

МАШИНА

МАШИНОСТРОИТЕЛЬНОГО КОМПЛЕКСА

НАЦИОНАЛЬНОГО ЦЕНТРА



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000200034



Αρ. ΕΙΣ:.....427.....<sup>A</sup>.....7



249

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**  
**ΤΟΜΕΑΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ**  
**ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΓΛΑΡΟΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΚΟΛΛΑΓΟΝΟΥ ΣΕ ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ**

**ΕΛΕΝΗ ΚΑΦΑΝΤΑΡΗ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2000**



243/2002



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



ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑ

ΥΠΟΧΡΕΩΣΗ ΚΑΤΑΧΩΡΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΓΩΓΗ ΣΤΟ ΚΑΘΗΜΕΡΙΟ  
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗΣ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΣ ΤΗΣ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΣ

ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΣ ΑΝΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΚΑΤΑΧΩΡΗΣΗΣ  
ΚΑΘΗΜΕΡΙΟ

ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΣ ΑΝΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΚΑΤΑΧΩΡΗΣΗΣ  
ΚΑΘΗΜΕΡΙΟ

**στο γιο μου Δημήτρη**



**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**ΤΖΑΦΛΙΔΟΥ ΜΑΡΓΑΡΙΤΑ:     ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ  
ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**ΓΛΑΡΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ:       ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**ΣΙΑΜΟΠΟΥΛΟΣ ΚΩΝ/ΝΟΣ:    ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ-ΝΕΦΡΟΛΟΓΙΑΣ,  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**



**ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**ΤΖΑΦΛΙΔΟΥ ΜΑΡΓΑΡΙΤΑ: ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ,  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**ΓΛΑΡΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ,  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**ΣΙΑΜΟΠΟΥΛΟΣ ΚΩΝ/ΝΟΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ-ΝΕΦΡΟΛΟΓΙΑΣ,  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**ΣΟΥΚΑΚΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΟΡΘΟΠΕΔΙΚΗΣ,  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**ΧΑΤΖΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΔΕΡΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ,  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**ΞΕΝΑΚΗΣ ΘΕΟΔΩΡΟΣ: ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΟΡΘΟΠΕΔΙΚΗΣ,  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**ΦΑΤΟΥΡΟΣ ΜΙΧΑΗΛ: ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ,  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**





## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η διδακτορική διατριβή αυτή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιατρικής Φυσικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κατά τη χρονική περίοδο 1995-1999, περίοδο κατά την οποία αποτέλεσε και τη βασική μου ενασχόληση.

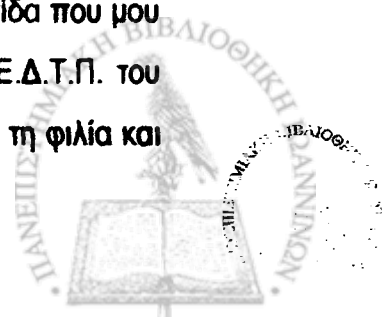
Ολοκληρώνοντας την εργασία αυτή αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλλαν - ο καθένας με τον τρόπο του - στην πραγματοποίησή της.

Το θέμα της διατριβής αυτής προτάθηκε από την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσικής κ. Τζαφλίδου Μαργαρίτα. Την ευχαριστώ θερμά, όχι μόνο για την πρόταση του θέματος, αλλά και για την ηθική συμπαράσταση και ενθάρρυνση καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής, για την αγάπη και γενναιοδωρία με την οποία με περιέβαλλε, την αισιοδοξία που μου ενέπνευσε, καθώς και για τις χρήσιμες παρατηρήσεις της κατά τη διάρκεια εκπόνησης και συγγραφής της διατριβής.

Ευχαριστώ τον Καθηγητή Ιατρικής Φυσικής κ. Γλάρο Δημήτριο για το ενδιαφέρον και την ενθάρρυνσή του μέχρι την ολοκλήρωση της εργασίας αυτής, καθώς και τον Καθηγητή Παθολογίας-Νεφρολογίας κ. Σιαμόπουλο Κων/νο για τη βοήθεια και τις συμβουλές του σε ιατρικά θέματα που σχετίζονται με την παρούσα εργασία. Επίσης ευχαριστώ τα μέλη Δ.Ε.Π. του Εργαστηρίου Ιατρικής Φυσικής κ. Τζον Καλεφεζρά, Αναπληρωτή Καθηγητή, κ. Ρήγα Κων/νο, Επίκουρο Καθηγητή, κ. Λεοντίου Ιωάννη, Επίκουρο Καθηγητή, για τις συμβουλές και τη συνεργασία που μου προσέφεραν κατά τη διάρκεια παραμονής μου στο Εργαστήριο Ιατρικής Φυσικής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Αναπληρωτή καθηγητή Χειρουργικής κ. Φατούρο Μιχαήλ, καθώς και τον χειρουργό κ. Μυλωνάκη Μανώλη, για την πολύτιμη βοήθειά τους στην ωθηκετομή των πειραματοζώων, χωρίς την οποία θα ήταν αδύνατη η εκπόνηση της διατριβής αυτής.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τα μέλη Ε.Δ.Τ.Π. του Εργαστηρίου κ. Γούσια Χρήστο και κ. Μπαλιούσκα Γεράσιμο, Ηλεκτρονικούς, για την συνεργασία που μου προσέφεραν το διάστημα παραμονής μου στο Εργαστήριο Ιατρικής Φυσικής. Ιδιαίτερες ευχαριστίες επίσης θα ήθελα να εκφράσω στο μέλος Ε.Δ.Τ.Π. του Εργαστηρίου κ. Κοτρότσιου Ειρήνη για την πολύτιμη βοήθειά της σε διαδικαστικά θέματα, αλλά και για την αγάπη και φροντίδα που μου χάρισε ως την ολοκλήρωση της εργασίας αυτής. Ευχαριστώ επίσης τα μέλη Ε.Δ.Τ.Π. του Εργαστηρίου Ιατρικής Φυσικής κ. Βλάχο Νικόλαο και κ. Εσκινατζή Μαθίλδη για τη φιλία και τη συνεργασία που μου χάρισαν.



Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω για την ηθική συμπαράσταση και τη φιλία που μου χάρισαν στους υποψήφιους διδάκτορες Ιατρικής Φυσικής κ. Μπαζιόγλου Μαγδαληνή-Αμαλία, Φυσικό Ιατρικής - Ακτινοφυσικό, κ. Δημόπουλο Δημήτριο, Φυσικό, κ. Κυριαζή Βασίλη, Ηλγιο Μηχ/κό, κ. Τζίμα Ευτυχία, Φυσικό Ιατρικής - Ακτινοφυσικό, κ. Μποζιάρη Αργυρώ, Φυσικό Ιατρικής – Ακτινοφυσικό.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Έξαρχο Δημήτρη , Ηλγιο Μηχ/κό, για την εκχώρηση των λογισμικών που χρησιμοποιήθηκαν για τις μετρήσεις της μελέτης αυτής.

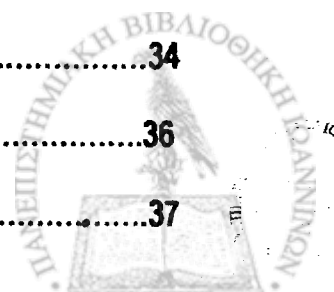
Επίσης ευχαριστώ ιδιαίτερα τον κ. Παρασκευά Δημήτρη, Φυσικό, για την βοήθειά του, τη συμπαράστασή του και τη συνεργασία του κατά την διάρκεια των πειραμάτων, όπως και την κ. Κουνάδη Ευαγγελία Φυσικό Ιατρικής - Ακτινοφυσικό, για την πολύτιμη βοήθειά της.



# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

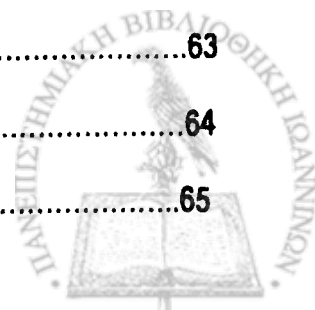
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ.....</b>	<b>1</b>
1.1 Οστά – οστίτης ιστός .....	3
1.2 Μεσοκυττάρια ουσία.....	6
1.2.1 Κολλαγονούχες ίνες και κρύσταλλοι υδροξυαπατίτη.....	8
1.2.2 Ανόργανα συστατικά.....	10
1.3 Οστικά κύτταρα.....	10
1.4 Ορμόνες που επιδρούν στα οστά.....	12
1.4.1 Παραθορμόνη.....	13
1.4.2 Βιταμίνη D.....	14
1.4.3 Ασβέστιο.....	16
1.4.4 Φώσφορος .....	18
1.4.5 Γεννητικές ορμόνες .....	19
1.5 Οστεοπόρωση.....	19
1.6 Ειδική διατροφή.....	24
1.7 Ωθηκετομή.....	26
1.8 Κολλαγόνο.....	29
1.8.1 Εισαγωγή.....	29
1.8.2 Μονοδιάστατη δομή του κολλαγόνου.....	30
1.8.3 Αλληλουχία αμινοξέων στις αλυσίδες του κολλαγόνου.....	33
1.8.4 Περιοχές της τριπλής έλικας.....	34
1.8.5 Μη ελικοειδείς περιοχές στο μόριο του κολλαγόνου.....	36
1.8.6 Βιοσύνθεση του κολλαγόνου.....	37



1.8.7	Προκολλαγόνο.....	38
1.8.8	Σύνθεση του κολλαγόνου.....	38
1.8.9	Η δομή των ινιδίων του κολλαγόνου.....	41
1.9	Η παρατήρηση του κολλαγόνου στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο .....	46
1.9.1	Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.....	46
1.9.2	Σταθεροποίηση.....	47
1.9.3	Χρώση.....	49
1.10	Κολλαγόνο και οστεοπόρωση.....	50

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	53
2.1 Εισαγωγή.....	53
2.2 Πειράματα.....	54
2.2.1 Πρώτη ομάδα.....	54
2.2.2 Δεύτερη ομάδα.....	55
2.2.3 Τρίτη ομάδα.....	56
2.3 Προετοιμασία δειγμάτων δέρματος και οστών για την παρατήρησή τους στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.....	57
2.3.1 Σταθεροποίηση.....	58
2.3.2 Αφυδάτωση.....	61
2.3.3 Εμποτισμός .....	61
2.3.4 Κοπή λεπτών τομών.....	63
2.3.5 Χρώση.....	64
2.4 Ηλεκτρονική μικροσκοπία.....	65



2.5	Ανάλυση των ηλεκτρονικών μικρογραφιών.....	65
2.5.1	Αρχιτεκτονική των ινιδίων.....	66
2.5.2	Μέτρηση της διαμέτρου των ινιδίων με τη χρήση λογισμικού.....	66
2.5.3	Μέτρηση της περιόδου των ινιδίων.....	68

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	70
3.1	Επιπτώσεις της ωθηκετομής στο κολλαγόνο του δέρματος και των οστών επίμυων που υποβλήθηκαν σε κανονική διατροφή.....	70
3.1.1	Εισαγωγή.....	70
3.1.2	Αρχιτεκτονική των ινιδίων δέρματος και οστών.....	70.
3.1.3	Μορφομετρική ανάλυση.....	78
3.1.4	Ανάλυση εικόνας- Μέτρηση της περιοδικότητας των ινιδίων.....	83
3.2	Επιπτώσεις της ειδικής διατροφής στο κολλαγόνο των οστών επίμυων που υποβλήθηκαν σε ωθηκετομή.....	89
3.2.1	Εισαγωγή.....	89
3.2.2	Αρχιτεκτονική των ινιδίων.....	90
3.2.3	Μορφομετρική ανάλυση.....	93



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4**

<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>99</b>
<b>4.1 Επίρμες με ωθηκεκτομή με κανονική ή ειδική διατροφή.....</b>	<b>99</b>

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5**

<b>5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>104</b>
-----------------------------	------------

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>106</b>
----------------------	------------

<b>SUMMARY.....</b>	<b>109</b>
---------------------	------------

<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>111</b>
--------------------------	------------

<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1.....</b>	<b>123</b>
-------------------------	------------

<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2.....</b>	<b>131</b>
-------------------------	------------



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

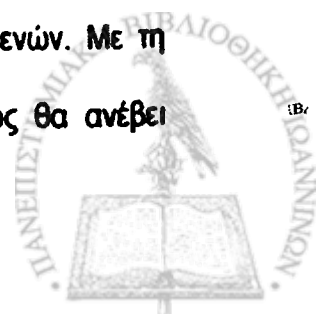
### ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ

Στις μέρες μας η οστεοπόρωση υπολογίζεται ως ένα πολύ σημαντικό πρόβλημα υγείας στον Δυτικό τουλάχιστον πληθυσμό. Πράγματι σύμφωνα με στοιχεία του EFFO (European Foundation for Osteoporosis) έχει υπολογισθεί ότι κάθε χρόνο στην Ευρώπη λαβαίνουν χώρα 407.000 κατάγματα ισχίου, 340.000 σπονδύλων και ωλένης.

