος Ca/P στα συμπαγή οστεοπορωτικά οστά είναι στατιστικά σημαντικός μικρότερος από τον αντίστοιχο των φυσιολογικών οστών ($0,006 < P < 0,02$). Η σημαντικότερη μείωση που παρατηρείται στην κνήμη οφείλεται στο μικρότερο εύρος τιμών των οστεοπορωτικών κνημών και όχι σε μεγαλύτερη ελάττωση του λόγου.

Τα σπογγώδη οστά αντίθετα, εμφανίζουν μικρότερης τάξης μείωση του λόγου σε σχέση με τα φυσιολογικά. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να μην παρατηρούνται στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των φυσιολογικών και οστεοπορωτικών σπογγωδών οστών ($P = 0,2$).

Παρατηρώντας τις τιμές του λόγου Ca/P για τα συμπαγή και τα σπογγώδη οστεοπορωτικά οστά, είναι εμφανές ότι ο λόγος παραμένει περίπου ίδιος. Έτσι, από τη στατιστική ανάλυση (ANOVA) προκύπτει ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($P = 0,06$) ανάμεσα στα συμπαγή και σπογγώδη οστεοπορωτικά οστά. Αντίθετα, όπως μελετήθηκε στο κεφάλαιο 3.1.4.2, στα φυσιολογικά οστά ο λόγος Ca/P εμφανίζεται σημαντικά μειωμένος στα σπογγώδη σε σχέση με τα συμπαγή οστά.

3.2.3 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ ΣΑΡΩΣΗΣ (SEM)

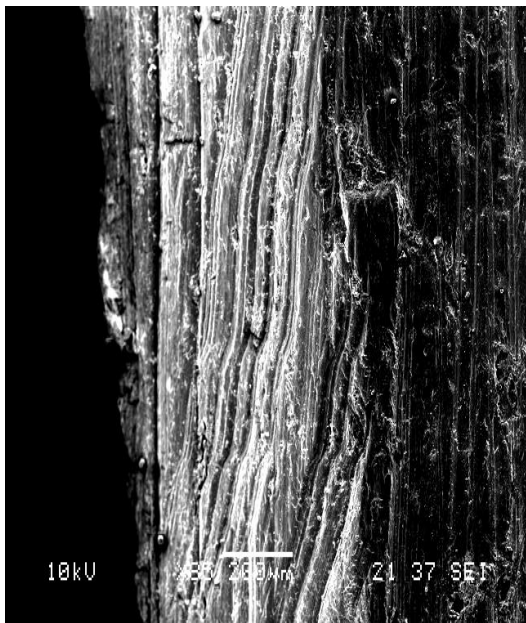
Από το μηριαίο οστό του αριστερού μέρους ενός θηλυκού φυσιολογικού κονίκλου και από το μέσο του οστού, επιλέχθηκε μια εγκάρσια τομή οστού μήκους 1 cm. Το ίδιο πραγματοποιήθηκε και στο σπογγώδες οστό των πλευρών. Στη συνέχεια τα τμήματα αυτά των οστών χωρίστηκαν στη μέση ώστε να παρατηρηθεί στο SEM το ενδόστεο και το περίοστέο. Πριν την εισαγωγή τους στο SEM έγινε εναπόθεση στην επιφάνειά τους λεπτού στρώματος άνθρακα ώστε να μην υπάρχει αλλοίωση από την ενεργητικότητα της δέσμης [31]. Η απεικόνιση πραγματοποιήθηκε για ενέργεια δέσμης 10 keV και για διάφορες μεγεθύνσεις όπως φαίνεται στην εικόνα 3.1.



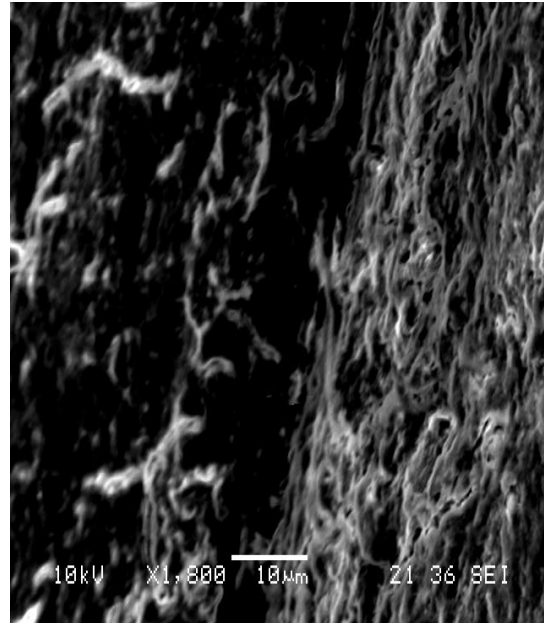
Εικόνα 3.1 Απεικόνιση στο SEM οστών από φυσιολογικούς κονίκλους
α) Περίοστεο μηριαίου οστού θηλυκού κονίκλου,
β) Ενδόστεο μηριαίου οστού θηλυκού κονίκλου,
γ) Περίοστεο οστού πλευρών θηλυκού κονίκλου,
δ) Ενδόστεο οστού πλευρών θηλυκού κονίκλου

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε για ένα συμπαγές (μηριαίο οστό) και ένα σπογγώδες (πλευρών) οστό της αριστερής πλευράς ενός οστεοπορωτικού κονίκλου.

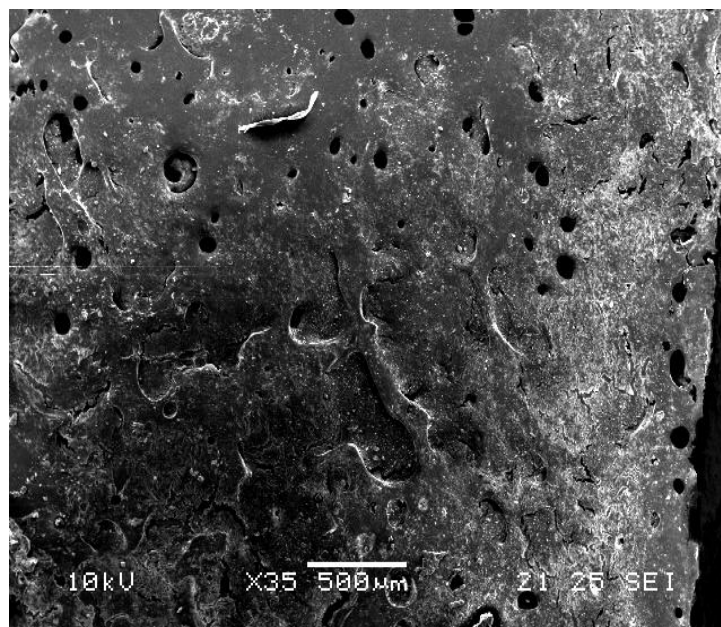
Όμοια, σε αυτά πραγματοποιήθηκε εναπόθεση άνθρακα και για την απεικόνιση χρησιμοποιήθηκε ενέργεια δέσμης 10 keV για διάφορες μεγεθύνσεις όπως φαίνεται στην εικόνα 3.2.



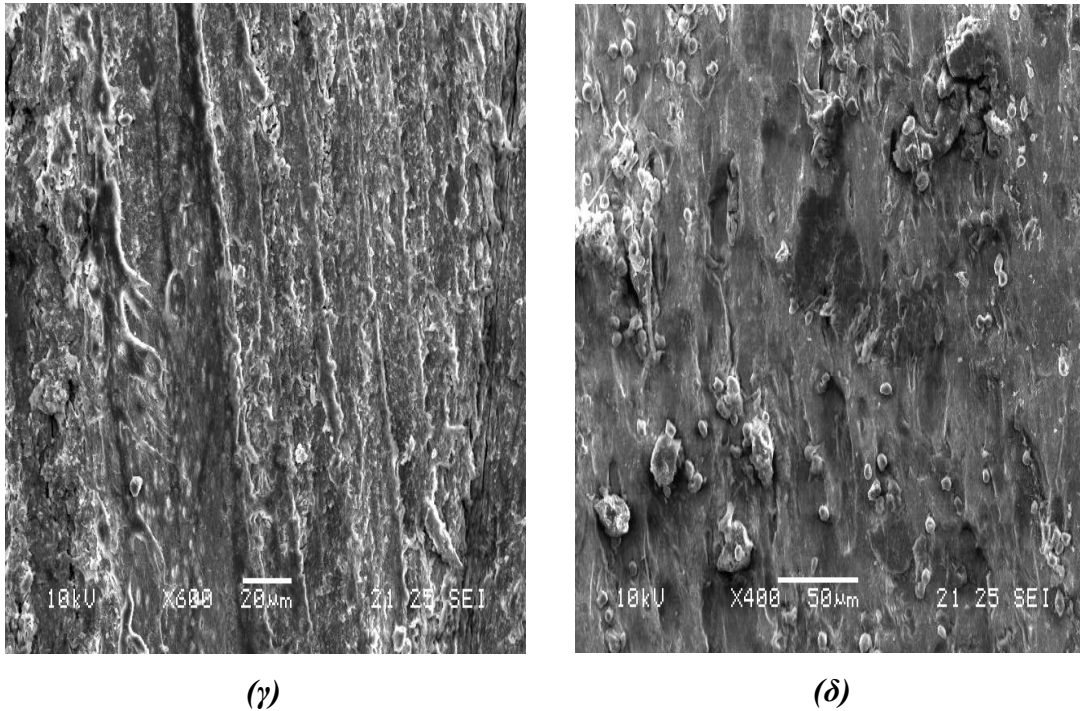
(α1)



(α2)



(β)



Εικόνα 3.2 Απεικόνιση στο SEM οστών από οστεοπορωτικούς κονίκλους
α1,2) Περίοστεο μηριαίου οστού οστεοπορωτικού κονίκλου,
β) Ενδόστεο μηριαίου οστού οστεοπορωτικού κονίκλου,
γ) Περίοστεο οστού πλευρών οστεοπορωτικού κονίκλου,
δ) Ενδόστεο οστού πλευρών οστεοπορωτικού κονίκλου

Στις εικόνες 3.1 των οστών του φυσιολογικού κονίκλου, τόσο στο συμπαγές όσο και στο σπογγώδες οστό, παρατηρείται η συνεχής δομή του υδροξυαπατίτη στο περίοστεο και στο ενδόστεο χωρίς αλλοιώσεις. Η συνεχής δομή παρατηρείται και σε μεγαλύτερη μεγέθυνση όπου διακρίνονται ρωγμές ή διαφορές στη μορφολογία (Εικόνα 3.1δ). Επιπλέον, στην εικόνα 3.1α φαίνονται τα παράλληλα επίπεδα της διάταξης του απατίτη χωρίς όμως να ξεχωρίζουν ιδιαίτερα μεταξύ τους. Στην απεικόνιση του ενδόστεου στα δύο οστά (συμπαγές και σπογγώδες) οι μικρές οπές που εμφανίζονται είναι οι σωλήνες Volkman. Μάλιστα δεν διαφέρουν μεταξύ τους στη διάμετρο, η οποία είναι περίπου 20 μμ.

Στις εικόνες του SEM για τα οστεοπορωτικά οστά (Εικόνα 3.2) παρατηρείται έντονη αλλοίωση της δομής του οστού. Στο περίοστεο των δύο οστών (Εικόνα 3.2 α1, α2, γ) εμφανίζεται ασυνέχεια στη δομή του ανόργανου υλικού και ανομοιόμορφη κατανομή του στην επιφάνεια. Επίσης, στην εικόνα 3.2α1 τα παράλληλα επίπεδα εναπόθεσης του υδροξυαπατίτη ξεχωρίζουν μεταξύ τους πιο έντονα σε σύγκριση με αυτά ενός

φυσιολογικού αντίστοιχου οστού. Επιπλέον, η επιφάνεια του περιόστεου (Εικόνα 3.2α2) δεν παρουσιάζει τη συνεχή δομή που έχει στο φυσιολογικό οστό (Εικόνα 3.1α). Το ίδιο εμφανίζεται και στην επιφάνεια του περιόστεου του σπογγώδους οστού (Εικόνα 3.2γ). Οι αλλοιώσεις στη δομή των οστεοπορωτικών οστών σε σύγκριση με την αντίστοιχη δομή των φυσιολογικών κονίκλων (Εικόνα 3.1γ) είναι εμφανείς. Τέλος, στο ενδόστεο του μηριαίου οστεοπορωτικού οστού (Εικόνα 3.2β) εμφανίζονται αλλοιώσεις στη δομή του υδροξυαπατίτη καθώς και σε αυτή των σωλήνων Volkman. Οι σωλήνες Volkman εμφανίζουν μεγαλύτερη διάμετρο και ανομοιόμορφη κατανομή σε σχέση με την εικόνα που παρουσιάζουν στο αντίστοιχο φυσιολογικό οστό (Εικόνα 3.1β). Έτσι, η διάμετρος που μετρήθηκε είναι της τάξης των 100 μm, η οποία διαφέρει από την διάμετρο των 20 μm του φυσιολογικού οστού. Η συνεχής δομή του υδροξυαπατίτη στο ενδόστεο του σπογγώδους οστού που απεικονίζεται στην εικόνα 3.1δ, αλλοιώνεται στην περίπτωση του οστεοπορωτικού οστού (Εικόνα 3.2δ).