Η οστεοπόρωση ορίζεται ως συστηματική σκελετική νόσος χαρακτηριζόμενη από χαμηλή οστική μάζα και διαταραχή της μικροαρχιτεκτονικής του οστίτη ιστού η οποία συνεπάγεται αυξημένη ευθραυστότητα του οστού και τάση για κατάγματα.

Η οστεοπόρωση είναι ένα νόσημα με τεράστιες κοινωνικο-οικονομικές επιπτώσεις. Τονίζεται ότι το 45% των γυναικών λευκής φυλής ηλικίας μεγαλύτερης των 50 ετών έχει ελαττωμένη οστική πυκνότητα. Ο κίνδυνος να υποστεί μια από τις γυναίκες αυτές οστεοπορωτικό κάταγμα είναι 40%, ενώ ο αντίστοιχος κίνδυνος για έναν άνδρα είναι 13%.

Επίσης, το κόστος της οστεοπόρωσης, είτε αυτό αφορά στη διάγνωση και θεραπεία, είτε στην αντιμετώπιση των επιπλοκών της είναι πολύ μεγάλο. Στην Ευρώπη υπολογίζεται ότι είναι πάνω από \$10,000 εκατομμύρια κάθε χρόνο. Όμως το συνολικό κόστος της νόσου στην Ευρώπη τείνει να γίνει πολύ μεγαλύτερο αν υπολογιστούν σε αυτό οι διάφορες έμμεσες συνέπειες της νόσου καθώς και η υποβάθμιση ποιότητας της ζωής των ασθενών. Με τη γήρανση του Ευρωπαϊκού πληθυσμού προβλέπεται ότι το οικονομικό κόστος θα ανέβει



σταδιακά τα επόμενα 30 χρόνια εκτός και αν ληφθεί μέριμνα για την αντιμετώπιση και πρόληψη της οστεοπόρωσης.

Ανάμεσα στις πιο αντιπροσωπευτικές αλλά και ιδιαίζουσες αλλαγές που συμβαίνουν κατά την οστεοπόρωση είναι και εκείνες που αφορούν τις μηχανικές ιδιότητες των ιστών. Για το δέρμα, τα οστά και τα άλλα όργανα, υπεύθυνος για τις ιδιότητες αυτές είναι ο συνδετικός ιστός. Ένα από τα βασικά οργανικά συστατικά του συνδετικού ιστού είναι το κολλαγόνο. Εξετάζοντας τις επιπτώσεις της νόσου στο κολλαγόνο συνεισφέρουμε στην κατανόηση των παρενεργειών της οστεοπόρωσης στα διάφορα όργανα του σώματος καθώς και στην περαιτέρω διερεύνηση των μηχανισμών δράσης της.

Η παρούσα μελέτη εξετάζει πώς η προκλητή οστεοπόρωση με ωθηκετομή επηρεάζει το κολλαγόνο του δέρματος και των οστών (πορώδους και φλοιώδους) διερευνώντας την αρχιτεκτονική των ινιδίων του αλλά και μεταβολές στις δομικές παραμέτρους του. Επίσης διερευνεί πώς η ειδική διατροφή μπορεί να συνεισφέρει στη βελτίωση των αρνητικών επιπτώσεων της νόσου όσον αφορά στα παραπάνω στοιχεία του κολλαγόνου που εξετάστηκαν. Δοκιμάστηκαν διάφοροι διατροφικοί συνδυασμοί και προτάθηκαν αυτοί με τα καλύτερα αποτελέσματα.



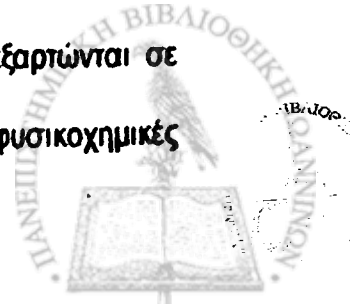


## 1.1 Οστά – οστίτης ιστός

Τα οστά αποτελούν ένα σημαντικό τμήμα του οργανισμού δεδομένου ότι σπαρτίζουν το σκελετό, στον οποίο ο άνθρωπος οφείλει το σχήμα του αλλά και τις κινητικές του δυνατότητες. Τα οστά είναι σκληρά ανθεκτικά όργανα, με κύριο συστατικό τους τον οστίτη ιστό. Ο οστίτης ιστός είναι ένας ιστός, ο οποίος αποτελείται από ανόργανα και οργανικά συστατικά. Ο ρόλος του είναι σημαντικός γιατί παρέχει τη μηχανική υποστήριξη, την κινητικότητα και την προστασία των υπολοίπων οργάνων του οργανισμού, όπως της καρδιάς, του εγκεφάλου και των πνευμόνων. Μέσα στον οστίτη ιστό περιέχεται ο μυελός ο οποίος είναι απαραίτητος για την αναγέννηση των έμμορφων συστατικών του αίματος.

Από βιοχημική άποψη ο οστίτης ιστός είναι η αποθήκη του οργανισμού σε ιόντα η διατήρηση των οποίων σε σταθερά επίπεδα στο εξωκυττάριο υγρό είναι κρίσιμη τόσο για τη ρύθμιση της νευρομυϊκής διεγερσιμότητας, όσο και μιας σειράς άλλων σημαντικών κυτταρικών λειτουργιών του οργανισμού. Πράγματι, περίπου το 99% του ασβεστίου, το 85% του φωσφόρου, το 40% του νατρίου καθώς και το 60% του μαγνησίου του οργανισμού βρίσκονται αποθηκευμένα στα οστά.

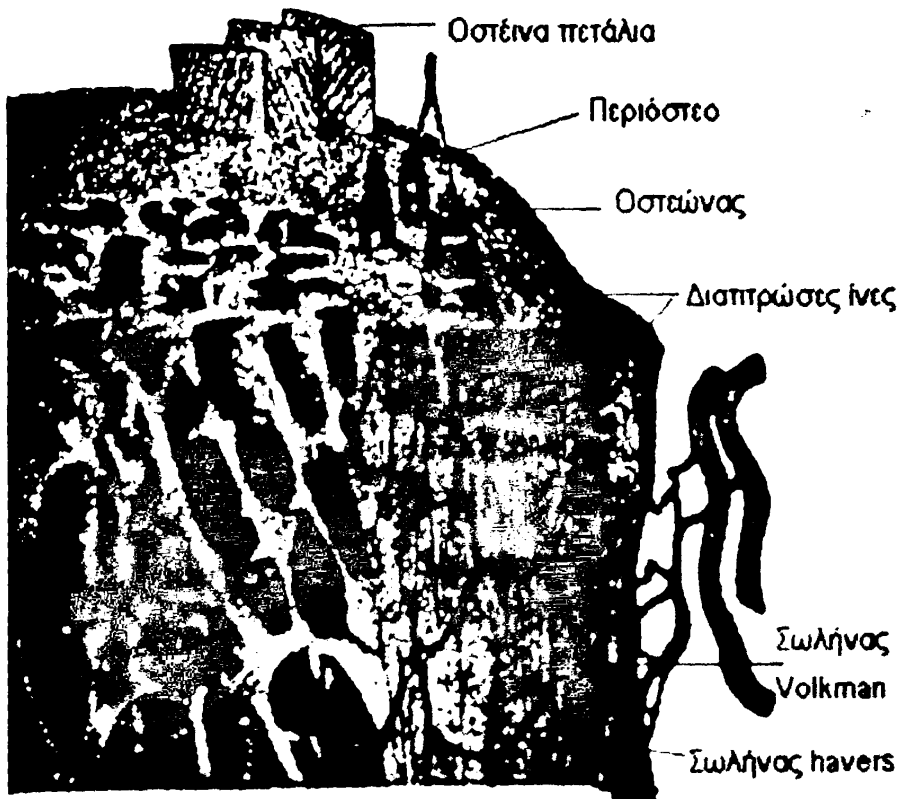
Από δομική άποψη τα οργανικά συστατικά του οστίτη ιστού, εμποτιζόμενα με κρυστάλλους υδροξυαπατίτη, μετατρέπουν αυτό το μαλακό οργανικό υπόστρωμα σε ένα σκληρό άκαμπτο υλικό, τα οστά, τα οποία παρέχουν τις μηχανικές ιδιότητες, την κινητικότητα, την αντοχή στις δυνάμεις που εφαρμόζονται στο σώμα από τις διάφορες δραστηριότητες του ανθρώπου. Όλες αυτές οι σημαντικές λειτουργίες που οφείλονται στα ανόργανα συστατικά, εξαρτώνται σε μεγάλη έκταση από την ακριβή χημική σύσταση, την κρυσταλλική δομή και τις φυσικοχημικές



ιδιότητές τους, οι οποίες μεταβάλλονται με το χρόνο μετά την αρχική τους εναπόθεση. Ο σχηματισμός ποσότητας νέου οστού και η απορρόφηση παλιού είναι συνεχείς λειτουργίες στα οστά. Αυτό έχει ως συνέπεια να αλλάζει το μέγεθος και η αναλογία του νέου οστού ως προς το παλιό. Η συνεχής αυτή αναδόμηση είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη, για την επιδιόρθωση των μικροβλαβών που λαμβάνουν χώρα από τις καθημερινές πιέσεις και τάσεις που εφαρμόζονται στα οστά αλλά και τη διατήρηση της ομαλής λειτουργίας του οργανισμού.

Τα οστά περιβάλλονται εξωτερικά από ένα συνδετικόγενή υμένα, το περίοστεο. Ακολουθεί η οστεΐνη αποτελούμενη εξωτερικά από τη φλοιώδη ουσία μέσα στην οποία βρίσκεται η σπογγώδης ουσία. Μέσα στη σπογγώδη ουσία βρίσκεται ο μυελός των οστών. Μέσα στα οστά εμφανίζονται επίσης τα νεύρα και τα αγγεία. Η οστεΐνη περιέχει όλα τα στοιχεία του οστίτη ιστού, όπως τα οστεΐνα πετάλια, τις οστικές κοιλότητες και σωληνάκια, τα οστικά κύτταρα, τους σωλήνες havers και Volkman καθώς και τις διατιτρώσες ίνες (σχήμα 1.1). Αν και η φλοιώδης και σπογγώδης ουσία είναι ίδιες από ιστολογική άποψη, τα στοιχεία του οστίτη ιστού είναι διαφορετικά διατεταγμένα σε αυτές.





**Σχήμα 1.1:** Σχηματική αναπαράσταση κατασκευής οστού (Σάββας, 1957).

Τα φλοιώδη οστά αποτελούνται από οστέινα πετάλια. Ομόκεντρα κυλινδρικά πετάλια σχηματίζουν ένα οστικό κύλινδρο το χαβερσιανό σύστημα ή οστεώνα. Χαβερσιανά συστήματα κείτονται ανάμεσα στα οστέινα πετάλια καθώς επίσης και οστικές κοιλότητες οι οποίες περιέχουν τα οστικά κύτταρα. Τα χαβερσιανά συστήματα, τα πετάλια και τα οστικά κύτταρα συνδέονται τόσο μεταξύ τους όσο και με το μυελό αλλά και την ελεύθερη επιφάνεια των οστών με ένα σύστημα αγγείων και σωλήνων χαβερσιανών και volkman (σχήμα 1.1).



Τα σπογγώδη οστά δεν περιέχουν χαβερσιανά συστήματα, αλλά αποτελούνται από οστικά πετάλια και δοκίδες διαφόρων σχημάτων και πάχους που αλληλοσυνδέονται ακαθόριστα σχηματίζοντας κοιλότητες που περιέχουν μυελό (σχήμα 1.1).