3.3 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ AUGER ΚΑΙ SEM ΣΤΟΥΣ ΚΟΝΙΚΛΟΥΣ

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω, τα αποτελέσματα του λόγου Ca/P μετρούμενα και με τις δύο φασματοσκοπικές τεχνικές βρίσκονται σε πλήρη συμφωνία τόσο στους φυσιολογικούς όσο και στους οστεοπορωτικούς κονίκλους. Έτσι, οι δύο φασματοσκοπικές τεχνικές καταλήγουν ότι δεν υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές των λόγων Ca/P ανάμεσα στα αντίστοιχα φυσιολογικά οστά αρσενικών και θηλυκών κονίκλων. Επιπλέον, οι δύο τεχνικές συμφωνούν στο ότι δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των συμπαγών φυσιολογικών οστών. Στα σπογγώδη φυσιολογικά οστά όπως φαίνεται και με τις δύο τεχνικές ο λόγος εμφανίζεται στατιστικά σημαντικά μειωμένος σε σχέση με τα συμπαγή.

Για τα οστά των οστεοπορωτικών κονίκλων και οι δύο τεχνικές συμφωνούν στο ότι ο λόγος Ca/P είναι μειωμένος σε σύγκριση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά οστά. Έτσι, στα συμπαγή οστεοπορωτικά οστά ο λόγος είναι στατιστικά σημαντικά ελαττωμένος σε σχέση με τον αντίστοιχο των φυσιολογικών οστών. Αντίθετα, και οι δύο τεχνικές καταλήγουν στο ότι η μείωση στα σπογγώδη οστεοπορωτικά οστά δεν είναι στατιστικώς σημαντική σε

σχέση με τα φυσιολογικά. Επιπλέον, δεν εμφανίζονται στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των σπογγωδών και συμπαγών οστεοπορωτικών οστών.

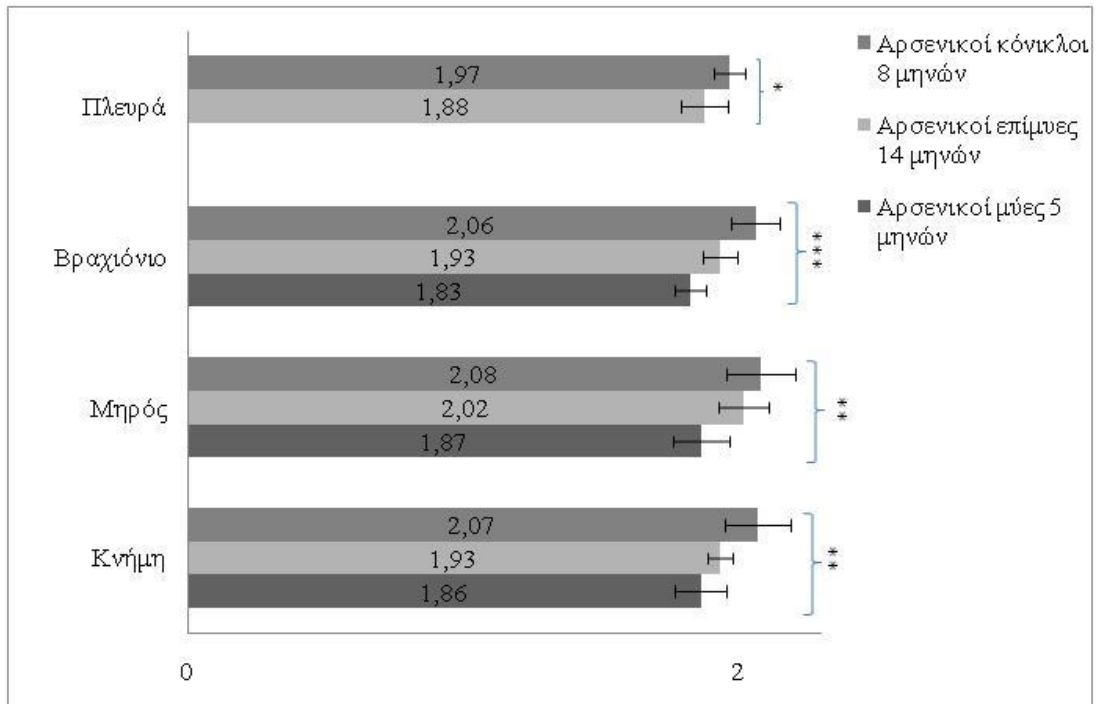
Τέλος, στη φασματοσκοπία Auger στα οστεοπορωτικά συμπαγή οστά γίνεται πιο φανερή μια διαμόρφωση του λόγου ανάλογα με τη χρήση του οστού (βλ. συζήτηση). Ακόμη, η απεικόνιση μέσω του SEM της επιφάνειας των οστεοπορωτικών οστών καταδεικνύει σημαντικές αλλοιώσεις στη δομή του υδροξυαπατίτη.

3.4 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΛΟΓΩΝ Ca/P ΑΝΑΜΕΣΑ ΣΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ

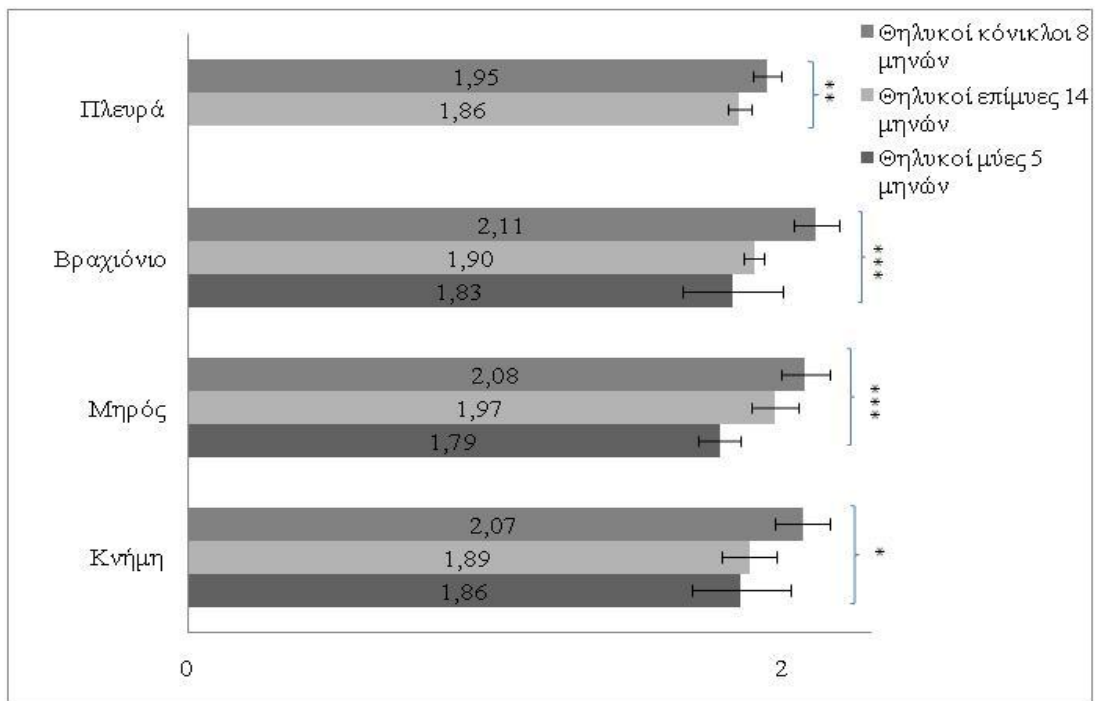
Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [62], [80], [141], η οστική ανάπτυξη φτάνει στο μέγιστο σε διαφορετική ηλικία για κάθε είδος πειραματοζώου. Έτσι, κρίνεται σκόπιμο η σύγκριση των λόγων Ca/P να γίνει μεταξύ των διαφορετικών ειδών στην ηλικία της μέγιστης οστικής πυκνότητας, ώστε να καταδειχτούν οι διαφορές λόγω της διαφορετικότητας του ζώου αλλά και της χρήσης των οστών από άποψη φυσιολογίας.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα των λόγων για τα συμπαγή και σπογγώδη οστά των τριών ειδών πειραματοζώων, επιλέγονται τα οστά των αρσενικών και θηλυκών μυών, επίμυων, κονίκλων, ηλικίας 5, 14 και 8 μηνών αντίστοιχα. Οι ηλικίες αυτές είναι παρόμοιες με τις ηλικίες μέγιστης οστικής πυκνότητας. Η στατιστική σύγκριση των αποτελεσμάτων παρουσιάζεται στα παρακάτω γραφήματα.

Κεφάλαιο 3 – Αποτελέσματα



(α)



(β)

Γράφημα 3.23 Σύγκριση των λόγων Ca/P μέσω φασματοσκοπίας Auger μεταξύ των ενήλικων πειραματόζώων **α)** Αρσενικά και **β)** Θηλυκά. (* $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$)

Από τα παραπάνω παρατηρείται μια ομοιόμορφη κατανομή των λόγων με αυξητική τάση ανάλογα με το μέγεθος του ζώου σε όλα τα είδη των οστών. Επιπλέον, η στατιστική ανάλυση (ANOVA για τα συμπαγή, μη παραμετρικό t – test για τα σπογγώδη οστά) φανερώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των αντίστοιχων οστών. Έτσι, η στατιστική ανάλυση ανάμεσα στα οστά των κνημών εμφανίζει στατιστικά σημαντικές διαφορές και στα δύο φύλα ($0,002 < P < 0,01$). Επιπλέον, στατιστικά σημαντικές διαφορές παρουσιάζονται και μεταξύ των μηρών με μεγαλύτερη σημαντικότητα στα θηλυκά ($P = 0,004$ για τα αρσενικά ζώα και $P < 0,0001$ για τα θηλυκά). Η ίδια σημαντική διαφορά παρουσιάζεται μεταξύ των βραχιόνιων τόσο στα αρσενικά όσο και στα θηλυκά ζώα ($P < 0,0001$).

Τέλος, ο λόγος Ca/P στα σπογγώδη οστά των επίμυων εμφανίζεται μικρότερος του αντίστοιχου των κονίκλων και στα δύο φύλα. Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική και στα δύο φύλα ($0,007 < P < 0,03$).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, ο ρόλος των οστών στον οργανισμό είναι σημαντικός, καθώς αυτά αποτελούν τον κυρίως συνδετικό και στηρικτικό ιστό του σώματος, ενώ παράλληλα συμμετέχουν στην αιμόσταση. Τα οστά αποτελούν αποθήκες αλάτων με βασικότερα το Ca και P, ενώ ρυθμίζουν τα επίπεδα των στοιχείων αυτών στον οργανισμό μέσω της οστικής ανακατασκευής. Έτσι, το σκελετικό σύστημα διατηρεί την ολοκληρωμένη του μορφή λόγω της δράσης των οστεοκλαστών και των οστεοβλαστών. Με τον τρόπο αυτό απελευθερώνεται και δεσμεύεται Ca και P από το αίμα. Οποιαδήποτε διαταραχή των στοιχείων αυτών στον οργανισμό έχει αντίκτυπο στα οστά. Συνεπώς, ο λόγος Ca/P αποτελεί βασική παράμετρο για τον προσδιορισμό της κατάστασης των οστών (φυσιολογική ή παθολογική).

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπική μελέτη των δύο βασικών ανόργανων συστατικών των οστών, ασβεστίου και φωσφόρου, με σκοπό τον υπολογισμό του λόγου Ca/P. Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, ο λόγος αυτός είναι ο πιο αξιόπιστος για να κατανοηθούν οι αλλαγές στα οστά με την ηλικία, το φύλο και τις σκελετικές ανωμαλίες λόγω παθήσεων όπως η οστεοπόρωση. Για τη φασματοσκοπική μελέτη χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία Auger ως μια νέα τεχνική για τον προσδιορισμό του λόγου Ca/P, καθώς και η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης με χρήση στοιχειακού αναλυτή ακτίνων – X (SEM – EDS).

Στα πλαίσια αυτά μελετήθηκαν βιοψίες συμπαγών (κνήμη, μηρός, βραχιόνιο) και σπογγωδών (πλευρά) οστών επίμυων (Wistar rats) των δύο φύλων και δύο διαφορετικών ηλικιών (5 και 14 μηνών). Με τον τρόπο αυτό εξετάστηκε κατά πόσο ο λόγος Ca/P επηρεάζεται από το είδος, τη σκελετική θέση του οστού, την ηλικία και το φύλο του ζώου. Επιπλέον, μελετήθηκαν βιοψίες αντίστοιχων οστών, ηλικιών και φύλων μυών (Swiss albino mice). Έτσι, εξετάστηκε, όπως και στην περίπτωση των επίμυων, κατά πόσο ο λόγος Ca/P επηρεάζεται από τους ίδιους παράγοντες. Επίσης, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των λόγων για τα αντίστοιχα οστά ανάμεσα στα δύο είδη πειραματοζώων στην ηλικία της οστικής ωρίμανσης, με σκοπό να εξεταστεί αν το είδος του τρωκτικού

διαμορφώνει το λόγο Ca/P. Ακόμη, για τον ίδιο σκοπό, μελετήθηκαν βιοψίες συμπαγών (κνήμη, μηρός, βραχιόνιο) και σπογγωδών (πλευρά) οστών κονίκλων (New Zealand rabbit) των δύο φύλων ηλικίας 8 μηνών. Οι θηλυκοί κόνικλοι αποτέλεσαν τους μάρτυρες για τη σύγκριση με τους οστεοπορωτικούς κόνικλους, στους οποίους προκλήθηκε οστεοπόρωση με τη μέθοδο Inflammation Mediated Osteoporosis (IMO). Από τις βιοψίες αντίστοιχων οστών με τους υγιείς κόνικλους (κνήμη, μηρός, βραχιόνιο, πλευρά) μελετήθηκε κατά πόσο ο λόγος Ca/P επηρεάζεται από την οστεοπόρωση, καθώς επίσης εξετάστηκε αν η θέση και το είδος (συμπαγές ή σπογγώδες) του οστού παίζει κάποιο ρόλο στο βαθμό ανάπτυξης της νόσου. Τέλος, πραγματοποιήθηκε γενική σύγκριση των λόγων Ca/P αντίστοιχων οστών μεταξύ των προς μελέτη πειραματοζώων.

4.1 ΛΟΓΟΣ Ca/P ΣΤΟΥΣ ΕΠΙΜΥΕΣ (Wistar rats)

Για να εξεταστεί αν ο λόγος επηρεάζεται από το μέρος (δεξί - αριστερό) του οστού στον οργανισμό μελετήθηκαν με τη φασματοσκοπία Auger, συμπαγή οστά του δεξιού και αριστερού μέρους επύμων 5 μηνών. Από τα αποτελέσματα του λόγου καθώς και τη στατιστική ανάλυση δεν προέκυψε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ αριστερού και δεξιού μέρους. Το αποτέλεσμα αυτό δικαιολογείται από τη μη ύπαρξη διαφορών στη συγκέντρωση του ανόργανου υλικού (Bone Mineral Content - BMC) σύμφωνα με προηγούμενη έρευνα των Libouban H. et al (2008) [79]. Μελέτες των Kathleen M. et al (1995) [35] αναφέρουν ότι παρουσιάζεται ασυμμετρία μεταξύ δεξιού και αριστερού μέρους στα εμπρόσθια οστά των επίμων, που όπως φαίνεται από την παρούσα εργασία δεν επηρεάζει το λόγο Ca/P. Η μη ύπαρξη διαφοράς στο λόγο Ca/P ανάμεσα στα δύο μέρη, οδήγησε να επιλεγούν για τη μελέτη μόνο τα οστά ενός μέρους των ζώων και συγκεκριμένα του δεξιού.

Τα αποτελέσματα από τις δύο φασματοσκοπικές τεχνικές βρίσκονται σε πλήρη συμφωνία. Έτσι, τόσο η φασματοσκοπία Auger όσο και η φασματοσκοπία EDS καταλήγουν ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές των λόγων ανάμεσα στα αντίστοιχα οστά αρσενικών και θηλυκών επίμων. Επιπλέον, τα αποτελέσματα συνιστούν ότι δεν υπάρχει στατιστική σημαντική διαφορά των λόγων μεταξύ των συμπαγών οστών για τους επίμους ηλικίας 5 μηνών. Στην ηλικία των 14 μηνών και στα δύο φύλα οι δύο

φασματοσκοπικές τεχνικές οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο λόγος Ca/P εμφανίζει σημαντική διαφορά ανάμεσα στους μηρούς και στα βραχιόνια, καθώς και στις κνήμες και τους μηρούς. Ακόμα, στα βραχιόνια και στις κνήμες, ο λόγος Ca/P είναι στατιστικά σημαντικά μικρότερος στη μεγαλύτερη ηλικία. Τέλος, όπως φαίνεται στα αποτελέσματα των δύο τεχνικών στα δύο φύλα και τις δύο ηλικίες, ο λόγος στα σπογγώδη οστά είναι στατιστικά σημαντικά μικρότερος σε σχέση με τα συμπαγή.

Για τον προσδιορισμό του λόγου ανάλογα με το φύλο εξετάστηκαν τόσο συμπαγή όσο και σπογγώδη οστά αρσενικών και θηλυκών επίμυων. Από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων δεν προέκυψαν σημαντικές διαφορές για τα αντίστοιχα οστά ανάμεσα στα δύο φύλα, παρόλο που στα θηλυκά ο λόγος εμφανίζεται ελάχιστα μειωμένος. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με προγενέστερη μελέτη μέσω φασματοσκοπίας EDS των Kourkoumelis N. and Tzaphlidou M. (2010) [73] σε συμπαγή οστά επίμυων ηλικίας 8 μηνών. Στηριζόμενοι στη μελέτη τους μέσω φασματοσκοπίας υπερύθρου (FTIR – Microscopy) κατέληξαν ότι ο χαμηλότερος λόγος Ca/P που εμφανίζεται στα θηλυκά πειραματόζωα οφείλεται στην υψηλότερη συγκέντρωση HPO_4^{2-} . Η αύξηση αυτή του φωσφορικού οξέος προέρχεται από την αντικατάσταση μερικών φωσφορικών ιόντων (PO_4^{3-}) από την όξινη φωσφορική ρίζα (HPO_4^{2-}) που δημιουργεί έλλειμμα ανιόντων. Το έλλειμμα αυτό δεν εξισορροπείται από την αφαίρεση κατιόντων Ca^{2+} από το πλέγμα του κρυστάλλου του υδροξυαπατίτη. Η ηλεκτρική ουδετερότητα του κρυστάλλου επιτυγχάνεται με πιθανή αύξηση των ανθρακικών ιόντων (CO_3^{2-}).

Από τα αποτελέσματα της μελέτης με τις δύο φασματοσκοπικές τεχνικές (φασματοσκοπία Auger, φασματοσκοπία EDS) προκύπτει ότι για τους επίμυες 5 μηνών ο λόγος για τα συμπαγή οστά και στα δύο φύλα βρίσκεται κοντά στη στοιχειομετρική τιμή του λόγου, που όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή είναι 2,16. Αν λοιπόν το οστό περιείχε μόνο υδροξυαπατίτη η τιμή του λόγου θα έπρεπε να ήταν 2,16. Τα οστά όμως περιέχουν και περίπου 30% – 40% οργανικές ουσίες. Τέτοιες ουσίες είναι ο μυελός των οστών και το λίπος. Έτσι, ο κόκκινος μυελός των οστών καταλαμβάνει το 75% του συνολικού μυελού, ενώ η συγκέντρωση P σε αυτόν είναι 20 φορές μεγαλύτερη από ό,τι στον κίτρινο μυελό. Ο μηρός περιέχει πολύ περισσότερο κόκκινο μυελό από ό,τι η κνήμη. Η συγκέντρωση του Ca και P στις ουσίες αυτές είναι κατά πολύ μικρότερη από ό,τι στον υδροξυαπατίτη με αποτέλεσμα να επηρεάζεται ο λόγος Ca/P. Επιπλέον, στα συμπαγή οστά η οργανική ουσία ποικίλει με διαφορετικές συγκεντρώσεις Ca και P, με συνέπεια να παρατηρούνται

διαφορές στο λόγο στα διάφορα μέρη των οστών [128]. Οι διαφορές αυτές μεταξύ των συμπαγών οστών, όπως φαίνεται από τη στατιστική ανάλυση, δεν είναι σημαντικές.

Στη διαμόρφωση του λόγου κατά την ενηλικίωση των ζώων διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο διάφοροι εξελικτικοί παράγοντες που είναι όμοιοι και στα δύο φύλα. Τέτοιοι παράγοντες είναι οι διαφορετικοί πληθυσμοί οστικών κυττάρων, η διαφορετική εμβιομηχανική χρήση και η διαφοροποίηση στην τροφοδοσία αίματος ανάμεσα στα οστά [1]. Με βάση αυτούς τους παράγοντες και με δεδομένο ότι στην ηλικία των 5 μηνών δεν υπάρχουν διαφορές ανάμεσα στα συμπαγή οστά, μπορούν να εξηγηθούν οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές που παρατηρούνται στην ηλικία των 14 μηνών ανάμεσα στο μηρό και την κνήμη, αλλά και στο μηρό και το βραχιόνιο. Στις διαφορές αυτές συμφωνούν και προγενέστερες μελέτες του λόγου Ca/P με την χρήση μικρο – τομογραφίας συγχρότρου των Speller R. et al (2005) και Tzaphlidou M. et al (2006). [115], [127] Σύμφωνα με τις μελέτες αυτές υπάρχουν σημαντικές διαφορές στον λόγο Ca/P ανάμεσα στα συμπαγή οστά του μηρού και της κνήμης καθώς και του μηρού και του βραχιόνιου θηλυκών επίμυων.

Επιπλέον, ο λόγος Ca/P είναι πιθανώς συνδεδεμένος με την αστάθεια που παρατηρείται με την ηλικία στη συγκέντρωση του ανόργανου υλικού (Bone Mineral Content - BMC) και στην οστική πυκνότητα (Bone Mineral Density – BMD). Οι επίμυες φτάνουν στην κορυφαία οστική πυκνότητα και συγκέντρωση ανόργανου υλικού στην ηλικία των 9 – 12 μηνών, ενώ οι παράγοντες αυτοί δεν μεταβάλλονται σημαντικά στα συμπαγή οστά μέχρι την ηλικία των 18 μηνών [37], [80]. Εντούτοις υπάρχει μια σταδιακή μείωση της συγκέντρωσης του ανόργανου υλικού η οποία επηρεάζει σημαντικά το λόγο Ca/P. Σε αυτό συμφωνούν οι Legros R. et al (1987) [77] όπου παρατήρησαν μείωση της συγκέντρωσης του HPO_4^{2-} με την ενηλικίωση των επίμυων λόγω αντικατάστασής του από ιόντα άνθρακα σε αντίθεση με τη συγκέντρωση των ιόντων ασβεστίου που παραμένει σταθερή. Επίσης, μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει σημαντική μείωση στα επίπεδα της οστεοκαλσίνης στον ορό του αίματος μετά τον 4 μήνα στους albino Louvain επίμυες, που αποτελούν διασταύρωση των Wistars επίμυων που χρησιμοποιούνται στην παρούσα εργασία [29]. Με βάση αυτά είναι δυνατόν να εξηγηθούν οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές που εμφανίζονται με την ηλικία στις κνήμες και στα βραχιόνια στα δύο φύλα. Μάλιστα, οι Wang L. et al (2001) [137] υποστηρίζουν ότι τόσο η συγκέντρωση του ανόργανου υλικού όσο και η οστική πυκνότητα ελαττώνονται σημαντικά με την ηλικία (μετά τους 9 μήνες) στην κνήμη αρσενικών επίμυων.

Στα αποτελέσματα με τις δύο φασματοσκοπικές μελέτες ο λόγος παρατηρείται στατιστικά σημαντικά μικρότερος στα σπογγώδη από ό,τι στα συμπαγή οστά. Η μείωση αυτή του λόγου εμφανίζεται και στα δύο φύλα καθώς και στις δύο ηλικίες. Ο μικρότερος λόγος Ca/P οφείλεται στο ότι τα σπογγώδη οστά εμφανίζουν μικρότερο βαθμό ασβεστοποίησης ενώ είναι πιο πλούσια σε συγκέντρωση άνθρακα [4]. Σύμφωνα με προγενέστερη έρευνα των Bigi A. et al (1997) [11], ο στοιχειομετρικός απατίτης δεν μετασχηματίζεται σε άλλη μορφή με τη θερμοκρασία, σε αντίθεση με τον άμορφο που παρουσιάζει μεγάλο θερμικό μετασχηματισμό σε $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (β – tricalcium phosphate). Ο μετασχηματισμός αυτός στα σπογγώδη οστά είναι μεγαλύτερος από ό,τι στα συμπαγή, με αποτέλεσμα μικρότερο ατομικό λόγο Ca/P στα σπογγώδη. Σε αυτό συμβάλλει το μικρότερο μέγεθος κρυστάλλων των σπογγωδών οστών και συνεπώς μεγαλύτερη επιφάνεια, που αυξάνει το θερμικό μετασχηματισμό, λόγω παρουσίας περισσότερου άμορφου απατίτη στην επιφάνεια των κρυστάλλων.

Σύμφωνα με τους Goodyear R. S. et al (2009) [42] στηριζόμενοι σε μελέτη τους μέσω φασματοσκοπίας Raman σε σπογγώδη οστά μυών (C57 Black 6), κατέληξαν ότι τα συμπαγή οστά γερνούν γρηγορότερα από τα σπογγώδη ως αποτέλεσμα της χαμηλής οστικής ανακατασκευής. Επιπλέον, μελέτη των Kuhn L. T. et al (2008) [74] σε συμπαγή και σπογγώδη οστά αγελάδων διαφορετικών ηλικιών έδειξε το διαφορετικό τρόπο κρυσταλλοποίησης και αύξησης του μεγέθους των κρυστάλλων απατίτη στα δύο είδη οστών σε σχέση με την ηλικία. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με την παρούσα εργασία όπου σε αντίθεση με τα συμπαγή, τα σπογγώδη οστά δεν εμφανίζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ηλικιών.