Κάθε τμήμα του σκελετού έχει διαφορετική λειτουργικότητα οπότε και οι μηχανικές ανάγκες είναι πολλαπλές. Για αυτό το λόγο το σχήμα, η δομή και η σύσταση των οστών ποικίλουν. Ο οστίτης ιστός αποτελείται από τη μεσοκυττάρια ουσία, μέσα στην οποία βρίσκονται τα οστικά κύτταρα.

## 1.2 Μεσοκυττάρια ουσία

Η μεσοκυττάρια ουσία αποτελείται από τη θεμέλια ουσία, η οποία είναι εμποτισμένη με ανόργανα άλατα και από τους κρυστάλλους υδροξυαπατίτη. Τα οστά είναι μια σύνθετη κατασκευή αποτελούμενη από οργανικά (35%) και ανόργανα συστατικά (65%) τα οποία σε σύνθεση προσδίδουν στα οστά τη σκληρότητα αλλά και την ανθεκτικότητα στις καταπονήσεις, στις δυνάμεις ροπής και κάμψης. Η θεμέλια ουσία αποτελείται από κολλαγόνο, πρωτεϊνικούς πολυσακχαρίτες, γλυκοπρωτείνες και λιπίδια. Το 95% της θεμέλιας ουσίας αποτελείται από κολλαγόνο τύπου I (Miller, 1976).

Η εκατοστιαία αναλογία του φλοιώδους και πορώδους οστού σε νερό, λιπίδια, πρωτείνες, ανόργανα άλατα και άλλες ουσίες φαίνεται στον πίνακα 1.1 (Woodard and White, 1986).



**Πίνακας 1.1:** Εκατοστιαία χημική σύσταση φλοιώδους και πορώδους οστού.

Τύπος Οστού	Νερό	Λιπίδια	Πρωτείνες	Ανόργανα άλατα	Άλλες Ουσίες
Φλοιώδες	12,2	-	24,6	58	5,2
Πορώδες	22,5	40,2	16,2	19,4	1,7

Η εκατοστιαία στοιχειακή σύσταση για το φλοιώδες και το πορώδες οστό φαίνεται στον πίνακα 1.2 (Woodard and White, 1986).

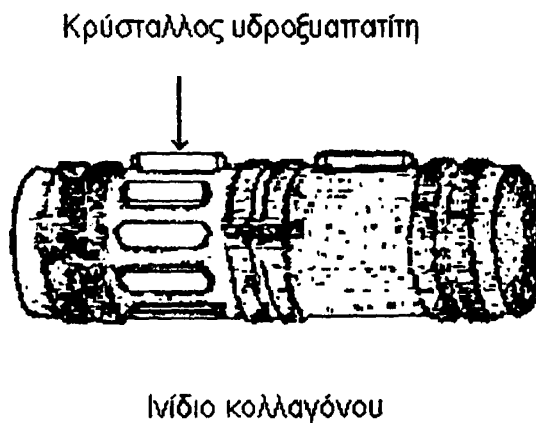
**Πίνακας 1.2:** Στοιχειακή εκατοστιαία σύσταση του πορώδους και φλοιώδους οστού.

Τύπος οστού	H	C	N	O	Na	Mg	P	S	Cl	K	Ca	Fe
Φλοιώδες	3,4	15,5	4,2	43,5	0,1	0,2	10,3	0,3	-	-	22,5	-
Πορώδες	8,5	40,4	2,8	36,7	0,1	0,1	3,4	0,2	0,2	0,1	7,4	0,1



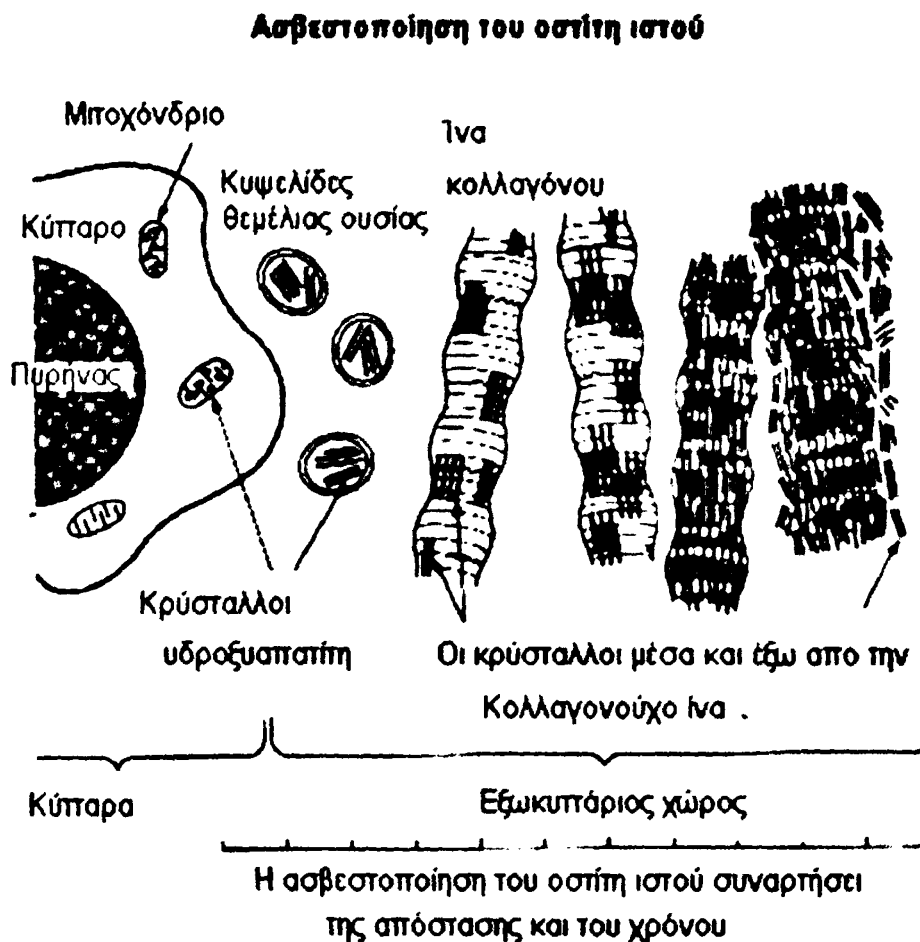
### 1.2.1 Κολλαγονούχες ίνες και κρύσταλλοι υδροξυαπατίτη

Πιθανολογείται ότι οι κρύσταλλοι υδροξυαπατίτη σχηματίζονται στα μιτοχόνδρια και στις κυψελίδες της θεμέλιας ουσίας. Οι κρύσταλλοι υδροξυαπατίτη αρχικά εναποτίθενται μέσα στις κολλαγονούχες ίνες και έχουν μεταξύ τους κάποια απόσταση. Ο κρύσταλλος του υδροξυαπατίτη έχει σχήμα σχεδόν παραλληλόγραμμο. Με τη βοήθεια της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας και της περίθλασης των ακτίνων Χ, παρατηρήθηκε ότι οι κατά μήκος άξονες των κρυστάλλων που είναι τοποθετημένοι μέσα στην κολλαγονούχα ίνα είναι παράλληλοι τόσο μεταξύ τους, όσο και με τον άξονα της ίνας μέσα στην οποία είναι τοποθετημένοι (σχήμα 1.2).



Σχήμα 1.2: Ίνιδιο κολλαγόνου και οι αρχικά εναποτιθεμένοι κρύσταλλοι υδροξυαπατίτη στην επιφάνειά του.

Με το πέρασμα του χρόνου όλο και περισσότεροι κρύσταλλοι εναποτίθενται τόσο στις κολλαγονούχες ίνες όσο και στο γύρω περιβάλλον, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται σταδιακά η ασβεστοποίηση του οστίτη ιστού σε συνάρτηση με το χρόνο (σχήμα 1.3).



**Σχήμα 1.3:** Διαγραμματική αναπαράσταση της ασβεστοποίησης του οστίτη ιστού. Ο ακριβής ρόλος των μιτοχόνδριων της θεμέλιας ουσίας στην ασβεστοποίηση του οστίτη ιστού δεν έχει ακόμα προσδιορισθεί (Avioli and Krane, 1990).



### 1.2.2 Ανόργανα συστατικά

Η ακριβής σύσταση των μετάλλων που απαρτίζουν το πορώδες και το φλοιώδες οστό διαφέρει όπως παρατηρούμε στον πίνακα 1.2. Τα ανόργανα συστατικά των οστών αποτελούνται από φωσφορικό ασβέστιο (85%), από φωσφορικό μαγνήσιο (1,50%), από φθοριούχο ασβέστιο (0,30%), από χλωριούχο ασβέστιο (0,20%), από ανθρακικό ασβέστιο (10%) και από αλκαλικά άλατα (2%). Έτσι συνεπάγεται ότι το κύριο ανόργανο συστατικό του οστίτη ιστού είναι το φωσφορικό ασβέστιο το οποίο συναντάται υπό τη μορφή υπερμικροσκοπικών κρυστάλλων υδροξυαπατίτη, οι οποίοι δίνονται από τον τύπο  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Οι κρύσταλλοι περιβάλλονται από μόρια νερού τα οποία βοηθούν στην ανταλλαγή ιόντων με τη θεμέλια ουσία.

### 1.3 Οστικά κύτταρα

Τα οστικά κύτταρα βρίσκονται μέσα στη μεσοκυττάρια ουσία και ο ρόλος τους είναι καθοριστικός για το μεταβολισμό του οστού. Τα οστικά κύτταρα συμμετέχουν ενεργά στην οστική ανακατασκευή που περιλαμβάνει την απορρόφηση και την παραγωγή των οστών. Συνεργαζόμενα μεταξύ τους αρμονικά παράγουν ζωτικά στοιχεία των οστών αλλά και το αναδομούν. Μέσω των κυττάρων, γίνεται η επικοινωνία των οστών με τον οργανισμό, αφού είναι υποδοχείς ερεθισμάτων μέσω των ορμονών. Τρία γνωρίσματα χαρακτηρίζουν και διαφοροποιούν τα κύτταρα σε οστεοβλάστες, οστεοκύτταρα και οστεοκλάστες α) τα συστατικά που παράγει το καθένα β) η ενζυματική τους δράση γ) οι ορμόνες και τα άλλα ερεθίσματα που τα επηρεάζουν.





Οι οστεοβλάστες συνθέτουν και εκκρίνουν τα περισσότερα οργανικά συστατικά της θεμέλιας ουσίας, όπως κολλαγόνο και γλυκοπρωτείνες και συμβάλλουν στην εναπόθεση ασβεστίου σε αυτή, μέσω της ενζυμικής δράσης της φωσφοτάσης. Οι ορμονικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη δράση τους είναι η παραθορμόνη, τα γλυκοκορτοειδή, η ινσουλίνη, οι γεννητικές ορμόνες και η βιταμίνη D. Οι οστεοβλάστες επικοινωνούν μεταξύ τους αλλά και με τα οστεοκύτταρα με αποφυάδες. Τελικά εγκλωβίζονται στη θεμέλια ουσία που παράγουν και μετατρέπονται σε οστεοκύτταρα.

Τα οστεοκύτταρα εγκλωβισμένα μέσα στις οστικές κοιλότητες επικοινωνούν με τη μεσοκυττάρια ουσία αλλά και τα άλλα κύτταρα με αποφυάδες οι οποίες καταλήγουν στα οστικά σωληνάκια. Είναι τα πιο άφθονα σε πληθυσμό από τα υπόλοιπα οστικά κύτταρα. Τα οστεοκύτταρα συντηρούν τη θεμέλια ουσία παράγοντας μικρές ποσότητες και απελευθερώνουν ασβέστιο όταν είναι απαραίτητο. Οι ρόλοι που έχουν αποδοθεί στα οστεοκύτταρα καθώς και στο δίκτυο των σωληνάριων που ξεκινούν από αυτά είναι διάφοροι. Αυτοί είναι, η ανταλλαγή ανόργανων συστατικών, η ομοιοστασία του ασβεστίου, η οστεόλυση, η ανακατασκευαστική δραστηριότητα, η επανόρθωση μικροβλαβών και η ρύθμιση του μηχανισμού που σχετίζεται με τη δόμηση και την ανακατασκευή του οστού, καθώς και άλλοι. Τα οστεοκύτταρα φαίνεται να συμμετέχουν στο μηχανισμό που αντιδρά στις πιέσεις που δέχονται τα οστά από τα διάφορα φορτία και διατηρεί την αρχιτεκτονική τους (Lanyon, 1993). Η ενζυμική δράση της φωσφοτάσης στα οστεοκύτταρα δεν είναι τόσο έντονη όσο στους οστεοβλάστες, ενώ εμφανίζονται να είναι πιο ευαίσθητα στη δράση της παραθορμόνης από τους οστεοβλάστες (van der Plas et al., 1994). Τα οστεοκύτταρα καταστρέφονται με την απορρόφηση της θεμέλιας ουσίας από τους οστεοκλάστες.