Η μη διαφοροποίηση των σπογγωδών οστών με την ηλικία επιβεβαιώνεται και από προγενέστερη εργασία των Roschger P. et al (2003) [103] με χρήση υπολογιστικής απεικόνισης οπισθοσκεδαζόμενων ηλεκτρονίων σε υγιή ανθρώπινα οστά διαφορετικών ηλικιών και εθνικότητας. Σύμφωνα με τη μελέτη αυτή η οστική πυκνότητα των σπογγωδών οστών παραμένει περίπου σταθερή και ανεξάρτητη από την ηλικία, την εθνικότητα και το μέρος που βρίσκεται το οστό στον σκελετό. Τέλος, σύμφωνα με έρευνα των Tzaphlidou M. and Zaichick V. (2002) [130] σε υγιή ανθρωπινά οστά πλευρών διαφορετικών ηλικιών και των δύο φύλων δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές του λόγου Ca/P.

4.2 ΛΟΓΟΣ Ca/P ΣΤΟΥΣ ΜΥΕΣ (*Swiss albino mice*)

Στους μύες μελετήθηκαν οι ίδιοι παράμετροι που εξετάστηκαν στους επίμυες δηλαδή, κατά πόσο ο λόγος Ca/P επηρεάζεται από το είδος, τη θέση του οστού, την ηλικία και το φύλο του ζώου. Μετρήθηκε ο λόγος Ca/P με τη φασματοσκοπία Auger σε συμπαγή οστά (κνήμη, μηρός, βραχιόνιο) αρσενικών και θηλυκών μυών ηλικίας 5 και 14 μηνών.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα στις δύο ηλικίες δεν παρατηρούνται στατιστικώς σημαντικές διαφορές του λόγου Ca/P μεταξύ αρσενικών και θηλυκών μυών. Επίσης, στατιστικώς σημαντική διαφορά δεν προκύπτει ούτε ανάμεσα στα συμπαγή οστά του ίδιου φύλου.

Επιπλέον, ο λόγος Ca/P δεν αλλάζει σημαντικά ανάμεσα στα αντίστοιχα οστά των δύο ηλικιών. Οι αλλαγές στη δομή των οστών μυών με την ηλικία έχουν εξεταστεί από διάφορους ερευνητές [9], [97], [141]. Οι Beamer G.W. et al (1996) [9] εξετάζοντας συμπαγή οστά μηρών από διαφορετικά είδη μυών κατέληξαν ότι οι διαφοροποιήσεις της οστικής πυκνότητας με την ηλικία είναι συνυφασμένη με το γένος του μύα. Σύμφωνα με τους ίδιους, στην πατρική γενιά των Balb/c μυών, στην οποία ανήκουν και τα πειραματόζωα της παρούσας εργασίας, η μέγιστη οστική πυκνότητα στα συμπαγή οστά των μηρών παρουσιάζεται στην ηλικία των 8 μηνών. Στους 12 μήνες όμως η οστική πυκνότητα ελαττώνεται και γίνεται ίση με την τιμή της πυκνότητας των 4 μηνών, παρόλο που το μήκος των οστών συνεχίζει να αυξάνεται μέχρι τους 12 μήνες.

Επίσης, οι Weiss A. et al (1991) [141] μελετώντας το συμπαγές και σπογγώδες μέρος μηρών της ομόαιμης γενιάς CW – 1 μυών κατέληξαν ότι η δομή των συμπαγών και σπογγωδών οστών αλλάζει το ίδιο με την ηλικία. Για τα συμπαγή οστά η οστική πυκνότητα αυξάνεται μεταξύ 3 – 12 μηνών και φτάνουν στην κορυφαία οστική πυκνότητα σε ηλικία 12 μηνών. Παρατήρησαν όμως ότι σταδιακά από την ηλικία των 12 μηνών η οστική πυκνότητα ελαττώνεται και στην ηλικία των 32 μηνών έχουν απολέσει το 57% της μάζας του οστού. Η απώλεια αυτή οφείλεται στην εμφάνιση οστεοπενίας μετά την ηλικία των 12 μηνών.

Οι Perkins L.S. et al (1994) [97] μελετώντας οστά μηρών Balb/c μυών δύο διαφορετικών ηλικιών (6 και 24 μηνών) κατέληξαν ότι στα οστά των μεγαλύτερης ηλικίας παρατηρείται αυξημένη δράση των οστεοκλαστών. Μειωμένη δράση οστεοβλαστών παρατήρησαν και οι Bar – Shira – Maymon et al (1989) [7] ύστερα από μελέτη τους στο

συμπαγές και σπογγώδες μέρος οστών της σπονδυλικής στήλης μυών. Έτσι, το οστό καταστρέφεται και δεν αναδομείται με αποτέλεσμα την ανάπτυξη οστεοπενίας.

Σύμφωνα όμως με τους Gala J. et al (2001) [38], οι οποίοι εφάρμοσαν άσκηση σε οστεοπορωτικούς θηλυκούς επίμυες, αναφέρουν ότι η άσκηση περιορίζει την απώλεια οστικής πυκνότητας. Επιπλέον αυξάνει την οστική πυκνότητα σε τιμές πρώιμου σταδίου εμμηνόπαυσης. Η ελευθερία κίνησης των μυών λόγω μεγέθους τους στο χώρο στέγασής τους μπορεί να εξηγήσει τη μη ανάπτυξη οστεοπενίας στα μεγαλύτερης ηλικίας ζώα της παρούσας εργασίας και συνεπώς τη μη ύπαρξη διαφορών μεταξύ των συμπαγών οστών των δύο ηλικιών. Η εν μέρει αδράνεια του μηρού όμως, εμφανίζει ελαττωμένο το λόγο Ca/P στη μεγαλύτερη ηλικία χωρίς σημαντική διαφορά από τον αντίστοιχο της μικρότερης ηλικίας.

4.3 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΟΥ ΛΟΓΟΥ Ca/P ΣΤΑ ΤΡΩΚΤΙΚΑ

Από τη βιβλιογραφία προκύπτει ότι η ενηλικίωση των ζώων και η επίτευξη της κορυφαίας οστικής πυκνότητας ποικίλει ανάμεσα στα ζώα. Έτσι για τα προς εξέταση τρωκτικά της παρούσας εργασίας η κορυφαία οστική πυκνότητα είναι για τους μύες 3 – 12 μήνες και για τους επίμυες στην ηλικία 9 – 12 μηνών [80], [141]. Με βάση αυτό επιλέχθηκαν για τη σύγκριση των λόγων του Ca/P ενήλικα ζώα, δηλαδή οι μύες των 5 μηνών και οι επίμυες 14 μηνών.

Η σύγκριση αυτή κρίνεται σκόπιμη γιατί τα τρωκτικά χρησιμοποιούνται ευρέως στην έρευνα λόγω χαμηλού κόστους και εύκολης στέγασης. Ιδιαίτερα σήμερα ο επίμυς είναι το πιο διαδεδομένο ζωικό πρότυπο για τη μελέτη της οστεοπόρωσης [78].

Από τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας Auger προκύπτει, ότι τόσο στα αρσενικά όσο και στα θηλυκά πειραματόζωα, οι κνήμες των δύο ειδών τρωκτικών παρουσιάζουν μικρή διαφορά στο λόγο χωρίς αυτή σύμφωνα με την στατιστική ανάλυση να είναι σημαντική.

Αντίθετα, στους μηρούς των δύο φύλων ο λόγος Ca/P των μυών είναι σημαντικά μικρότερος του λόγου των επίμυων. Μελετώντας το λόγο Ca/P των βραχιόνιων για τα αρσενικά ζώα είναι σημαντικά μικρότερος στους μύες. Στα θηλυκά ζώα ο λόγος στους

μύες εμφανίζεται μικρότερος του αντίστοιχου των επίμυων, λόγω όμως μεγάλης διασποράς τιμών δεν προκύπτει σημαντικά μικρότερος όπως στα αρσενικά ζώα.

Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν ανάμεσα στους επίμυες και μύες ενδεχομένως να αντικατοπτρίζουν τις λειτουργικές και σωματικές απαιτήσεις τους. Η διαφορά στην σωματική διάπλαση των δύο αυτών ειδών ζώων είναι εμφανείς η οποία συνεπάγεται και λειτουργικές διαφορές.

4.4 ΛΟΓΟΣ Ca/P ΣΤΟΥΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΥΣ ΚΟΝΙΚΛΟΥΣ

Οι τυχόν επιπτώσεις στο λόγο Ca/P των παραμέτρων που εξετάστηκαν στα τρωκτικά, δηλαδή του είδους και της σκελετικής θέσης του οστού καθώς και του φύλου του πειραματοζώου, μελετήθηκαν και σε κονίκλους με δύο σκοπούς: α) να γίνει σύγκριση μεταξύ τρωκτικών και άλλου είδους πειραματοζώων και β) τα αποτελέσματα από τους θηλυκούς κονίκλους να αποτελέσουν τη βάση για τη μελέτη οστεοπορωτικών θηλυκών κονίκλων. Για τον σκοπό αυτό μετρήθηκε ο λόγος Ca/P με τις δύο φασματοσκοπικές τεχνικές σε συμπαγή (κνήμη, μηρός, βραχιόνιο) και σπογγώδη (πλευρά) οστά του δεξιού μέρους αρσενικών και θηλυκών κονίκλων.

Από τα αποτελέσματα του λόγου συμπεραίνεται ότι δεν υφίστανται στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των αντίστοιχων συμπαγών και σπογγωδών οστών στα δύο φύλα. Σύμφωνα με την εισαγωγή, το μεγαλύτερο μέρος του οστού (65% κατά βάρος) αποτελείται από υδροξυαπατίτη όπου στηρίζονται και οι μηχανικές ιδιότητές του. Έτσι, στη μη ύπαρξη διαφορών του λόγου Ca/P ανάμεσα στα δύο φύλα είναι πιθανό να οφείλονται και οι όμοιες μηχανικές ιδιότητες που εμφανίζουν τα αντίστοιχα οστά των δύο φύλων όπως υποστηρίζουν οι Willett L.T. et al (2011) [143].

Όπως παρατηρείται από τα αποτελέσματα στα δύο φύλα, ο λόγος Ca/P αποκλίνει από την στοιχειομετρική τιμή του. Αν, όπως αναφέρθηκε, το οστό περιείχε μόνο υδροξυαπατίτη η τιμή του λόγου θα έπρεπε να ήταν 2,16. Τα οστά όμως περιέχουν επίσης περίπου 30% – 40% οργανικές ουσίες. Η συγκέντρωση του Ca και P στις ουσίες αυτές είναι κατά πολύ μικρότερη από ό,τι στον υδροξυαπατίτη με αποτέλεσμα να επηρεάζεται ο λόγος Ca/P. Η απόκλιση αυτή προκαλεί μικρές μεταβολές του λόγου στα συμπαγή οστά χωρίς όμως αυτές να είναι σημαντικές.

Ο λόγος Ca/P στα σπογγώδη οστά και στα δύο φύλα είναι σημαντικά μικρότερος του λόγου των συμπαγών οστών. Όπως ήδη έχει αναφερεί στην περίπτωση των επίμυων, ο σημαντικά μικρότερος λόγος Ca/P στα σπογγώδη οφείλεται στο μικρότερο βαθμό ασβεστοποίησης καθώς και στο ότι είναι πιο πλούσια σε συγκέντρωση άνθρακα. Επιπλέον, όπως αναλύθηκε στους επίμυες η διαφορά οφείλεται και στο μεγάλο θερμικό μετασχηματισμό του άμορφου απατίτη σε $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (β – tricalcium phosphate).

4.5 ΛΟΓΟΣ Ca/P ΣΕ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΤΙΚΟΥΣ ΚΟΝΙΚΛΟΥΣ

Η οστεοπόρωση, όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, είναι μια μεταβολική νόσος των οστών η οποία χαρακτηρίζεται από ελάττωση της οστικής αντοχής, η οποία προδιαθέτει αυξημένο κίνδυνο κατάγματος. Από τη νόσο αυτή υποφέρει μεγάλο μέρος του πληθυσμού και κυρίως γυναικών της λευκής φυλής. Σύμφωνα με μελέτες [15] οι αλλαγές στην οστική πυκνότητα δεν σημαίνουν απαραίτητα και αλλαγές στη χημική σύνθεση του οστού. Ο λόγος Ca/P μπορεί να αποτελέσει μια χρήσιμη παράμετρο για την εξέταση των διαφοροποιήσεων στα παθολογικά οστά. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε τεχνητή οστεοπόρωση σε κονίκλους με την μέθοδο IMO και μετρήθηκε ο λόγος Ca/P σε συμπαγή και σπογγώδη οστά. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα φυσιολογικών θηλυκών κονίκλων.

Τα οστά μελετήθηκαν και με τις δύο φασματοσκοπικές τεχνικές της παρούσας εργασίας (φασματοσκοπία Auger, SEM – EDS) και τα αποτελέσματά τους βρίσκονται σε πλήρη συμφωνία. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι ο λόγος Ca/P στα οστεοπορωτικά συμπαγή οστά είναι στατιστικώς σημαντικά μικρότερος σε σχέση με τα φυσιολογικά. Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήγει προγενέστερη έρευνα των Tzaphlidou M. et al (2005) [129] σε συμπαγή οστά κνήμης κονίκλων με την χρήση μικρο – τομογραφίας συγχρότρου. Σύμφωνα με αυτούς τους ερευνητές, ο λόγος Ca/P των συμπαγών οστών κνήμης οστεοπορωτικών είναι σημαντικά μειωμένος του αντίστοιχου των φυσιολογικών κονίκλων.

Επιπλέον, διαφορές στο λόγο Ca/P μεταξύ συμπαγών οστών φυσιολογικών και οστεοπορωτικών πειραματοζώων έχουν παρατηρηθεί και από άλλους ερευνητές. Οι Prabhakara R. N. and Lakshmana M. (2005) [99] μελετώντας οστεοπορωτικά και

φυσιολογικά οστά κνήμης επίμυων μέσω φασματοσκοπίας EDS κατέληξαν ότι ο λόγος Ca/P στα οστεοπορωτικά οστά είναι μικρότερος του αντίστοιχου των φυσιολογικών.

Σύμφωνα με τους Lima I. et al (2010) [81] αναλύοντας σπογγώδες μέρος του μηριαίου οστού φυσιολογικών και οστεοπορωτικών επίμυων παρατήρησαν μείωση της οστικής πυκνότητας με ταυτόχρονη μείωση των οστικών δοκίδων στα οστεοπορωτικά οστά. Έτσι, σε σύγκριση με τα φυσιολογικά οστά, στα οστεοπορωτικά οστά παρατηρείται απώλεια οστικής πυκνότητας και μάζας. Επιπλέον σύμφωνα με τους ίδιους, με χρήση SEM – EDS, στα οστεοπορωτικά οστά παρατηρούνται αλλαγές στη χημική σύστασή τους με ταυτόχρονη ελάττωση της συγκέντρωσης Ca και P. Οι Bohic S. et al (2000) [14] μελετώντας οστεοπορωτικά και φυσιολογικά σπογγώδη οστά επίμυων κατέληξαν στη μη ύπαρξη αλλαγών του λόγου Ca/P ανάμεσα στις δύο καταστάσεις. Συμπέραναν ότι στην οστεοπορωτική κατάσταση υπάρχει ταυτόχρονη απώλεια Ca και P ώστε ο λόγος των δύο στοιχείων να παραμένει ανεπηρέαστος.

Στα σπογγώδη οστά οστεοπορωτικών κονίκλων, σύμφωνα με τους Tong Cao et al (2001) [124], παρατηρείται ελάττωση της οστικής πυκνότητας. Αντίθετα, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές του λόγου Ca/P των σπογγώδων οστών ανάμεσα στα οστεοπορωτικά και τα φυσιολογικά ζώα. Έτσι, προκύπτει το ίδιο συμπέρασμα, όπως και στους επίμυες, της ταυτόχρονης ελάττωσης της συγκέντρωσης Ca και P λόγω απώλειας οστικής μάζας.

Τέλος, με τη χρήση του SEM απεικονίστηκε το ενδόστεο και περίστεο μηριαίου οστού καθώς και πλευρών τόσο για φυσιολογικά όσο και για οστεοπορωτικά οστά. Στις εικόνες που ελήφθησαν για τα φυσιολογικά οστά απεικονίζεται η συνεχής δομή του υδροξυαπατίτη στο περίστεο και ενδόστεο και των δύο ειδών οστών. Η διάταξη μάλιστα του υδροξυαπατίτη όπως απεικονίζεται είναι σε παράλληλα επίπεδα τα οποία δεν διαχωρίζονται μεταξύ τους. Στο ενδόστεο, οι οπές που απεικονίζονται είναι σωλήνες Volkman ομοιόμορφα κατανομημένοι στην επιφάνεια του οστού. Διαφορές στην διάμετρο των σωλήνων δεν παρατηρούνται.

Συγκρίνοντας τις εικόνες από οστά φυσιολογικών κονίκλων με αυτές οστεοπορωτικών, στις δεύτερες παρατηρείται έντονη αλλοίωση της δομής του οστού. Στο περίστεο των οστεοπορωτικών οστών εμφανίζεται ασυνέχεια στη δομή του ανόργανου υλικού και ανομοιόμορφη κατανομή του στην επιφάνεια. Επίσης, τα παράλληλα επίπεδα εναπόθεσης του υδροξυαπατίτη ξεχωρίζουν μεταξύ τους πιο έντονα σε σύγκριση με το

φυσιολογικό αντίστοιχο οστό. Η επιφάνεια του περιόστεου του μηριαίου οστού δεν παρουσιάζει τη συνεχή δομή που παρατηρείται στο φυσιολογικό οστό. Το ίδιο παρουσιάζει και η επιφάνεια του περιόστεου του σπογγώδους οστού με εμφανή την αλλοίωση στη δομή σε σύγκριση με τη συνεχή δομή του φυσιολογικού οστού. Στο ενδόστεο του μηριαίου οστεοπορωτικού οστού εμφανίζονται αλλοιώσεις στη δομή του υδροξυαπατίτη καθώς και σε αυτή των σωλήνων Volkmann. Οι σωλήνες Volkmann εμφανίζουν μεγαλύτερη διάμετρο και ανομοιόμορφη κατανομή σε σχέση με την εικόνα που παρουσιάζουν στο αντίστοιχο φυσιολογικό οστό. Διαφοροποιήσεις στη δομή των οστών έχουν παρατηρηθεί προγενέστερα από τους Sastry P.T. et al (2007) [108], μελετώντας στο SEM τη δομή της επιφάνειας φυσιολογικών και οστεοπορωτικών ανθρώπινων οστών. Σύμφωνα με τους ίδιους η ασυνέχεια στη δομή του ανόργανου υλικού αποδίδεται στη μείωση της κρυσταλλικότητας του υδροξυαπατίτη η οποία προκαλεί και την ευθραστότητά τους.

4.6. ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΟΥ ΛΟΓΟΥ Ca/P ΣΤΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ

Από τη βιβλιογραφία προκύπτει ότι η ενηλικίωση των ζώων και η επίτευξη της κορυφαίας οστικής πυκνότητας ποικίλει ανάμεσα στα ζώα. Έτσι για τα προς εξέταση ζώα της παρούσας εργασίας η κορυφαία οστική πυκνότητα είναι για τους μύες 3 – 12 μήνες, για τους επίμυες στην ηλικία 9 – 12 μηνών και για τους κόνικλους στην ηλικία 6 – 9 μηνών [62], [80], [141]. Με βάση αυτό επιλέχθηκαν για τη σύγκριση των λόγων του Ca/P ήδη ενήλικα ζώα δηλαδή οι μύες των 5 μηνών, οι επίμυες 14 μηνών και οι κόνικλοι 8 μηνών.

Σύμφωνα με προγενέστερη έρευνα η διαφορετική χρήση των οστών από διαφορετικό είδος ζώου είναι αυτή που προκαλεί διαφορές στο λόγο Ca/P ανάμεσα στα αντίστοιχα οστά των ζώων [128], [129]. Έτσι οι διαφορετικές ανάγκες για κίνηση των ζώων παράγει διαφορετικές συνθήκες πίεσης στα βραχιόνια και στις κνήμες ενώ οι στηρικτικές ανάγκες προκαλούν διαφορές στους μηρούς. Με βάση αυτό οι κόνικλοι είναι προσαρμοσμένοι να αναπηδούν ενώ οι μύες και οι επίμυες να τρέχουν. Οι ανάγκες αυτές παίζουν ρόλο στη δύναμη και στη σκληρότητα των οστών. Ως αποτέλεσμα αυτών είναι να εμφανίζονται, όπως και στην παρούσα εργασία, στατιστικώς σημαντικές διαφορές λόγου

Ca/P μεταξύ αντίστοιχων συμπαγών οστών των ζώων. Μάλιστα, όπως απεικονίζεται στα αποτελέσματα, ο λόγος έχει αυξητική τάση με το μέγεθος του ζώου. Η διαφοροποίηση ανάμεσα στα σπογγώδη οστά των κόνικλων και των επίμυων οφείλεται στη διαφοροποίηση της σκληρότητας και ανθεκτικότητας των οστών ανάλογα με το μέγεθος και το είδος του ζώου. Έτσι, η ανάγκη τα οστά των πλευρών των κόνικλων να στηρίζουν και να προστατεύουν μεγαλύτερα ζωτικά όργανα από αυτά των επίμυων, καθιστά το λόγο Ca/P σημαντικά μεγαλύτερο στους κόνικλους.

Επιπλέον, σύμφωνα με τους Horner K. et al (1997) [49] εξετάζοντας συμπαγή οστά κνήμης, μηρού και βραχιόνιου διαφορετικών ζώων κατέληξαν ότι η ολοκληρωμένη μορφή της δομής των οστών εξαρτάται από το πόσο εξελικτικά ανώτερο είναι το ζώο. Έτσι, όσο πιο ανεπτυγμένο και μεγάλο σε μέγεθος είναι το ζώο τόσο πιο ανώτερα ανεπτυγμένο είναι οστικά. Συνεπώς, όπως παρατηρούν οι ίδιοι ερευνητές οι μύες και οι επίμυες δεν έχουν Αβερσιανούς σωλήνες οπότε η ιοντοανταλλαγή του Ca γίνεται από το έντερο. Αντίθετα, στα ανεπτυγμένα οστικά ζώα (κόνικλοι) υπάρχουν ανεπτυγμένοι Αβερσιανοί σωλήνες οπότε η ιοντοανταλλαγή του Ca πραγματοποιείται μέσω αυτών.

Με βάση τα παραπάνω, η διαφοροποίηση στο λόγο Ca/P ανάμεσα στα προς εξέταση ζώα της παρούσας διατριβής οφείλεται σε δύο παράγοντες: α) στο ρόλο που καλούνται να επιτελέσουν τα οστά και β) στη διαφοροποίηση της δομής των οστών λόγω της εξελικτικής διαδικασίας.

4.7 ΣΥΝΟΨΗ

Σύμφωνα με την παρούσα εργασία ο λόγος Ca/P αποτελεί μια καλή ένδειξη της ποιότητας του οστού καθώς και επηρεάζεται από την ηλικία, το είδος του ζώου, την θέση του οστού και την πάθηση. Οι διαφορές μάλιστα αυτές καταδεικνύονται αξιόπιστα με τη μέτρηση του λόγου μέσω της φασματοσκοπίας Auger.

Η φασματοσκοπία Auger αποτελεί αναλυτική τεχνική με υψηλή διακριτική και χωρική ικανότητα κατάλληλη για τον επιφανειακό χαρακτηρισμό των υλικών. Έτσι, παρέχει ποιοτικό και ποσοτικό χαρακτηρισμό των επιφανειών για όλα τα στοιχεία με μεγαλύτερη ευαισθησία στα ελαφριά στα οποία ανήκουν το Ca και ο P. Σύμφωνα με την παρούσα εργασία, η φασματοσκοπία Auger μπορεί να μετρήσει αποτελεσματικά, *in vitro*,

τα κύρια στοιχεία του ανόργανου υλικού των οστών και να προσδιορίσει το λόγο Ca/P. Παράλληλα απαιτούνται για τον καλύτερο προσδιορισμό του λόγου οι απαραίτητες διορθώσεις στα φάσματα οι οποίες και αναπτύχθηκαν.

Από τα αποτελέσματα, παρατηρούνται αρχικά μεταβολές στο λόγο Ca/P ανάμεσα στα σπογγώδη και συμπαγή οστά ανεξάρτητα από την ηλικία και το είδος του προς εξέταση ζώου. Στην ηλικία της μέγιστης οστικής πυκνότητας, σε όλα τα ζώα, δεν παρατηρούνται μεταβολές στο λόγο ανάμεσα στα συμπαγή οστά του ίδιου ζώου. Ο λόγος Ca/P παραμένει ανεπηρέαστος από το φύλο του ζώου.

Επιπλέον, για τους επίμυες εμφανίζονται μεταβολές στο λόγο Ca/P ανάμεσα στις δύο προς εξέταση ηλικίες στην κνήμη και στο βραχιόνιο. Στην ηλικία μετά την οστική ανάπτυξη, στους επίμυες, εμφανίζονται διαφορές μεταξύ του μηρού και της κνήμης, καθώς και του μηρού και του βραχιονίου. Στους μύες αντίθετα, λόγω ότι αναπτύσσουν οστεοπενία μετά την ηλικία της οστικής ωρίμανσης, δεν εμφανίζονται διαφορές στο λόγο ανάμεσα στις δυο ηλικίες.

Εξετάζοντας το λόγο για τα ίδια οστά για τα διαφορετικά ζώα της παρούσας διατριβής προκύπτουν διαφορές τόσο ανάμεσα στα αντίστοιχα συμπαγή όσο και στα σπογγώδη οστά τους. Με αυτό τον τρόπο γίνεται κατανοητός ο διαφορετικός προορισμός λειτουργίας του κάθε οστού.

Τέλος, η οστεοπόρωση επηρεάζει το λόγο Ca/P, όπως φάνηκε από τις μετρήσεις στους οστεοπορωτικούς κονίκλους, με αποτέλεσμα να εμφανίζεται σημαντικά μικρότερος στα συμπαγή οστά. Αντίθετα, στα σπογγώδη οστά ελαττώνεται σε μικρότερο βαθμό, χωρίς η ελάττωση αυτή να είναι σημαντική. Η ποιότητα όμως των οστών, όπως απεικονίστηκε στις εικόνες του SEM, επηρεάζεται σημαντικά με αλλαγές στην κρυσταλλικότητα του υδροξυαπατίτη.