Οι οστεοκλάστες απορροφούν τη θεμέλια ουσία των οστών έπειτα από ειδικά ερεθίσματα και έτσι συντελούν στην αναδόμησή τους. Η παραθορμόνη, τα γλυκοκορτικοειδή και η 1,25-βιταμίνη D, αυξάνουν την οστεοκλαστική δραστηριότητα με αποτέλεσμα την απελευθέρωση ασβεστίου στο πλάσμα, ενώ αντίθετα η καλσιτονίνη έχει κατασταλτική δράση στους οστεοκλάστες.

#### 1.4 Ορμόνες που επιδρούν στα οστά

Ο ανθρώπινος σκελετός όπως ήδη έχουμε αναφέρει παίζει δυο σημαντικούς ρόλους για τον οργανισμό. Ο ένας είναι η στήριξη και το σχήμα του ανθρώπινου σώματος, η προστασία ζωτικών οργάνων και η ικανότητα παραγωγής και ανακατασκευής του οστίτη ιστού από τον οποίο αποτελείται. Ταυτόχρονα ο σκελετός είναι η αποθήκη ιόντων. Η ζωτικότητα του σκελετού και η ικανότητα να αντεπεξέρχεται στις παραπάνω λειτουργίες δεν είναι ένα τυχαίο γεγονός αλλά μια πολύπλοκη διαδικασία η οποία ρυθμίζεται από ορμονικούς και άλλους παράγοντες. Πολλά μεταβολικά νοσήματα οφείλονται στη μη φυσιολογική λειτουργία αυτών των παραγόντων. Οι επιδράσεις στον οστικό μεταβολισμό μπορούν να ταξινομηθούν ως εξής (Λυρίτης, 1991):

A) Ορμόνες που ρυθμίζουν το ασβέστιο του αίματος παραθορμόνη, 1,25-διυδροξυβιταμίνη D, καλσιτονίνη.

B) Ορμόνες που επιδρούν στην ανάπτυξη και λειτουργία του οστίτη ιστού γλυκοκορτικοειδή, αυξητική ορμόνη, θυροειδικές ορμόνες, γεννητικές ορμόνες, ινσουλίνη, προλακτίνη.

Γ) Αυξητικοί παράγοντες σωματομεδίνες, επιδερμικός αυξητικός παράγοντας, ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας, αιματοπεταλικός αυξητικός παράγοντας.



Δ) Τοπικοί παράγοντες προσταγλαδίνη E2, παράγοντας που ενεργοποιεί τους οστεοκλάστες, οστεογενής αυξητικός παράγοντας.

Ε) Ιόντα ασβέστιο, φώσφορος.

Θα εξετάσουμε το ρόλο μερικών από τους παραπάνω παράγοντες.

### 1.4.1 Παραθορμόνη

Η παραθορμόνη (PTH) είναι ο κύριος ρυθμιστής της ανακατασκευής των οστών, αφού η παρουσία της διεγείρει τη δράση των οστεοκλαστών αλλά και της βιταμίνης D. Έχει παρατηρηθεί ότι με τη δράση της συγκεκριμένης ορμόνης έχουμε απώλεια κυρίως φλοκώδους οστού, ενώ παρατεταμένη χρήση της αυξάνει την ποσότητα του πορώδους οστού (Masiukiewicz and Insogna, 1998 ; Cosman and Lindsay, 1998). Τα αυξημένα επίπεδα της παραθορμόνης συμβάλλουν στην οστεοπόρωση κυρίως σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση, λόγω της αυξημένης οστεοκλαστικής δράσης που προκαλεί (Masiukiewicz and Insogna, 1998). Αντίθετα τα επίπεδα της παραθορμόνης στον ορό, αλλά και ο αριθμός των οστεοκλαστών, μειώνονται με εφαρμογή διαίτας ασβεστίου μαζί με βιταμίνη D (Erben et al., 1998). Μειωμένα επίπεδα παραθορμόνης παρατηρούμε επίσης όταν σε εμμηνοπαυτικές γυναίκες εφαρμόζεται διαίτα εμπλουτισμένη σε βιταμίνη D (Lukert et al., 1987).

Έκκριση της παραθορμόνης προκαλείται όταν τα επίπεδα του ασβεστίου του πλάσματος είναι χαμηλά. Τότε, η παραθορμόνη διεγείρει άμεσα την οστική απορρόφηση, αυξάνοντας τον αριθμό των οστεοκλαστών αλλά και την απορροφητική τους δραστηριότητα. Με την απορρόφηση οστού απελευθερώνεται ασβέστιο στο πλάσμα. Στα νεφρά η δράση της εξοικονομεί ασβέστιο, ελαττώνοντας την απέκκρισή του ενώ, αυξάνεται η απέκκριση του



φωσφόρου. Ταυτόχρονα όμως η δράση της παραθορμόνης προκαλεί και αύξηση της σύνθεσης της βιταμίνης D, η οποία με τη σειρά της προκαλεί απορρόφηση ασβεστίου και φωσφόρου από το έντερο. Έτσι ως τελικό αποτέλεσμα από τη δράση της, έχουμε την αύξηση του ασβεστίου του πλάσματος και τη μείωση του φωσφόρου.

#### 1.4.2 Βιταμίνη D

Στο παρελθόν θεωρούσαμε τη βιταμίνη D ως ένα θρεπτικό συστατικό της τροφής. Μετά από μελέτες ετών πάνω στο μεταβολισμό της βιταμίνης D, αποκαλύφθηκε ότι υδροξυλιώνεται στο ήπαρ πριν χρησιμοποιηθεί στον οργανισμό, πράγμα που έκανε τους επιστήμονες να τη θεωρούν μια ορμόνη, η οποία μάλιστα επιδρά στη ρύθμιση του ασβεστίου και του φωσφόρου στον οργανισμό, όπως και στο μεταβολισμό των οστών. Δυο είναι οι πιο σημαντικές μορφές της : η βιταμίνη D3 ή χολικαλσιφερόνη και η βιταμίνη D2 ή εργοκαλσιφερόνη. Τη βιταμίνη D την προσλαμβάνουμε από τροφές που περιέχουν ζωικά προϊόντα κυρίως ως εργοκαλσιφερόλη, αλλά κυρίως παράγεται στο δέρμα από την επίδραση του ήλιου ως χολικαλσιφερόλη. Η απορρόφηση της βιταμίνης D από τις τροφές γίνεται στο έντερο. Ακολούθως μεταφέρεται στο συκώτι και μετατρέπεται σε 25-OHD και έπειτα στους νεφρούς όπου παίρνει την τελική μορφή της σε 1,25(OH)<sub>2</sub>D. Η νέα μορφή της βιταμίνης D είναι 500 φορές πιο ενεργή στο να διεγείρει την εντερική απορρόφηση του ασβεστίου, αλλά και να συμβάλλει στην εναπόθεση αλάτων στους κρυστάλλους υδροξυαπατίτη του οστίτη ιστού. Επίσης συντηρεί συστήματα που απαιτούν ασβέστιο, όπως είναι το νευρικό σύστημα και οι μύες και βοηθάει στην πήξη του αίματος.



Πτώση των επιπέδων του ασβεστίου του πλάσματος, προκαλεί έκκριση της παραθορμόνης, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την παραγωγή της βιταμίνης D. Η αύξηση της βιταμίνης D ενισχύει την εντερική απορρόφηση του ασβεστίου και του φωσφόρου. Η βιταμίνη D ενισχύοντας την απορρόφηση του ασβεστίου από το έντερο, προκαλεί αύξηση του ασβεστίου του πλάσματος, δράση παράλληλη με αυτή της παραθορμόνης (PTH).

Υψηλές δόσεις της βιταμίνης D έχουν τοξικές επιδράσεις στα οστεοκύτταρα των οστών, με αποτέλεσμα την αυξημένη ποσότητα ασβεστίου στο πλάσμα, που οφείλεται σε απελευθέρωση ασβεστίου από τα οστά (Kolb, 1981). Η έλλειψη της βιταμίνης D προκαλεί ραχιτισμό ή οστεομαλακία αλλά και τα χαμηλά επίπεδά της στον οργανισμό προκαλούν μειωμένη εντερική απορρόφηση και κατά συνέπεια οστεοπόρωση. Οστεοπόρωση μπορούμε να παρατηρήσουμε και κατά την πορεία της γήρανσης όπου η παραγωγή της βιταμίνης D προοδευτικά μειώνεται. Πράγματι, σε μελέτη που έγινε σε οστεοπορωτικές γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση, οι οποίες είχαν διατροφή πολύ φτωχή σε βιταμίνη D, παρατηρήθηκε σημαντική οστική απώλεια (Villareal et al., 1991). Αντιθέτως διατροφή εμπλουτισμένη με βιταμίνη D μείωσε την οστική απώλεια σε εμμηνοπαυτικές γυναίκες (Lukert et al., 1987). Μελέτες σε επίμυες που υποβλήθηκαν σε ωθηκεκτομή και χρησιμοποιήθηκαν ως οστεοπορωτικά μοντέλα, έδειξαν ότι διατροφή εμπλουτισμένη με βιταμίνη D αυξάνει σημαντικά την οστική μάζα κυρίως του πορώδους οστού, ή τη διατηρεί σε σταθερά επίπεδα ανάλογα με τον τύπο της βιταμίνης D που χρησιμοποιείται (Geusens et al., 1991 ; Erben et al., 1992 ; Erben et al., 1997).



### 1.4.3 Ασβέστιο

Το ασβέστιο είναι το πιο άφθονο μεταλλικό στοιχείο που υπάρχει στον οργανισμό. Το 99% του ασβεστίου του οργανισμού βρίσκεται στο σκελετό ενώ το υπόλοιπο 1% στο αίμα, στο εξωκυττάριο υγρό και στους μαλακούς ιστούς. Το 1% του ασβεστίου του σκελετού ανανεώνεται συνεχώς, με αποτέλεσμα μια διαρκή ανταλλαγή ιόντων με τα εξωκυττάρια υγρά και τα υπόλοιπα μέλη του οργανισμού. Το ασβέστιο δεν είναι αναγκαίο μόνο για την ανάπτυξη, το σχηματισμό και τη διατήρηση των οστών σε καλή κατάσταση, αλλά βοηθάει στην πήξη του αίματος, τη μεταβίβαση των νευρικών ερεθισμάτων, τη σύσπασση των μυών και της καρδιάς.

Για τη σωστή λειτουργία του οργανισμού τα επίπεδα του κυκλοφορούντος ασβεστίου πρέπει να βρίσκονται μέσα σε συγκεκριμένα όρια τιμών. Αυτή η σημαντική λειτουργία που ονομάζεται ομοιοστασία του ασβεστίου, είναι από τις πιο πολύπλοκες και εξελιγμένες βιολογικές λειτουργίες και επιτυγχάνεται με τη συνεργασία μιας ποικιλίας ορμονών που εκκρίνονται από το ήπαρ, το σκελετό και τα έντερα. Φυσικά καθοριστικός ρυθμιστικός παράγοντας της ομοιοστασίας του ασβεστίου είναι η λήψη του από τις τροφές (διαιτητικό ασβέστιο) αλλά και η σωστή εντερική απορρόφηση του. Επειδή το ασβέστιο ανανεώνεται συνεχώς, οι ανάγκες για επαρκή λήψη του είναι διαρκείς. Οι γυναίκες λόγω της εγκυμοσύνης αλλά και της εμμηνόπαυσης έχουν αυξημένη απώλεια ασβεστίου και πρωτεϊνών από τα οστά, πράγμα που τις κάνει πιο ευπαθείς από τους άνδρες στην οστεοπόρωση.