4.8 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η φασματοσκοπία Auger αποτελεί μια ικανοποιητική μέθοδο για τον προσδιορισμό του λόγου Ca/P στα οστά. Πέρα όμως από την παρούσα εργασία, η φασματοσκοπία Auger, μπορεί να αποτελέσει την τεχνική για την πλήρη χαρτογράφηση του λόγου Ca/P στα οστά. Λόγω της υψηλής διακριτικής και χωρικής

ικανότητας που έχει, με αποτέλεσμα τη συλλογή πληροφοριών από μικρό όγκο, μπορεί να δώσει πληροφορίες για τον λόγο στην εγκάρσια διεύθυνση του οστού. Επιπλέον, η μικρής διαμέτρου δέσμη διευκολύνει στην κατά μήκος χαρτογράφηση του λόγου τόσο στο ενδόστεο όσο και στο περιόστεο.

Τα σύγχρονα συστήματα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας έχουν ενσωματωμένη τη φασματοσκοπία Auger. Έτσι, η συνδυασμένη χρήση της φασματοσκοπίας Auger με την απεικόνιση του οστού μέσω δευτερογενών ηλεκτρονίων καθώς και οπισθοσκεδαζόμενων ηλεκτρονίων μπορεί να δώσει μια πλήρη εικόνα για τα στοιχεία και την ποιότητα του οστού.

Επίσης, η φασματοσκοπία Auger μπορεί να γίνει η κύρια τεχνική για τη μελέτη του λόγου Ca/P και σε άλλες παθήσεις των οστών (οστεοπενία, οστεομαλακία). Επιπλέον, μπορεί δώσει μια πλήρη μελέτη της μεταβολής του λόγου Ca/P συναρτήσει της απώλειας οστικής πυκνότητας με την ηλικία.

Τέλος, μέσω της φασματοσκοπίας Auger μπορούν να μελετηθούν και άλλα στοιχεία που είναι απαραίτητα για την ποιότητα του οστού και προκαλούν παθήσεις όπως είναι το μαγνήσιο (Mg), το στρόντιο (Sr) και το χλώριο (Cl). Η μελέτη μπορεί να προχωρήσει και σε άλλου είδους απατίτες, όπως ο φθοροαπατίτης ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH}, \text{F}, \text{Cl})$) που συναντάται στους οδόντες.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη των δύο βασικών ανόργανων συστατικών των οστών, ασβεστίου (Ca) και φωσφόρου (P), με σκοπό τον υπολογισμό του λόγου Ca/P. Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία ο λόγος αυτός είναι η πιο αξιόπιστη παράμετρος για να κατανοηθούν οι αλλαγές στα οστά με βάση την ηλικία, το φύλο και τις σκελετικές ανωμαλίες λόγω παθήσεων. Επίσης, γίνεται η εισαγωγή της φασματοσκοπίας Auger ως τεχνικής για τον προσδιορισμό του λόγου Ca/P ο οποίος παράλληλα μελετάται και μέσω της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης με χρήση στοιχειακού αναλυτή ακτίνων – X.

Τα φάσματα Auger δημιουργούνται από ηλεκτρόνια που εκπέμπονται από την επιφάνεια ενός υλικού. Οι κορυφές των φασμάτων είναι χαρακτηριστικές του κάθε χημικού στοιχείου της επιφάνειας. Η στοιχειακή ανάλυση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης στηρίζεται στα φάσματα που δημιουργούνται από την εκπομπή χαρακτηριστικών ακτίνων – X από το υλικό. Όπως στα φάσματα Auger, έτσι και στα φάσματα των ακτίνων – X, οι κορυφές είναι χαρακτηριστικές των στοιχείων του υλικού. Με τις δύο αυτές τεχνικές γίνεται πλήρης ταυτοποίηση του λόγου Ca/P των οστών.

Στα πλαίσια αυτά μελετώνται βιοψίες από τρία είδη πειραματοζώων: μύες, επίμυες και κόνικλοι. Τα δείγματα λαμβάνονται από τα δύο μέρη του σκελετού (δεξί, αριστερό) και είναι συμπαγή (κνήμη, μηρός, βραχιόνιο) και σπογγώδη (πλευρά). Έτσι, εξετάζεται κατά πόσο η σκελετική θέση και το είδος του οστού διαμορφώνει το λόγο Ca/P. Επιπλέον, εξετάζονται στους μύες και τους επίμυες τα αντίστοιχα οστά δύο διαφορετικών ηλικιών ώστε να εξαχθεί συμπέρασμα ως προς τη διαφοροποίηση ή μη του λόγου ανάλογα με την ηλικία.

Στους κόνικλους (αρσενικά, θηλυκά) μελετώνται βιοψίες συμπαγών και σπογγωδών οστών, όπως και παραπάνω. Εξετάζεται κατά πόσο ο λόγος Ca/P έχει εξάρτηση από τη σκελετική θέση του οστού και το φύλο. Οι θηλυκοί κόνικλοι αποτελούν τους μάρτυρες για τη σύγκριση με τους οστεοπορωτικούς κόνικλους. Η τεχνητή οστεοπόρωση προκαλείται σε μια ομάδα θηλυκών κόνικλων μέσω φλεγμονώδους αντίδρασης (Inflammation Mediated Osteoporosis, IMO). Από τη σύγκριση των βιοψιών

οστών τόσο των φυσιολογικών όσο και των οστεοπορωτικών κονίκλων μελετάται κατά πόσο ο λόγος Ca/P επηρεάζεται από την πάθηση.

Τέλος, πραγματοποιείται γενική σύγκριση των λόγων Ca/P (αντίστοιχων οστών) και των τριών ειδών πειραματοζώων με σκοπό να εξεταστεί κατά πόσο το είδος του πειραματοζώου παίζει ρόλο στη διαμόρφωση του λόγου.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής προκύπτει ότι ο λόγος Ca/P δεν επηρεάζεται ούτε από το μέρος του ζώου (δεξί, αριστερό) ούτε από το φύλο (αρσενικό, θηλυκό). Εξαρτάται από το είδος του οστού (συμπαγές, σπογγώδες) και διαμορφώνεται μικρότερος στα σπογγώδη οστά. Με την πάροδο της ηλικίας, στους επίμυες, ο λόγος διαμορφώνεται μικρότερος, στα βραχιόνια και στις κνήμες. Αντίθετα στους μύες ο λόγος δεν αλλάζει με την ηλικία. Ακόμα, παρατηρήθηκε ότι ο λόγος Ca/P εξαρτάται από το είδος του ζώου και διαμορφώνεται ανάλογα με τη λειτουργία του κάθε οστού. Η οστεοπόρωση, έχει συνέπειες στα συμπαγή οστά (με βάση το λόγο Ca/P), ενώ στα σπογγώδη οστά η νόσος δεν φαίνεται να έχει αντίκτυπο.

Η συνεισφορά της παρούσας διδακτορικής διατριβής εντοπίζεται στα εξής σημεία: α) στην εισαγωγή της φασματοσκοπίας Auger για τον προσδιορισμό του λόγου Ca/P στα οστά, β) στη μελλοντική δυνατότητα μελέτης των βιοϋλικών μέσω της φασματοσκοπίας Auger ως επιφανειακή τεχνική και γ) στη μελέτη και κατανόηση της σύστασης των οστών και της νόσου της οστεοπόρωσης που αποτελούν διαχρονικό πεδίο έρευνας.

Η παρούσα διατριβή παρουσιάζει εμπειριστατώμενα αποτελέσματα τα οποία αποδεικνύουν ότι η φασματοσκοπία Auger μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιόπιστη μέτρηση του λόγου Ca/P σε οστά πειραματοζώων. Αν και η παρούσα εργασία έγινε σε βιολογικά οστά και δεν έγινε σε ασθενείς, μπορεί να είναι χρήσιμη σε ιατρούς οι οποίοι παρακολουθούν ασθενείς και συμμετέχουν στη διάγνωση και θεραπεία σκελετικών παθήσεων.

ABSTRACT

The aim of this thesis is the study of the main two bone minerals, calcium (Ca) and phosphorus (P), in order to calculate the Ca/P ratio. According to the literature this ratio is the most reliable parameter for understanding the changes in bones brought about by age, gender and skeletal irregularities. Moreover, this thesis introduces Auger spectroscopy as a technique for the determination of Ca/P ratio. This ratio is also studied by X – ray spectroscopy facilitated on a Scanning Electron Microscope (SEM).

The Auger spectra are generated by electrons emitted from the surface of a material. The elemental analysis of SEM is based on the emitted X – rays from the material. The peaks of both spectrums are characteristics of each chemical component of the material. Both techniques are suitable for the measurement of skeletal Ca/P ratio.

Biopsies from three different animals were studied: mice, rats and rabbits. Samples were taken from both sides of the skeleton (right, left) from cortical bones (femur, rear and front tibias) and trabecular (ribs) in an effort to assess if the bone position and kind affect the Ca/P ratio. Furthermore, the possible role of age and gender on the ratio, was studied.

Biopsies from rabbits (male, female) of cortical and trabecular bones were also studied. Samples from normal female rabbits were compared with osteoporotic ones. Osteoporosis was induced by the method IMO (Inflammation Mediated Osteoporosis).

Finally, an overall comparison of Ca/P ratios from the three kinds of animals was performed in order to examine the dependence of the animal kind on the ratio.

The results of this thesis show that the Ca/P ratio is influenced neither by the side of animal nor by gender (male, female). The Ca/P ratio depends on the bone site and kind as well as on the specific function of each bone site. In osteoporotic samples, the ratio decreases in cortical bones while no changes appear in trabecular bones.

This thesis: a) introduces the Auger spectroscopy for the Ca/P ratio measurement, b) offers future perspective in the study of biomaterials through the Auger spectroscopy and c) contributes to the study and understanding of the bone composition related to osteoporosis which comprises a continues research field.

The results of the present thesis demonstrate that the Auger spectroscopy is suitable for the accurate measurement of Ca/P ratio in experimental animal bones. Although it is a

Abstract

biological bone study rather than a clinical study for immediate application to patients, may be useful to medical doctors who follow up such patients and participate either in the diagnosis or treatment of such diseases.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

A

1. Aerssens J., Boonen S., Joly J., Dequeker J., *Variations in trabecular bone composition with anatomical site and age: Potential implications for bone quality assessment*, J Endocrinology, 155, 411 – 421 (1997)
2. Akesson K., Grynepas M.D., Hancock R.G.V., Odselius R., Obrant K.J., *Energy – dispersive X – ray microanalysis of the bone mineral content in human trabecular bone: A comparison with ICPES and neutron activation analysis*, Calcif. Tiss. Int., 55, 236 – 239 (1994)

B

3. Bailey M.J., Coe S., Grant D.M., Grimea G.W., Jeynes C., *Accurate determination of the Ca : P ratio in rough hydroxyapatite samples by SEM-EDS, PIXE and RBS – A comparative study*, X – Ray Spectrometry, 38, 343 – 347 (2009)
4. Balatsoukas I., Kourkoumelis N., Tzaphlidou M., *Auger electron spectroscopy for the determination of sex and age related Ca/P ratio at different bone sites*, J. Appl. Phys., 108, 074701 – 1 – 6 (2010)
5. Balmain N., Legros R., Bonel G., *X – ray diffraction of calcined bone tissue: A reliable method for the determination of bone Ca/P molar ratio*, Calcif. Tiss. Int., 34, S93 – S98 (1982)
6. Banse X., Devogelaer J.P., Holmyard D., Grynepas, M., *Vertebral cancellous bone turn – over: Microcallus and bridges in backscatter electron microscopy*, Micron, 36, 710 – 714 (2005)
7. Bar – Shira – Maymon B., Coleman R., Cohen A., Steinhagen – Thiessen E., Silberman M., *Age – related bone loss in lumbar vertebrae of CW – 1 female mice : a histomorphometric study*, Calcif. Tiss. Int., 44, 36 – 45 (1989)

8. Baud A. C., Pouezat A. J., Tochon – Danguy J. H., *Quantitative analysis of amorphous and crystalline bone tissue mineral in women with osteoporosis*, Calcif. Tiss. Int., 21, 452 – 456 (1975)
9. Beamer G.W., Donahue R.L., Rosen J.C., Baylink J.D., *Genetic variability in adult bone density among inbred strains of mice*, Bone, 18, 397 – 403 (1996)
10. Benhayoune H., Charlier D., Jallot E., Laquerriere P., Balossier G., Bonhomme P., *Evaluation of the Ca/P concentration ratio in hydroxyapatite by STEM – EDXS: Influence of the electron irradiation dose and temperature processing*, J. Phys. D: Appl. Phys., 34, 141 – 147 (2001)
11. Bigi A., Cojazzi G., Panzavolta S., Ripamonti A., Roveri N., Romanello M., Suarez K.N., Moro L., *Chemical and structural characterization of the mineral phase from cortical and trabecular bone*, J. Inorg. Biochem., 68, 45 – 51 (1997)
12. Bloebaum, R.D., Holmes, J.L., and Skedros, J.G. *Mineral content changes in bone associated with damage induced by the electron beam*. Scanning, 27, 240 – 248 (2005)
13. Bloebaum D.R., Skedros G.J., Vajda G.E., Bachus N.K., Constantz R.B., *Determining Mineral Content Variations in Bone Using Backscattered Electron Imaging*, Bone, 20, 485 – 490 (1997)
14. Bohic S., Rey C., Legrand A., Sfihi H., Rohanizadeh R., Martel C., Barbier A., Daculsi G., *Characterization of the Trabecular Rat Bone Mineral: Effect of Ovariectomy and Bisphosphonate Treatment*, Bone, 26, 341 – 348 (2000)
15. Bolotin H.H., Sievänen H., *Inaccuracies inherent in dual – energy x – ray absorptiometry in vivo bone mineral density can seriously mislead diagnostic/prognostic interpretations of patient – specific bone fragility*, J. Bone Min. Res., 16, 779 – 805 (2001)
16. Boyde A., Jones J.S., *Scanning Electron Microscopy of Bone: Instrument, Specimen, and Issues*, Microsc. Res. Tech., 33, 92 – 120 (1996)
17. Bradley D.A., Farquharson M.J., Gundogdu O., et al, *Applications of condensed matter understanding to medical tissues and disease progression: Elemental analysis and structural integrity of tissue scaffolds*, Rad. Phys. Chem., 79, 162 – 175 (2010)
18. Brown A. M., Duncan L. E., *Genetic studies of osteoporosis*, Expert Reviews in Molecular Medicine, (1999) (Review)