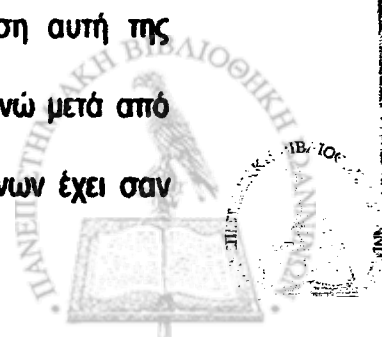
Κύρια πηγή ασβεστίου είναι τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Υπολογίζεται ότι κατά μέσο όρο η καθημερινή ποσότητα που λαμβάνεται από τις τροφές για έναν άνθρωπο που τρέφεται φυσιολογικά είναι περίπου 400-1000 mg Ca. Το ασβέστιο αυτό φτάνει στα οστά αλλά και



στον υπόλοιπο οργανισμό αφού απορροφηθεί από το έντερο. Το έντερο απορροφά την αντιστρόφως ανάλογη ποσότητα ασβεστίου που λαμβάνει. Το ασβέστιο στη συνέχεια διηθείται στους νεφρούς για να χρησιμοποιηθεί τελικά για τα οστά και τις άλλες ανάγκες του οργανισμού. Η διήθηση του ασβεστίου από τα νεφρά είναι μια σπουδαία διεργασία που συμβάλλει στην ομοιοστασία του ασβεστίου. Απέκκριση του ασβεστίου γίνεται από το έντερο, τα νεφρά και το δέρμα.

Το ασβέστιο στα οστά βρίσκεται με τη μορφή κρυστάλλων υδροξυαπατίτη και κάποιο πολύ μικρό ποσοστό του ως άμορφο φωσφορικό ασβέστιο. Οι κρύσταλλοι υδροξυαπατίτη είναι προσκολλημένοι στις κολλαγονούχες ίνες της θεμέλιας ουσίας.

Όπως αναφέραμε, τα επίπεδα του κυκλοφορούντος ασβεστίου πρέπει να βρίσκονται σε συγκεκριμένα όρια τιμών, γεγονός που επιτυγχάνεται με την ορμονική επίδραση της παραθορμόνης (PTH), της βιταμίνης D, του φωσφόρου και των οιστρογόνων. Όταν η συγκέντρωση του κυκλοφορούντος ασβεστίου μεταβάλλεται, ενεργοποιείται η PTH. Απώλεια ασβεστίου σημαίνει αύξηση στην έκκριση της PTH που δίνει το ερέθισμα για αύξηση της απορρόφησης του διαιτητικού ασβεστίου από το έντερο. Ταυτόχρονα η PTH διεγείρει την παραγωγή της 1,25(OH)<sub>2</sub>D η οποία διευκολύνει την απορρόφηση του ασβεστίου. Πράγματι έχει παρατηρηθεί ότι δίαιτα χαμηλή σε ασβέστιο προκαλεί μια σημαντική αύξηση της 1,25(OH)<sub>2</sub>D στον ορό του αίματος (Kalu et al., 1989). Κατά την πορεία της γήρανσης η εντερική απορρόφηση του ασβεστίου μειώνεται, καθώς όπως αναφέραμε, τα επίπεδα παραγωγής της βιταμίνης D μειώνονται προοδευτικά. Έτσι κατά τη γεροντική ηλικία, η αυξημένη λήψη ασβεστίου είναι απαραίτητη. Όμως στις γυναίκες, η μείωση αυτή της απορρόφησης παρατηρείται πολύ πιο νωρίς, πριν ακόμα την εμμηνόπαυση, ενώ μετά από αυτή γίνεται ακόμα πιο έντονη. Αυτό συμβαίνει γιατί η μείωση των οιστρογόνων έχει σαν



αποτέλεσμα τη μειωμένη εντερική απορρόφηση του ασβεστίου καθώς και την αυξημένη απέκκρισή του από τον οργανισμό, αυξάνοντας τον κίνδυνο για οστεοπόρωση. Ο φώσφορος, άμεσα συνδεδεμένος με το ασβέστιο στους κρυστάλλους υδροξυαπατίτη, διευκολύνει την εναπόθεση του ασβεστίου στα οστά. Το ασβέστιο, μαζί με τα φωσφορικά άλατα, εξασφαλίζουν τη μηχανική ακαμψία των οστών. Η απορρόφηση του ασβεστίου από το έντερο έχει άμεση σχέση με την ποσότητα του φωσφόρου που λαμβάνεται από τις τροφές. Δίαιτες που εφαρμόστηκαν σε ποντικούς hamster, έδειξαν ότι η εντερική απορρόφηση του ασβεστίου αυξήθηκε σε χαμηλή λήψη ασβεστίου και φυσιολογική φωσφόρου, ενώ ήταν ανεξάρτητη της ποσότητας του διαιτητικού ασβεστίου όταν τα επίπεδα του διαιτητικού φωσφόρου ήταν χαμηλά (Scheld et al., 1996).

#### 1.4.4 Φώσφορος

Ο φώσφορος αποτελεί ένα πολύ σημαντικό ιόν του οργανισμού εφόσον συμβάλλει όσο το ασβέστιο στο σχηματισμό των οστών. Είναι απαραίτητος για τη δομή των κρυστάλλων υδροξυαπατίτη στα οστά. Ο φώσφορος είναι το αναγκαίο μεταλλικό στοιχείο μαζί με το ασβέστιο και τη δράση της βιταμίνης D που χρειάζεται για την ανάπτυξη και τη συντήρηση του ανθρώπινου σκελετού. Εμπλέκεται σε πολλές χημικές αντιδράσεις στο σώμα, ειδικά σε εκείνες που σχετίζονται με την απελευθέρωση και αποθήκευση ενέργειας στον οργανισμό. Το 80% περίπου του φωσφόρου βρίσκεται στα οστά. Η ομοιοστασία του φωσφόρου ρυθμίζεται από τη παραθορμόνη PTH και τη βιταμίνη D (Finkelman and Butler, 1985). Βρίσκεται σε πολλές τροφές όπως στο κρέας, στα ψάρια, στο γάλα, και σε άλλα.





### 1.4.5 Γεννητικές ορμόνες

Τα οιστρογόνα και τα ανδρογόνα αποτελούν τις γεννητικές ορμόνες. Τα οιστρογόνα είναι γυναικείες ορμόνες και επηρεάζουν το ρυθμό με τον οποίο απορροφάται το ασβέστιο από τα οστά. Αμέσως μετά την εμμηνόπαυση, η πτώση των επιπέδων των οιστρογόνων στις γυναίκες προκαλεί γρήγορη απώλεια της οστικής μάζας, ενώ η θεραπευτική αγωγή με οιστρογόνα έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της νεφρικής απώλειας του ασβεστίου και αύξηση της εντερικής του απορρόφησης. Όλες οι θεραπείες πρόληψης της οστεοπόρωσης περιλαμβάνουν λήψη οιστρογόνων ή διάφορους συνδυασμούς οιστρογόνων με άλλες ουσίες. Ωστόσο, οι βασικοί μηχανισμοί δράσης των οιστρογόνων στο σκελετό δεν έχουν προσδιορισθεί με σιγουριά. Από μελέτες που έγιναν σε επίμυες που υποβλήθηκαν σε ωθηκεκτομή και σε αγωγή με οιστρογόνα, υποστηρίζεται ότι είναι πιθανό η λήψη των οιστρογόνων να αυξάνει την εντερική απορρόφηση του ασβεστίου, δρώντας απευθείας στο έντερο (O'Loughlin and Morris, 1998) ή στους εντερικούς υποδοχείς των οιστρογόνων (Chen and Kalu, 1998).

### 1.5 Οστεοπόρωση

Η οστεοπόρωση είναι μια νόσος των οστών κατά την οποία τα οστά γίνονται λεπτότερα και περισσότερο πορώδη και σχετίζεται με τη γήρανση και την εμμηνόπαυση σχήμα 1.4. Αυτό συμβαίνει γιατί η ποσότητα του ασβεστίου των οστών με οστεοπόρωση, βαθμιαία μειώνεται σε τέτοιο βαθμό ώστε, η οστική μάζα μειώνεται, μέχρι το σημείο τα οστά να γίνονται εύθραυστα και επιρρεπή στα κατάγματα. Όμως πολλοί υποστηρίζουν ότι κατά την οστεοπόρωση δεν έχουμε μόνο ποσοτική μεταβολή των οστών αλλά και ποιοτική και ότι οι ποιοτικές μεταβολές στα οστά, είναι αυτές που επηρεάζουν τη μηχανική αντοχή τους



(Λυρίτης, 1991). Βρέθηκαν ποιοτικές μεταβολές των συστατικών του οστίτη ιστού στα σημεία καταγμάτων οστεοπορωτικών ασθενών και συγκεκριμένα μεταβολές στον προσανατολισμό των κρυστάλλων του υδροξυαπατίτη, ενώ ο προσανατολισμός των ινών κολλαγόνου ήταν αμετάβλητος (Kent et al., 1983). Μελέτες που ακολούθησαν επιβεβαίωσαν τα παραπάνω και έδειξαν επιπλέον ότι αυτό το φαινόμενο μπορεί να συμβαίνει όχι μόνο στα σημεία καταγμάτων, αλλά γενικά στην οστεοπόρωση έχουμε ποιοτική αλλοίωση των οστών (Ferris et al., 1987 ; Kounadi et al., 1998). Έτσι το μέγεθος του κρυστάλλου του υδροξυαπατίτη, ο προσανατολισμός των αβερσίων συστημάτων στα φλοιώδη οστά και των οστεοδοκίδων στα σπογγώδη, αν μεταβληθούν, είναι λόγοι που μπορούν να επηρεάσουν τη μηχανική αντοχή των οστών.



Φυσιολογικό οστό

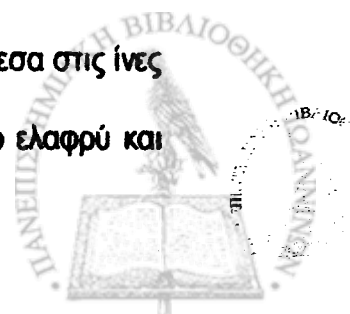
Οστεοπορωτικό οστό

**Σχήμα 1.4:** Η οστεοπόρωση είναι μια ασθένεια κατά την οποία η ποσότητα αλλά και η ποιότητα των οστών μειώνονται, με πιθανή συνέπεια τα κατάγματα (EFFO, web site).

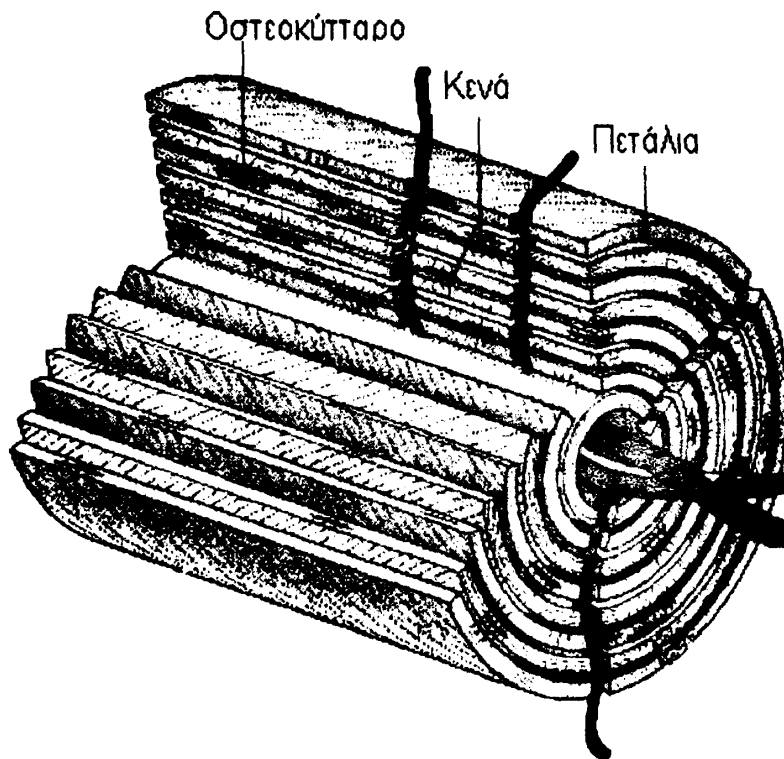


Η ασθένεια της οστεοπόρωσης δεν είναι εμφανής γιατί είναι ανώδυνη, έως τη στιγμή που εκδηλώνεται με αιφνιδιαστικά κατάγματα στην σπονδυλική στήλη, στο γοφό και τον καρπό του χεριού, που είναι και ο πιο κοινός τρόπος εμφάνισής της. Είναι ασθένεια κυρίως των γυναικών και μάλιστα προχωρημένης ηλικίας η οποία προσβάλλει πληθυσμό όλων των κοινωνικών τάξεων, αλλά και όλων των χωρών. Ένας στους οκτώ πολίτες της Ευρωπαϊκής Κοινότητας ηλικίας άνω των 50 ετών, έχει κάταγμα στη σπονδυλική στήλη του. Το εθνικό νοσοκομειακό κόστος για την κοινότητα ξεπερνά τα 3.500 εκατομμύρια ECU το χρόνο, ενώ απασχολούνται 500.000 νοσοκομειακά κρεβάτια το χρόνο (Patraig Flynn, Member of the European Commission-EFFO web site). Αυτά τα νούμερα επιπροσθέτως της γήρανσης του πληθυσμού στην Ευρώπη, προβλέπεται να διπλασιαστούν στα επόμενα 50 χρόνια, αν δε ληφθεί μέριμνα για την αντιμετώπιση και την πρόληψη της ασθένειας. Η οστεοπόρωση έχει εφελιχθεί παγκοσμίως σε ένα σημαντικό πρόβλημα υγείας με σοβαρές οικονομικές και κοινωνικές επιπτώσεις.

Εξετάζοντας τη φυσιολογική πορεία του οστίτη ιστού με το πέρασμα των χρόνων, μπορούμε να την περιγράψουμε ως εξής: Τα οστά ως ζωντανές δομές, αναμορφώνονται συνεχώς. Τα χρόνια που ο οργανισμός αναπτύσσεται, ο σχηματισμός των οστών υπερβαίνει τη διάσπαση και την επαναρρόφησή τους. Κατά την ενηλικίωση, οι διαδικασίες του σχηματισμού και της διάσπασης είναι ίσες, ενώ με το πέρασμα των χρόνων αντιστρέφονται. Η επαναρρόφηση των οστών επικρατεί και έτσι τα οστά γίνονται ασθενέστερα. Εξετάζοντας τώρα τη δομή ενός οστού που έχει προσβληθεί από οστεοπόρωση, θα παρατηρήσουμε ότι κατά το τρίτο ηλικιακό στάδιο η επαναρρόφηση του οστού, ναι μεν επικρατεί του σχηματισμού αλλά γίνεται με ακόμα πιο γρήγορο ρυθμό. Το αποτέλεσμα είναι να δημιουργούνται κενά ανάμεσα στις ίνες του κολλαγόνου, κενά ανάμεσα στα οστέινα πετάλια και το οστό να γίνεται πιο ελαφρύ και



αδύνατο σχήμα 1.5. Οι κυριότερες αιτίες που προκαλούν οστεοπόρωση στις γυναίκες είναι η έλλειψη οιστρογόνων που ακολουθεί μετά την εμμηνόπαυση, η πρόωρη εμμηνόπαυση, η αφαίρεση των ωοθηκών (ωοθηκεκτομή) πριν την ηλικία των 45 ετών. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι, παρά το γεγονός ότι όλες οι μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες έχουν μειωμένα επίπεδα οιστρογόνων, γυναίκες μετεμμηνοπαυσιακές με οστεοπόρωση είναι πιθανό να έχουν κάποιο ελάττωμα στη διατήρηση του ασβεστίου στα νεφρά, το οποίο και συμβάλλει επιπρόσθετα σε μεγαλύτερο ρυθμό οστικής απορρόφησης και είναι η αιτία της οστεοπόρωσής τους (Heshmati et al., 1998).



Οστεοπορωτικό οστό

Σχήμα 2.5: Δομή οστού με οστεοπόρωση. Παρατηρούμε κενά ανάμεσα στα στρώματα των πεταλίων των οστεονίων, που κάνουν το οστό πιο αδύνατο (American Medical Association, 1991).



Άλλοι παράγοντες που ενθαρρύνουν την εμφάνιση της νόσου είναι:

Οικογένεια με ιστορικό στην ασθένεια, ο αλκοολισμός, το κάπνισμα, οι κακές διατροφικές συνήθειες, η δίαιτα που είναι χαμηλή σε ασβέστιο, η έντονη αθλητική δραστηριότητα, σε σημείο που να προκαλεί την παύση της έμμηνου ρύσης, η έλλειψη σωματικής άσκησης, οι ορμονικές ανωμαλίες όπως υπερθυρεοειδισμός, υπερπαραθυροειδισμός, οι φαρμακευτικές αγωγές με κορτικοστεροειδή και η μικρή σωματική διάπλαση. Η νόσος εμφανίζεται και στον ανδρικό πληθυσμό, αλλά όχι τόσο συχνά και συνήθως οφείλεται στην έλλειψη των ανδρικών ορμονών (τεστοστερόνης) και σε χρόνια αλκοολισμό.

Η διάγνωση της οστεοπόρωσης βασίζεται στη μέτρηση της πυκνότητας των οστών με ακτίνες X. Η πιο κοινή και αξιόπιστη μέθοδος είναι το DEXA τεστ (dual energy X-ray absorptiometry).

Επειδή η οστεοπόρωση είναι δύσκολο να αναστραφεί πλήρως με θεραπεία, η πρόληψή της είναι η καλύτερη αγωγή για την αντιμετώπισή της και μπορεί να επιτευχθεί με ειδική διατροφή, σωματική άσκηση και γενικά έναν υγιεινό τρόπο ζωής.



## 1.6 Ειδική διατροφή

Δίαιτα πλούσια σε ασβέστιο μαζί με βιταμίνη D, είναι απαραίτητη για την καλή υγεία των οστών. Ο ρόλος της βιταμίνης D είναι καθοριστικός, γιατί βοηθά στην καλή εντερική απορρόφηση του ασβεστίου. Η επαρκής λήψη ασβεστίου κατά την παιδική και εφηβική ηλικία είναι ίσως το καλύτερο μέτρο πρόληψης, ενώ επίσης σημαντική είναι η επαρκής λήψη ασβεστίου μεταξύ 18 και 30 ετών όπου έχουμε την ανάπτυξη της μέγιστης οστικής πυκνότητας για τον οργανισμό. Οι γιατροί συνιστούν ότι οι ενήλικες χρειάζονται 800-1000mg ασβεστίου και τουλάχιστον 400 μονάδες βιταμίνης D καθημερινά, ενώ η ανεπαρκής λήψη του οδηγεί σε οστεοπόρωση. Οι ανάγκες σε ασβέστιο είναι μεγαλύτερες στις γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση και η κατάλληλη ποσότητα είναι 1000-1200mg ασβεστίου καθημερινά ή και περισσότερο. Βέβαια οι γυναίκες πρέπει να φροντίσουν κατά τη διάρκεια της ζωής τους να λαμβάνουν καθημερινά επαρκή ποσότητα ασβεστίου, ώστε όταν φθάσουν στην εμμηνόπαυση, τα οστά τους να έχουν ήδη καλή οστική πυκνότητα.

Έγινε μια ανάλυση των πιο σημαντικών πειραμάτων που έγιναν τα τελευταία 20 χρόνια, πάνω στη σημασία της εμπλουτισμένης με ασβέστιο διατροφής, σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο μέσος ρυθμός απώλειας οστικής μάζας σε γυναίκες με διατροφή εμπλουτισμένη με ασβέστιο, ήταν 0.014% ανά χρόνο, ενώ 1.00% ανά χρόνο, σε γυναίκες με κανονική διατροφή (Nordin , 1997). Άλλες μελέτες έδειξαν ότι η εφαρμογή δίαιτας πλούσιας σε ασβέστιο σε φυσιολογικές μετεμμηνόπαυσιακές γυναίκες που είχαν καθημερινό διαιτολόγιο είτε φτωχό είτε πλούσιο σε ασβέστιο, είχε σαν αποτέλεσμα σημαντική ελάτωση της οστικής απώλειας (Reid et al., 1993). Η θετική επίδραση της εμπλουτισμένης δίαιτας σε ασβέστιο στην πρόληψη της οστεοπόρωσης, επιβεβαιώνεται και από πειράματα σε επίμυες που υποβλήθηκαν σε ωθηκεκτομή και σε δίαιτα εμπλουτισμένη με

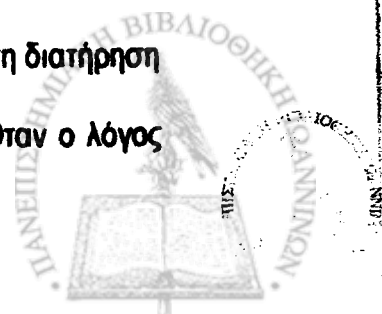


ασβέστιο. Η επιπλέον λήψη ασβεστίου σταματά τη μεγάλη απώλεια οστικής μάζας, μειώνοντας την οστεοκλαστική δραστηριότητα (Tan et al., 1995). Αντιθέτως, σε επίμυες που υποβλήθηκαν σε ωθηκεκτομή, διαίτα φτωχή σε ασβέστιο, είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση των μεταλλικών συστατικών των οστών, ενώ είχαμε αύξησή τους όταν εφαρμόστηκε διαίτα πλούσια σε βιταμίνη D (Matsumoto et al., 1985).

Επίσης βασική είναι η επισήμανση, ότι η δράση του ασβεστίου είναι πιο αποτελεσματική στη διατήρηση της οστικής μάζας σε καλά επίπεδα, στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, όταν συνδυάζεται με λήψη επαρκούς ποσότητας βιταμίνης D (Nordin et al., 1997 ; O' Brien , 1998) ή και ακόμα μπορεί να προκαλέσει και αύξησή της (Baeksgaard et al., 1998), ενώ για κάποιους ερευνητές, η ιδανική ποσότητα ασβεστίου στις συγκεκριμένες περιπτώσεις, είναι σημείο περαιτέρω έρευνας (Storm et al., 1998). Πράγματι μελέτες που έγιναν σε επίμυες που υποβλήθηκαν σε ωθηκεκτομή, έδειξαν ότι ο συνδυασμός λήψης ασβεστίου και βιταμίνης D αύξησε την οστική μάζα, ενώ η δράση του ασβεστίου από μόνο της δεν είχε θεραπευτικό αποτέλεσμα (Erben et al., 1998).

Αντιφατικές απόψεις για τη δράση του ασβεστίου από μόνη του συναντάμε και σε άλλους μελετητές που εφάρμοσαν διαίτα εμπλουτισμένη σε ασβέστιο. Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι δεν έχουμε μεταβολές στην οστική πυκνότητα, σε γυναίκες αμέσως μετά την εμμηνόπαυση (Stevenson et al., 1988).

Επίσης εκτός από τη θετική παρουσία της βιταμίνης D στο μεταβολισμό του ασβεστίου, εξίσου σημαντική είναι η λήψη σωστής ποσότητας φωσφόρου στην καθημερινή διαίτα. Ο λόγος Ca:P στη διατροφή, διαφαίνεται να είναι ένας σημαντικός παράγοντας στη διατήρηση της οστικής πυκνότητας στις εμμηνοπαυσιακές γυναίκες (Lukert et al., 1987). Όταν ο λόγος



Ca:P λόγω διαφόρων διαιτητικών συνηθειών γίνει 1:2, υπάρχει κίνδυνος αυξημένης οστικής απώλειας (Caivo , 1993). Συμπερασματικά, η δράση του ασβεστίου στην οστεοπόρωση είναι αποτελεσματική όταν συνοδεύεται από διαίτα χαμηλή σε φώσφορο (Drafer and Scythes, 1981).

Ένας ιδανικός διαιτητικός συνδυασμός για την πρόληψη ή τη βελτίωση της οστεοπόρωσης διαφαίνεται να είναι μια διατροφή εμπλουτισμένη σε ασβέστιο, φώσφορο και βιταμίνη D , με το ποσοστό όμως του φωσφόρου να μην ξεπερνάει αυτό του ασβεστίου. Ένας τέτοιος συνδυασμός εφαρμόστηκε σε οστεοπορωτικές γυναίκες μεγάλης ηλικίας και το αποτέλεσμα ήταν να αυξηθεί η οστική πυκνότητά τους ( Lee et al., 1981).