19. Bubert H., Jannet H., *Surface and thin film analysis: Principles, Instrumentation, Applications*, Wiley, England (2002)
20. Burnell J.M., Baylink D.J., Chestnut C.H. 3rd, Mathews M.W., Teubner E.J., *Bone matrix and mineral abnormalities in postmenopausal osteoporosis*, *Metabolism*, 31 (1982)

C

21. Cassella J.P., Garrington N., Stamp T.C.B, Ali S.Y., *An electron probe x – ray microanalytical study of bone mineral in osteogenesis imperfecta*, *Calcif. Tiss. Int.*, 56, 118 – 122 (1995)
22. Cazaux J., *The influence of radiation damage (microscopic causes) on the sensitivity of Auger electron spectroscopy and X – ray photoelectron spectroscopy*, *Appl. Surf. Sci.*, 20, 457 – 471 (1985)
23. Chang C. Chuan, *Auger electron spectroscopy*, *Surf. Sci.*, 25, 53 – 79 (1971)
24. Chatterji S., Wall J.C., Jeffrey J.W., *Age – related changes in the orientation and particle size of the mineral phase in human femoral cortical bone*, *Calcif. Tiss. Int.*, 33, 567 – 574 (1981)

D

25. Daley T.D., Jarvis A., Wysocki P., Kogon S.L. *X – Ray microanalysis of teeth from healthy patients and patients with familial hypophosphatemia*, *Calcif. Tiss. Int.*, 47, 350 – 355 (1990)
26. Davis E.L., MacDonald C.N., Riach E.G., Weber E.R., *Handbook of Auger Electron Spectroscopy*, Physical Electronics Industries, Eden Prairie, Minnesota (1976).
27. Dempster D.W., Shane E., Horbert W., Lindsay R., *A simple method for correlative light and scanning electron microscopy of human iliac crest bone biopsies: qualitative observations in normal and osteoporotic subjects*, *J. Bone Miner. Res.*, 1, 15 – 21 (1986)

28. Dickerson T. W. J., *The effect of Development on the Composition of a Long Bone of the Pig, Rat and Fowl*, Biochem. J., 82, 47 – 55 (1962)
29. Duque G., Rivas D., Li W., Li A., Henderson J.E., Ferland G., Gaudreau, P., *Age – related bone loss in the LOU/c rat model of healthy ageing*, Exp. Gerontol., 44, 183 – 189 (2009)

E

30. Eddisford P., Brown A., Brydson R., *Identifying and quantifying the mechanism of electron beam induced damage and recovery in hydroxyapatite*, Journal of Physics: Conference Series, 126 (2008)
31. Egerton F.R., Li P., Malac M., *Radiation damage in the TEM and SEM*, Micron, 35, 399 – 409 (2004)

F

32. Ferris B.D., Klenerman L., Dodds R.A., Bitensky L., Chayen J., *Altered organization of non – collagenous bone matrix in osteoporosis*, Bone, 8, 285 – 288 (1987)
33. Fountos G., Yasumura S., Glaros D., *The skeletal calcium/phosphorus ratio: a new in vivo method of determination*, Med. Phys., 24, 1303 – 1309 (1997)
34. Fountos G., Kounadi E., Tzaphlidou M., Yasumura S., Glaros D., *The effects of inflammation-mediated osteoporosis (IMO) on the skeletal Ca/P ratio and on the structure of rabbit bone and skin collagen*, Appl. Radiat. Isot., 49, 657 – 659 (2005)
35. Fox K.M., Kimura S., Plato C.C., Kitagawa T., *Bilateral asymmetry in bone weight at various skeletal sites of the rat*, Anat Rec., 241, 284 – 287 (1995)
36. Fregler L.S., Heckman W.J. Jr., Klomparen L.K., *Scanning and transmission electron microscopy: An introduction*, Oxford University Press, New York (1993)
37. Fukuda S., Iida H., *Age – related changes in bone mineral density, cross-sectional area and the strength of long bones in the hind limbs and first lumbar vertebra in female Wistar rats*, J. Vet. Med. Sci., 66, 755 – 760 (2004)

G

38. Gala J., Diaz – Curiel M., De La Piedra C., Calero J., *Short – and long – term effects of calcium and exercise on bone mineral density in ovariectomized rats*, Br. J. Nutr., 86, 521 – 527 (2001)
39. Garratt-Reed J.A., Bell C.D., *Energy – Dispersive X – Ray Analysis in the Electron Microscope*, BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford (2003)
40. Glimcher J.M., Muir H., *Recent Studies of the Mineral Phase in Bone and Its Possible Linkage to the Organic Matrix by Protein-Bound Phosphate Bonds [and Discussion]*, Phil. Trans. R. Soc. Lond. B., 304, 479 – 508 (1984)
41. Goldstein J., Newbury E.D., Joy C.D, Lyman E.C., Echlin P., Lifshin E., Sawyer L., Michael R.J., *Scanning Electron Microscopy and X – ray Microanalysis*, Springer (2003)
42. Goodyear S.R., Gibson I.R., Skakle J.M.S., Wells R.P.K., Aspden R.M., *A comparison of cortical and trabecular bone from C57 Black 6 mice using Raman spectroscopy*, Bone, 44, 899 – 907 (2009)
43. Grynepas M.D., Holmyard D., *Changes in quality of bone mineral on aging and in disease*, Scanning Microscopy, 2, 1045 – 1054 (1988)
44. Gunawardane P.R., Arumainayagam R.C., *Auger electron spectroscopy*, Handbook of applied solid state spectroscopy, Springer (2006)

H

45. Haberko K., Bućko M.M., Brzezińska – Miecznik J., Haberko M., Mozgawa W., Panz T., Pyda A., Zarebski J., *Natural hydroxyapatite – Its behaviour during heat treatment*, J. Eur. Ceram. Soc., 26, 537 – 542 (2006)
46. Hadjidakis D.J., Androulakis I.I., *Bone remodeling*, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1092, 385 – 396 (2006)
47. Hall P.M., Morabito J.M., *Matrix effects in quantitative auger analysis of dilute alloys*, Surface Science, 83, 391 – 405 ,(1979)

48. Helfrich H.M., Ralston H.S., *Bone research protocols (Methods in Molecular Medicine)*, Humana Press, New Jersey (2003)
49. Hörner K, Loeffler K, Holtzmann M., *Comparison of the histologic structure of the compact bone of the long hollow bones of mouse, hamster, rat, guinea pig, rabbit, cat, and dog during development*, Anat. Histol. Embryol., 26, 289 – 295 (1997)
50. http://en.wikipedia.org/wiki/Auger_electron_spectroscopy
51. <http://en.wikipedia.org/wiki/Bone>
52. http://en.wikipedia.org/wiki/Energy-dispersive_X-ray_spectroscopy
53. <http://en.wikipedia.org/wiki/Hydroxylapatite>
54. <http://en.wikipedia.org/wiki/Osteoporosis>
55. http://en.wikipedia.org/wiki/Scanning_electron_microscope
56. http://nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1986/ruska-speech.html
57. <http://training.seer.cancer.gov/anatomy/skeletal/tissue.html>
58. <http://www.chem.qmul.ac.uk/surfaces/scc/scat5.htm>
59. <http://www.endo.gr/?p=650>
60. http://www.niams.nih.gov/Health_Info/Bone/Osteoporosis/default.asp
61. Hubbell H.J., Trehan P.N., Sing Nirmal, Chand B., Mehta D., Garg L.M., Garg R. R., Singh Surinder, Puri S., *A Review, Bibliography, and Tabulation of K, L, and Higher Atomic Shell X – Ray Fluorescence Yields*, J. Phys. Chem. Ref. Data, 23, 339 – 365 (1994)

I

62. Isaksson H., Harjula T., Koistinen A., Iivarinen J., Seppänen K, Arokoski J.P., Brama P.A., Jurvelin J.S., Helminen H.J., *Collagen and mineral deposition in rabbit cortical bone during maturation and growth: effects on tissue properties*, J. Orthop. Res., 28, 1626 – 1633 (2010)

J

63. Jablonski A., Powell C.J., *A universal algorithm for calculating the backscattering factor in Auger-electron spectroscopy*, Surface Science, 601, 965 – 977 (2007)
64. Jablonski A., Powell C.J., *The backscattering factor in Auger – electron spectroscopy: New approach for an old subject*, Surface Science, 574, 219 – 232 (2005)
65. Jain N.C., *Quantitative Auger electron spectroscopy analysis of binary alloys with separate matrix correction factors for bulk and surface*, Pramana, 33, 677 – 683 (1989)
66. Janus A.M., Faryna M., Haberko K., Rakowska A., Panz T., *Chemical and structural characterization of natural hydroxyapatite derived from pig bones*, Microchim. Acta, 161, 349 – 353 (2008)
67. Jones F.H., *Teeth and bones: Applications of surface science to dental materials and related biomaterials*, Surf. Sci. Rep., 42, 72 – 205 (2001)

K

68. Kang B. – S., Sul Y. – T., Oh S. – J., Lee H. – J., Albrektsson T., *XPS, AES and SEM analysis of recent dental implants*, Acta Biomaterialia, 5, 2222 – 2229 (2009)
69. Kanis J.A., Johnell O., Oden A., Jonsson B., De Laet C., Dawson A., *Risk of hip fracture according to the World Health Organization criteria for osteopenia and osteoporosis*. Bone, 27, 585 – 90 (2000)
70. Kazakia G.J., Nauman E.A., Ebenstein D.M., Halloran B.P., Keaveny T.M., *Effects of in vitro bone formation on the mechanical properties of a trabeculated hydroxyapatite bone substitute*, J. Biomed. Mater. Res. A, 77, 688 – 699 (2006)
71. Kingsmill J.V., Boyde A., *Mineralisation density of human mandibular bone: quantitative backscattered electron image analysis*, J. Anat., 192, 245 – 256 (1998)
72. Korn D., Soyez G., Elssner G., Petzow G., Brès E.F., D'Hoedt B., Schulte W., *Study of interface phenomena between bone and titanium and alumina surfaces in the case*

- of monolithic and composite dental implants*, J. Mater. Sci. Mater. Med., 8, 613 – 620 (1997)
73. Kourkoumelis N., Tzaphlidou M., *Spectroscopic Assessment of Normal Cortical Bone: Differences in Relation to Bone Site and Sex*, The Scientific World Journal, 10, 402 – 412 (2010)
74. Kuhn L.T., Grynblas M.D., Rey C.C., Wu Y., Ackerman J.L., Glimcher M.J., *A comparison of the physical and chemical differences between cancellous and cortical bovine bone mineral at two ages*, Calcif. Tiss. Int., 83, 146 – 154 (2008)
75. Καρακώστας Θ., Κομνηνού Φ., *Ειδικά κεφάλαια φυσικής*, Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη (1999)
76. Κωτούλας Ο.Β., Κωτούλα Ο.Β., *Ιστολογία το κύτταρο και οι ιστοί*, Ιωάννινα (1997)

L

77. Legros R., Balmain N., Bonel G., *Age – related changes in mineral of rat and bovine cortical bone*, Calcif. Tiss. Int., 41, 137 – 144 (1987)
78. Lelovas P., *Animal models of osteoporosis (In Greek)*, Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society, 60, 259 – 265 (2009)
79. Libouban H., Blouin S., Moreau M.-F., Baslé M.F., Audran M., Chappard D., *Effects of risedronate in a rat model of osteopenia due to orchidectomy and disuse: Densitometric, histomorphometric and microtomographic studies*, Micron, 39, 998 – 1007 (2008)
80. Lida H., Fukuda S., *Age – related changes in bone mineral density, cross – sectional area and strength at different skeletal sites in male rats*, J. Vet. Med. Sci., 64, 29 – 34 (2002)
81. Lima I., Farias F.L.M., Percegoni N., Rosenthal D., J.T. de Assis, Anjos J.M., Lopes T.R., *Micro imaging analysis for osteoporosis assessment*, Spectrochimica Acta Part B, 65, 253 – 257 (2010)
82. Lindon C.J., Trander E.G., Holmes L.J., *Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry (A – L)*, Elsevier, Oxford (2000)