## 1.7 Ωοθηκεκτομή

Η προκλητή οστεοπόρωση με ωοθηκεκτομή έχει όλα τα χαρακτηριστικά της μεταεμμηνοπαυτικής οστεοπόρωσης. Τα οιστρογόνα είναι ορμόνες που έχουν σημαντική επίδραση στον οστικό μεταβολισμό. Όταν μετά την ωοθηκεκτομή σταματήσει η έκκρισή τους, παρατηρείται μείωση της οστικής μάζας του ανθρώπινου οργανισμού.

Στους επιστημονικούς κύκλους το μοντέλο των επίμυων που υποβλήθηκαν σε ωοθηκεκτομή, θεωρείται το πιο κατάλληλο μοντέλο ζώου για τη μελέτη της παθογένεσης και θεραπείας της απώλειας οστικής μάζας μετά την εμμηνόπαυση και γενικά της οστεοπόρωσης στους ανθρώπους (Yamazaki and Yamaguchi, 1989 ; Anderson ,1990 ; Kalu ,1991 ; Dick et al., 1996). Αν και σε σύγκριση με τον ανθρώπινο οργανισμό, η σκελετική μάζα των επίμυων είναι ίδια για ένα μακρό διάστημα της ζωής τους, όταν υποβάλλονται σε ωοθηκεκτομή και έτσι σε



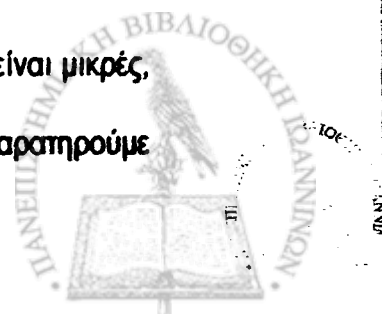


μείωση των γεννητικών ορμονών τους, υφίστανται οστική απώλεια ίδια με εκείνη που λαμβάνει χώρα στις γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση. Η οστική απώλεια των γυναικών λόγω εμμηνόπαυσης και αυτή των επίμυων λόγω ωθηκεκτομής έχουν κάποια κοινά χαρακτηριστικά. Παρατηρείται έντονη αναδιοργάνωση του οστού, με την οστική απώλεια να υπερβαίνει το σχηματισμό του οστού. Αρχικά, ο ρυθμός οστικής απώλειας είναι πιο γρήγορος, ενώ με το χρόνο γίνεται αργότερος και η απώλεια του πορώδους οστού είναι μεγαλύτερη από αυτή του φλοιώδους. Η εντερική απορρόφηση του ασβεστίου είναι μειωμένη.

Μελέτη που εξέτασε τις επιπτώσεις της γήρανσης και της ωθηκεκτομής στα οστά, επιβεβαίωσε τα παραπάνω. Εξετάστηκαν επίμυες με ωθηκεκτομή και φυσιολογικά ζώα ίδιας ηλικίας. Εκτός από την απώλεια του πορώδους οστού στους επίμυες με ωθηκεκτομή με τους ρυθμούς που αναφέραμε παραπάνω, απώλεια πορώδους οστού παρατηρήθηκε και στα φυσιολογικά ζώα με τη γήρανση (ηλικίας 21 μηνών), ενώ και στις δύο περιπτώσεις παρατηρήθηκε έντονη αναδιοργάνωση των οστών (Wronski et al., 1989).

Έτσι γενικά η αφαίρεση των ωθηκών σε επίμυες, χαρακτηρίζεται από λέπτυνση των οστεοδοκίδων και μείωση του όγκου του πορώδους οστού (Wronski et al., 1985 ; 1986 ; Kalu et al., 1989 ; Kalu, 1991 ; Miller et al., 1991 ; Miller and Wronski, 1993 ; Iwamoto et al., 1998 ; Erben et al., 1998 ; Dick et al., 1996), αύξηση των οστεοβλαστών και οστεοκλαστών, και μείωση του ασβεστίου και φωσφόρου στα οστά (Tan et al., 1995).

Τα αποτελέσματα των διαφόρων ερευνητών δεν είναι πάντα σύμφωνα ως προς την έκταση της οστικής απώλειας στα ζώα, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στις διαφορετικές ηλικίες των ζώων που χρησιμοποιούνται και το χρονικό διάστημα μετά την ωθηκεκτομή που πάρθηκαν οι μετρήσεις. Η ωθηκεκτομή είναι αποτελεσματική στα ερευνητικά μοντέλα των επίμυων όταν γίνεται σε ηλικία τουλάχιστον 4 εβδομάδων, ενώ οι επιπτώσεις της είναι μικρές, όταν γίνει σε επίμυες προχωρημένης ηλικίας. Μείωση της οστικής μάζας δεν παρατηρούμε



αμέσως μετά την ωθηκεκτομή αλλά όταν περάσει κάποιο χρονικό διάστημα (Yamazaki and Yamaguchi, 1989). Όσο μεγαλύτερο είναι το χρονικό διάστημα μετά την ωθηκεκτομή, τόσο πιο έντονες είναι οι αλλοιώσεις του πορώδους οστού (Miller and Wronski, 1993).

Η επιλογή της ηλικίας των επίμυων είναι τόσο σημαντική, για να έχει τα επιθυμητά αποτελέσματα η ωθηκεκτομή, όσο και το είδος και το τμήμα του οστού που επιλέχθηκε για να μελετηθούν οι συνέπειες της οστεοπόρωσης. Η σπονδυλική στήλη και η μετάφυση της κνήμης των επίμυων είναι ιδανική επιλογή οστών, αφού περιέχουν κυρίως πορώδες οστό, η οστική μάζα του οποίου μεταβάλλεται κατά την ωθηκεκτομή, σε αντίθεση με το φλοιώδες, η οστική μάζα του οποίου δε μεταβάλλεται σχεδόν καθόλου (Omi and Ezawa, 1995).

Μετρήσεις του ορού του αίματος σε επίμυες που υποβλήθηκαν σε ωθηκεκτομή, έδειξαν ότι τα επίπεδα της PTH και της  $1,25(OH)_2D$  παραμένουν αμετάβλητα (Kalu et al., 1989 ; O' Loughlin and Morris, 1998 ; Dick et al., 1998).



## 1.8 Κολλαγόνο

### 1.8.1 Εισαγωγή

Μελετώντας τις επιπτώσεις της νόσου της οστεοπόρωσης στο κολλαγόνο του δέρματος και των οστών επίμυων και ανιχνεύοντας τυχόν διαταραχές στη μοριακή δομή του κολλαγόνου ή και στη διάταξη των ινιδίων του, μπορούμε να δώσουμε κάποια χρήσιμα συμπεράσματα για τη μελέτη και ίαση αυτής της νόσου, καθώς το κολλαγόνο είναι το βασικό συστατικό του δέρματος και των οστών.

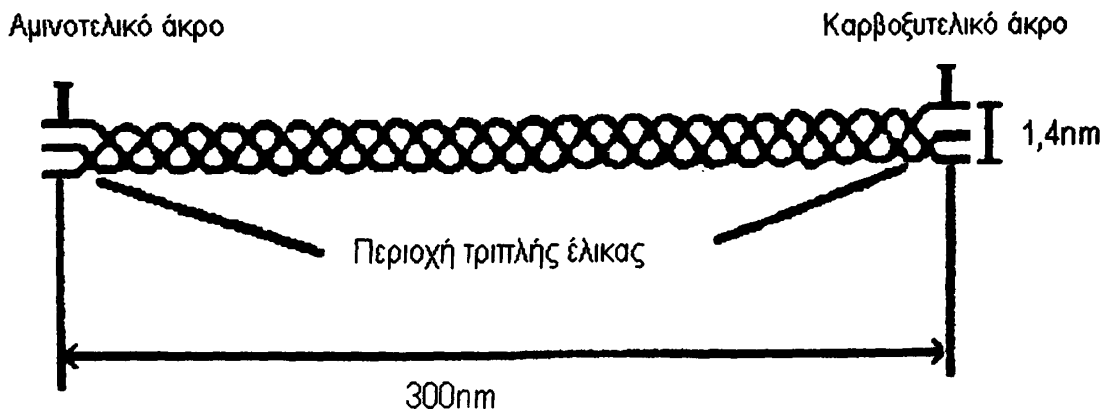
Το κολλαγόνο και τα διάφορα είδη του είναι μία οικογένεια ινωδών πρωτεϊνών που εμφανίζεται σε όλους τους πολυκύτταρους οργανισμούς. Είναι η πιο άφθονη πρωτεΐνη των θηλαστικών και αποτελεί το ένα τέταρτο της συνολικής πρωτεΐνης του ανθρώπινου οργανισμού. Το κολλαγόνο είναι το βασικό ινώδες συστατικό του δέρματος, των οστών, των τενόντων, του χόνδρου, των αγγείων και των δοντιών. Υπάρχει σε όλα σχεδόν τα όργανα των θηλαστικών και είναι ένα μακρομόριο το οποίο εμφανίζει την ιδιαιτερότητα να φτιάχνει αδιάλυτες ίνες με μεγάλη αντοχή στον εφελκυσμό. Ο ρόλος του στον οργανισμό είναι βασικά δομικός. Δίνει αντοχή και διατηρεί την ακεραιότητα της δομής του συνδετικού ιστού και των οργάνων του σώματος. Βρίσκεται μέσα στο συνδετικό ιστό όχι σαν απομονωμένο μόριο, αλλά ως συστατικό του πολύπλοκου συστήματος του ιστού, που περιλαμβάνει και διάφορα άλλα μακρομόρια όπως ελαστίνη, γλυκοπρωτεΐνες και γλυκολιπίδια. Χρησιμεύει για να συγκρατεί τα κύτταρα σε ευδιάκριτες λειτουργικές κυτταρικές ομάδες.



### 1.8.2 Μονοδιάστατη δομή του κολλαγόνου

Το κολλαγόνο είναι μια από τις πιο γνωστές επιμήκεις πρωτεΐνες. Η βασική δομική μονάδα του κολλαγόνου αποτελείται από τρεις παράλληλες πολυπεπτιδικές α-αλυσίδες, δηλαδή αλυσίδες που έχουν ελικοειδή διαμόρφωση. Οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες εκτείνονται σε όλο το μήκος του μορίου και έχουν τα αμινοτελικά άκρα τους στην ίδια πλευρά (Piez, 1967).

Οι τρεις αλυσίδες ελίσσονται μεταξύ τους με τη μορφή τριπλής έλικας, βήματος 9nm περίπου, σχηματίζοντας ένα άκαμπτο καλώδιο και κάνοντας την ανθεκτικότητα του κολλαγόνου πολύ μεγάλη. Με αυτό τον τρόπο, σχηματίζεται ένα μόριο που μοιάζει με ράβδο, μήκους 300nm περίπου, διαμέτρου 1,4nm, 3,3 αριθμό αμινοξέων ανά περιστροφή της έλικας και μοριακού βάρους 300000.



Σχήμα 1.6: Διαγραμματική αναπαράσταση του μορίου του κολλαγόνου (Τζαφλίδου, 1983).

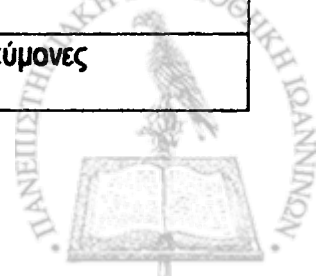


Το μέγεθος και η σύνθεση των αλυσίδων εξαρτάται από τον τύπο του κολλαγόνου. Οι ζώντες οργανισμοί περιέχουν διάφορες μορφές κολλαγόνου που κατατάσσονται σε πάνω από δώδεκα χαρακτηριστικούς τύπους, των οποίων η μοριακή δομή και η κατανομή στο σώμα φαίνονται στον πίνακα 1.3 (Tryggvason, 1995). Πιο πολύ έχει μελετηθεί το κολλαγόνο τύπου I, γιατί είναι ο πιο συχνά εμφανιζόμενος τύπος στα ανώτερα σπονδυλωτά. Το μόριο του κολλαγόνου τύπου I αποτελείται από δυο ίδιες α1(I) αλυσίδες και μια α2 (I) αλυσίδα η οποία έχει διαφορετική αλληλουχία αμινοξέων (Traub and Piez, 1971). Οι άλλοι τύποι κολλαγόνου όπως ο τύπος III έχουν τρεις ίδιες αλυσίδες, ενώ ο τύπος V μπορεί να περιέχει και δυο διαφορετικές αλυσίδες (Bornstein and Byers, 1980).