83. Loong C.K., Rey C., Kuhn L.T., Combes C., Wu Y., Chen S., Glimcher M.J., *Evidence of hydroxyl – ion deficiency in bone apatites: an inelastic neutron-scattering study*, Bone, 26, 599 – 602 (2000)
84. Lozano L.F., Peña – Rico M.A., Heredia A., Ocotlán – Flores J., Gómez – Cortés A., Velázquez R., Belío I.A., Bucio L., *Thermal analysis study of human bone*, J. Mater. Sci., 38, 4777 – 4782 (2003)

M

85. Mellors R.C., Solberg T.N., *Electron microprobe analysis of human trabecular bone*, Clin. Orthop. Relat. Res., 45, 157 – 167 (1965)
86. Mellors, R.C., *Electron Probe Microanalysis: I. Calcium and Phosphorus in Normal Human Cortical Bone*, Lab. Invest. 13, 163 – 195 (1964)
87. Miller R.G., Bowles C.Q., Eick J.D., Gutshall P.L., *Auger electron spectroscopy of dentin: elemental quantification and the effects of electron and ion bombardment*, Dental Materials, 9, 280 – 285 (1993)
88. Moore L. Keith, *Κλινική ανατομία I*, Πασχαλίδης Ιατρικές εκδόσεις, Αθήνα (1998)

N

89. Nagareddy R.P., Lakshmana, M., *Assessment of experimental osteoporosis using CT-scanning, quantitative X – ray analysis and impact test in calcium deficient ovariectomized rats*, J. Pharmacol. Toxicol. Meth., 52, 350 – 355 (2005)
90. Neues F., Epple M., *X – ray microcomputer tomography for the study of biomineralized endo- and exoskeletons of animals*, Chemical Reviews, 108, 4734 – 4741 (2008)
91. Neuman F., Neuman W.M., *The nature of the mineral phase of bone*, Chem. Rev., 1 – 37 (1953) (Review)
92. Neuman F., Neuman W.M., *The Chemical Dynamics of Bone Mineral*, University of Chicago Press (1958)

O

93. Obrant K.J., Odselius R., *The concentration of calcium and phosphorus on trabecular bone from the iliac crest*, *Calcif. Tiss. Int.*, 39, 8 – 10 (1986)
94. Olsztaa J.M, Chenga X., Soo Jeea S., Kumara R., Kima Y., Kaufmane J.M., Douglassa P.E., Gowera L.B., *Bone structure and formation: A new perspective*, *Mater. Sci. Eng.*, 58, 77 – 116 (2007)

P

95. Pantano C.G., D'Souza A.S., Then A.M., *Electron Beam Damage at Solid Surfaces, Beam Effects, Surface Topography, and Depth Profiling in Surface Analysis*, Plenum, New York (1998)
96. Paschalis P.E., Betts F., DiCarlo E., Mendelsohn R., Boskey L.A., *FTIR Microspectroscopic Analysis of Normal Human Cortical and Trabecular Bone*, *Calcif. Tiss. Int.*, 61, 480 – 486 (1997)
97. Perkins L.S., Gibbons R., Kling S., Kahn J.A., *Age – related bone loss in mice is associated with an increased osteoclast progenitor pool*, *Bone*, 15, 65 – 72 (1994)
98. Pignatell G.U., Queirolo G., *Electron and ion beam effects in Auger Electron Spectroscopy on insulating materials*, *Radiation effects*, 79, 291 – 303 (1983)
99. Prabhakara R. N., Lakshmana M., *Assessment of experimental osteoporosis using CT – scanning, quantitative X – ray analysis and impact test in calcium deficient ovariectomized rats*, *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 52, 350 – 355 (2005)

R

100. Raisz G. L., *Physiology and pathology of bone remodeling*, *Clin. Chem.*, 45, 1353 – 1358 (1999)
101. Rey C., Miquel L.J., Facchini L., Legrand P. A., Glimcher J.M., *Hydroxyl groups in bone mineral*, *Bone*, 16, 583 – 586 (1995)

102. Rho J.Y, Kuhn-Spearing L, Zioupos P., *Mechanical properties and the hierarchical structure of bone*, Med. Eng. Phys., 20, 92 – 102, (1998)
103. Roschger P., Gupta H.S., Berzlanovich A., Ittner G., et al, *Constant mineralization density distribution in cancellous human bone*, Bone, 32, 316 – 323 (2003)
104. Rohanizadeh R., LeGeros R.Z., Bohic S., Pilet P., Barbier A., Daculsi G., *Ultrastructural properties of bone mineral of control and tiludronate-treated osteoporotic rat*, Calcif. Tiss. Int., 67, 330 – 336 (2000)
105. Rubin M.A., Jasiuk I., Taylor J., Rubin J., Ganey T., Apkarian R.P., *TEM analysis of the nanostructure of normal and osteoporotic human trabecular bone*, Bone, 33, 270 – 282 (2003)
106. Ruppel, M.E., Miller, L.M., Burr, D.B., *The effect of the microscopic and nanoscale structure on bone fragility*, Osteop. Int., 19, 1251 – 1265 (2008) (Review)

S

107. Sahar N.D., Hong S.-I., Kohn D.H., *Micro – and nano – structural analyses of damage in bone*, Micron, 36, 617 – 629 (2005) (Review)
108. Sastry, T.P., Chandrasekaran, A., Sundaraseelan, J., Ramasastry, M., Sreedhar, R., *Comparative study of some physic – chemical characteristics of osteoporotic and normal human femur heads*, Clin. Biochem., 40, 907 – 912 (2007)
109. Scherer J., Schnabel P., Kenton C., *Analysis of submicron defects by Auger electron spectroscopy (AES)*, Evan Analytical Groups, PA082 (2007)
110. Sekine, T., Hirata, K., Mogami, A. *Matrix effect correction in quantitative Auger electron spectroscopy*, Surface Science, 125, 565 – 574 (1983)
111. Settle A.F., *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*, Prentice Hall, New Jersey (1997)
112. Shimizu Ryuichi, *Quantitative analysis by Auger Electron Spectroscopy*, Japanese Journal of Applied Physics, Part 1: Regular Papers & Short Notes, 22, 1631 – 1642 (1983)
113. Simmons Jr., E.D., Pritzker K.P.H., Grynblas M.D, *Age – related changes in the human femoral cortex*, J. Orthop. Res., 9, 155 – 167 (2001)

114. Smekal W., Werner W.S.M., Powell C.J., *Simulation of electron spectra for surface analysis (SESSA): A novel software tool for quantitative Auger – electron spectroscopy and X – ray photoelectron spectroscopy*, Surf. Inter. Anal., 37, 1059 – 1067 (2005)
115. Speller R., Pani S., Tzaphlidou M., Horrocks J., *MicroCT analysis of calcium/phosphorus ratio maps at different bone sites*, Nuc. Inst. Meth. A, 548, 269 – 273 (2005)
116. Stevenson C. J., Marsh S. M., *Atlas of Osteoporosis*, Informa, London (2007)
117. Strandh J., *Microchemical studies on single Haversian systems. II. Methodological considerations with special reference to the Ca P ratio in microscopic bone structures*, Exp. Cell Res., 21, 406 – 413 (1960)
118. Suetsugu Y., Hirota K., Fujii K., Tanaka J., *Compositional distribution of hydroxyapatite surface and interface observed by electron spectroscopy*, J. Mater. Sci., 31, 4541 – 4544 (1996)
119. Szyrkowska M. I., *Scanning Electron Microscopy. Encyclopedia of Analytical Science, Second Edition*, 4, Elsevier, Oxford (2005)

T

120. Tanuma S., Powell C.J., Penn D.R., *Calculations of electron inelastic mean free paths. VIII. Data for 15 elemental solids over the 50-2000 eV range*, Surf. Inter. Anal., 37, 1 – 14 (2005)
121. Tanuma S., Powell C.J., Penn D.R., *Calculations of electron inelastic mean free paths*, Surf. Inter. Anal., 21, 165 – 176, (1994)
122. Taylor G. T., *The magnesium of bone mineral*, J. Agric. Sci., 52, 207 – 216 (1959)
123. Timmins P.A., Wall J.C., *Bone water*, Calcif. Tiss. Int. 23, 1 – 5 (1977) (Review)
124. Tong Cao, Tatsuo Shirota, Masataka Yamazaki, Kohsuke Ohno, Ken – ichi Michi, *Bone mineral density in mandibles of ovariectomized rabbits*, Clin. Oral Impl. Res., 12, 604 – 608 (2001)
125. Tzaphlidou M., Berillis P., Matthopoulos D., *Bone calcium, phosphorus detection by Auger electron spectroscopy*, Micron, 36, 706 – 709 (2005)

126. Tzaphlidou M., Kafantari H., *Influence of nutritional factors on bone collagen fibrils in ovariectomized rats*, Bone, 27, 635 – 638 (2000)
127. Tzaphlidou M., Speller R., Royle G., Griffiths J., *Preliminary estimates of the calcium/phosphorus ratio at different cortical bone sites using synchrotron microCT*, Phys. Med. Biol., 51, 1849 – 1855 (2006)
128. Tzaphlidou M., Speller R., Royle G., Griffiths J., *High resolution Ca/P maps of bone architecture*, IEEE Nuclear Science Symposium Conference Record, 3267 – 3270 (2004)
129. Tzaphlidou M., Speller, R., Royle G., Griffiths J., Olivo A., Pani S., Longo R., *High resolution Ca/P maps of bone architecture in 3D synchrotron radiation microtomographic images*, Appl. Radiat. Isot., 62, 569 – 575 (2005)
130. Tzaphlidou M., Zaichick V., *Neutron activation analysis of calcium/phosphorus ratio in rib bone of healthy humans*, Appl. Radiat. Isot., 57, 779 – 783 (2002)
131. Tzaphlidou M., Zaichick V., *Sex and age related Ca/P ratio in cortical bone of iliac crest of healthy humans*, J. Rad. Nucl. Chem., 259, 347 – 349 (2004)

U

132. Underhill P.R., *Experimental investigation of backscatter factors in Auger Spectroscopy*, Surface and Interface Analysis, 8, 61 – 65 (1986).

V

133. Van Raemdonck W., Ducheyne P., De Meester P., *Auger electron spectroscopic analysis of hydroxylapatite coatings on titanium*, J. Am. Ceram. Soc., 67, 381 – 384 (1984)
134. Vaughan M. J., *The physiology of bone*, Clarendon Press, Oxford (1970)
135. Vikerman C.J., Gilmore S.I., *Surface analysis – the principal techniques*, Wiley, England (2009)

136. Vlasiadis K.Z., Damilakis J., Velegrakis G.A., Skouteris C.A., Fragouli I., Goumenou A., Matalliotakis J., Koumantakis E.E., *Relationship between BMD, dental panoramic radiographic findings and biochemical markers of bone turnover in diagnosis of osteoporosis*, *Maturitas*, 59, 226 – 233 (2008)

W

137. Wang L., Banu J., McMahan C.A., Kalu D.N., *Male Rodent Model of Age – related Bone Loss in Men*, *Bone*, 29, 141 – 148 (2001)
138. Watts F.J., Wolstenholm J., *An introduction to surface analysis by XPS and AES*, Wiley, England (2003)
139. Weiner S., Traub W., *Bone structure: from angstrom to microns*, *J. FASEB*, 6, 879 – 885 (1992) (Review)
140. Weiner S., Wagner D.H., *THE MATERIAL BONE: Structure – Mechanical Function Relations*, *Annu. Rev. Mater. Sci.*, 28, 271 – 298 (1998)
141. Weiss A., Arbell I., Steinhagen – Thiessen E., Silbermann M., *Structural changes in aging bone: osteopenia in the proximal femurs of female mice*, *Bone*, 12, 165 – 172 (1991)
142. Wieliczka D.M., Spencer P., LeGeros R.Z., *Surface spectroscopy of apatitic materials: Limitations and concerns*, *J. Dent. Res.*, 75, 1865 – 1870 (1996)
143. Willett L.T., Wynnkyj C., Wang J., Grynpas M.D., *The fatigue resistance of rabbit tibiae varies with age from youth to middle age*, *Osteoporos. Int.*, 22, 1157 – 1165 (2011)
144. World Health Organisation, *Assessment of Fracture Risk and Its Application to Screening for Postmenopausal Osteoporosis*. WHO Technical Report Series 843, WHO, Geneva (1994)
145. World Health Organisation, *Guidelines for Preclinical Evaluation and Clinical Trials in Osteoporosis*, WHO, Geneva (1998)

Y

146. Yao N., Wang L.Z., *Handbook of microscopy for nanotechnology*, Kluwer Academic Publishers, Boston (2005)
147. Yasumura S., Jones K., Spanne P., Schidlovsky G., Wielopolski L., Ren X., Glaros, D., Xatzikonstantinou Y., *In vivo animal models of body composition in aging*, J.Nutr., 123, 459 – 464 (1993)

Z

148. Zaichick V, Tzaphlidou M., *Calcium and phosphorus concentrations and the calcium/phosphorus ratio in trabecular bone from the femoral neck of healthy humans as determined by neutron activation analysis*, Appl. Radiat. Isot., 58, 623 – 628 (2003)
149. Zaichick V, Tzaphlidou M., *Determination of calcium, phosphorus, and the calcium/phosphorus ratio in cortical bone from the human femoral neck by neutron activation analysis*, Appl. Radiat. Isot., 56, 781 – 786, (2002)