Πίνακας 1.3: Μοριακή δομή και κατανομή στο σώμα των διαφόρων τύπων κολλαγόνου.

Τύπος κολλαγόνου	Πολυπεπτιδικές αλυσίδες	Κατανομή στο σώμα
I	α1(I),α2(I)	Δέρμα, τένοντες, οστά, κ.λ.π.
II	α1(II)	Χόνδρος
III	α1(III)	Μεγάλα αγγεία αίματος
IV	α1(IV),α2(IV),α3(IV),α4(IV), α5(IV),α6(IV)	Βασική μεμβράνη
V	α1(V),α2(V),α3(V)	Εμβρυϊκές μεμβράνες
VI	α1(VI),α2(VI),α3(VI)	Δέρμα, χόνδρος, αγγεία
VII	α1(VII)	Μεμβράνη του επιθηλιακού ιστού
VIII	α1(VIII),α2(VIII)	Descemet's μεμβράνη
IX	α1(IX),α2(IX),α3(IX)	Χόνδρος, υαλοειδές υγρό οφθαλμού
X	α1(X)	Οδοντοστοιχία
XI	α1(XI),α2(XI),α3(XI)	Χόνδρος, οστά, πλακούντας
XII	α1(XII)	Δέρμα, εμβρυϊκός τένοντας
XIII	α1(XIII)	Διάφοροι ιστοί
XIV	α1(XIV)	Εμβρυϊκό δέρμα και τένοντες
XV	α1(XV)	Ινοβλάστες
XVI	α1(XVI)	Ινοβλάστες
XVII	α1(XVII)	Επιθηλιακά ημιδεσμοσώματα
XVIII	α1(XVIII)	Ήπαρ, πνεύμονες

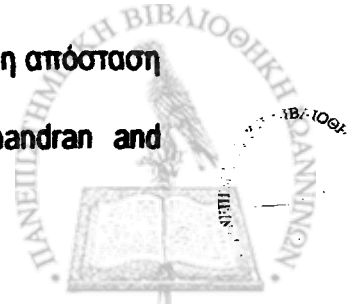


### 1.8.3 Αλληλουχία αμινοξέων στις αλυσίδες του κολλαγόνου

Η αλληλουχία των αμινοξέων του κολλαγόνου έχει μελετηθεί εκτεταμένα. Το κολλαγόνο χαρακτηρίζεται από την ιδιαίτερη σύστασή του αλλά και την ασυνήθιστη αλληλουχία που έχουν τα αμινοξέα του. Περιέχει δυο αμινοξέα τα οποία είναι σπάνια για τις άλλες πρωτεΐνες, την υδροξυπρολίνη (Hyp) και την υδροξυλυσιίνη (Hyl), ενώ το ποσοστό της γλυκίνης (Gly) είναι ιδιαίτερα υψηλό. Τα αμινοξέα που συναντάμε πιο συχνά στις αλυσίδες του κολλαγόνου είναι η γλυκίνη, η προλίνη, η αλανίνη και η υδροξυπρολίνη.

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των αμινοξέων του κολλαγόνου, αποτέλεσε για τους επιστήμονες μια δύσκολη εργασία, λόγω του μεγάλου μήκους των α-αλυσίδων του. Για να προσδιορίσουν την ακριβή σύσταση της κάθε αλυσίδας τις διαχώρισαν και εξέτασαν κάθε μια ξεχωριστά. Οι πιο εποικοδομητικές μελέτες ήταν εκείνες που χρησιμοποίησαν βρωμιούχο κυάνιο (Gross and Witkop, 1961) ή υδροξυλαμίνη (Bornstein, 1970) ή ορισμένα ένζυμα όπως η πεψίνη (Wendt et al., 1972) για τη διάσπαση των α-αλυσίδων σε τεμάχια, με σκοπό τον προσδιορισμό των αμινοξέων τους. Η σειρά των αμινοξέων για τις α-αλυσίδες του κολλαγόνου τύπου I, έχει καθοριστεί πλήρως με τη βοήθεια κολλαγόνου δέρματος μόσχου, ενώ τα κενά συμπληρώθηκαν χρησιμοποιώντας ομόλογες σειρές αμινοξέων από δέρμα ποντικού και για την α2-αλυσίδα από δέρμα όρνιθας (Charman et al., 1981).

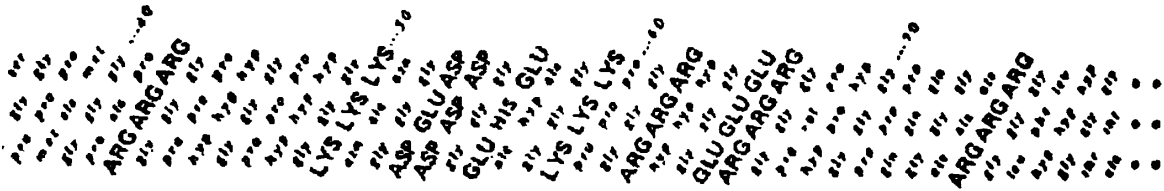
Η α1(I) αλυσίδα του περιέχει 1055 αμινοξέα εκ των οποίων τα 1014 βρίσκονται στην περιοχή της τριπλής έλικας και επαναλαμβάνονται με τη μορφή Gly-X-Y, τα 16 στο αμινοτελικό άκρο και τα 25 στο καρβοξυτελικό. Η α2(I) αλυσίδα του περιέχει 1029 συνολικά αμινοξέα με λιγότερα στο αμινοτελικό και στο καρβοξυτελικό άκρο της. Η απόσταση D, είναι η απόσταση μεταξύ των αμινοξέων σε αξονική διεύθυνση και είναι  $D=0,29\text{nm}$  (Ramachandran and



Ramakrishnam, 1976). Στο σχήμα 1.7 φαίνεται διαγραμματικά η αλληλουχία των αμινοξέων των τριών α-αλυσίδων, σε περιοχή της τριπλής έλικας, σε μόριο κολλαγόνου τύπου Ι από δέρμα μόσχου. Τα αμινοξέα με τα έντονα κεφαλαία γράμματα είναι ηλεκτρικά φορτισμένα.

Η σειρά των αμινοξέων για τις αλυσίδες α1(II) και α1(III) έχει καθοριστεί πλήρως.

Στο μόριο του κολλαγόνου μπορούμε να διακρίνουμε την περιοχή όπου οι α-αλυσίδες σχηματίζουν την τριπλή έλικα και τις περιοχές στα άκρα του μορίου, τα τελοπεπτιδία, τα οποία έχουν διαφορετική δομή.



**Σχήμα 1.7:** Αλληλουχία των αμινοξέων για ένα μικρό τμήμα της τριπλής αλυσίδας του κολλαγόνου τύπου Ι δέρματος μόσχου (Charman et al., 1990).

#### 1.8.4 Περιοχές της τριπλής έλικας

Το κολλαγόνο μπορεί να θεωρηθεί ως πολυμερής ουσία που αποτελείται από τριπεπτιδικές μονάδες του γενικού τύπου Gly-X-Y (Grant and Prockop, 1972 ; Fietzek and Kuhn, 1976). Κάθε



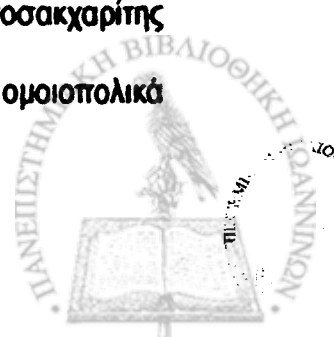


τρίτο αμινοξύ κατά μήκος της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, εκτός από μικρές περιοχές στο τέλος των αλυσίδων, είναι γλυκίνη, ενώ συχνά συναντάμε την αλληλουχία Gly-Pro-Hyp.

Η γλυκίνη είναι ένα αμινοξύ με τη μικρότερη πλάγια αλυσίδα ( $R=H$ ), γι' αυτό το λόγο μπορεί να είναι τοποθετημένη στο κέντρο της τριπλής έλικας της αλυσίδας του κολλαγόνου (Ramachandran and Kartha, 1955 ; Rick and Crick, 1955). Στο εσωτερικό της τριπλής έλικας υπάρχει λίγος χώρος και επειδή υπάρχουν 3 αμινοξέα ανά στροφή έλικας, το μόνο αμινοξύ που χωράει σε μια εσωτερική θέση είναι η γλυκίνη. Έτσι κάθε τρίτο αμινοξύ σε κάθε αλυσίδα του κολλαγόνου, είναι η γλυκίνη. Η γλυκίνη είναι πολύ σημαντικό αμινοξύ γιατί επιτρέπει στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες να πλησιάζουν κοντά η μια στην άλλη.

Το αμινοξύ στη θέση X μετά τη γλυκίνη, είναι συχνά προλίνη. Μόνο στο κολλαγόνο τύπου III στη θέση X, συναντάμε και τη γλυκίνη.

Στη θέση Y συνήθως βρίσκεται η υδροξυπρολίνη. Η υδροξυπρολίνη καθώς και η προλίνη είναι ιμινοξέα, εμφανίζονται στα σημεία κάμψης των πρωτεϊνικών αλυσίδων και ευνοούν το σφικτό στρίψιμό τους. Τα υδροξυλιωμένα τμήματα της υδροξυπρολίνης σχηματίζουν ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου, οι οποίοι βοηθούν στο να κρατηθούν μαζί οι 3 αλυσίδες και να σταθεροποιηθεί η τριπλή έλικα (Bornstein and Byers, 1980). Στο μόριο του κολλαγόνου στη θέση Y υπάρχει και ένα μικρό ποσοστό υδροξυλυσίνης (συνήθως στο κολλαγόνο του δέρματος και των μεμβρανών). Το αμινοξύ αυτό παίρνει μέρος στους χιαστούς δεσμούς μέσα και ανάμεσα στα μόρια του κολλαγόνου (Barnes et al., 1974) και είναι σημείο προσάρτησης των υδρογονανθράκων του κολλαγόνου. Οι υδρογονάνθρακες είναι ο μονοσακχαρίτης γαλακτόζη και ο δισακχαρίτης γλυκόζη-γαλακτόζη. Οι υδρογονάνθρακες είναι ομοιοπολικά



συνδεδεμένοι με τις υδροξυλυσίνες. Η προλίνη και η υδροξυπρολίνη αποτελούν το 20% έως το 25% του ολικού αριθμού των αμινοξέων.

Η σταθερότητα της τριπλής έλικας εξασφαλίζεται από τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των τριών αλυσίδων. Δότες υδρογόνου είναι οι αμινομάδες (NH) της γλυκίνης της μιας αλυσίδας και δέκτες οι καρβοξυλομάδες (CO) της άλλης αλυσίδας. Η κατεύθυνση των δεσμών υδρογόνου είναι κάθετη στον κεντρικό άξονα της ράβδου του κολλαγόνου. Σημαντική ποσότητα νερού είναι συνδεδεμένη με τη δομή του κολλαγόνου (Fung and Wie ,1973 ; Luescher et al. ,1974). Τα μόρια του νερού μπορούν να σταθεροποιήσουν τη μοριακή δομή του κολλαγόνου, σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου, με διάφορες καρβοξυλομάδες ή αμινομάδες που δεν έχουν περιληφθεί στους κατευθείαν δεσμούς υδρογόνου (Traub and Yonath,1966 ; Ramachandran and Chandrasekharan, 1968).

#### 1.8.5 Μη ελικοειδείς περιοχές στο μόριο του κολλαγόνου

Τα τελοπεπτιδία είναι μικρές περιοχές και στα δυο άκρα των α αλυσίδων και αποτελούν το 4% περίπου ολόκληρου του μορίου του κολλαγόνου. Σε αυτά η γλυκίνη δεν εμφανίζεται σε κάθε τρίτη θέση και επομένως οι περιοχές αυτές δεν έχουν ελικοειδή μορφή. Χαρακτηριστικό των τελοπεπτιδίων είναι η παρουσία μιας λυσίνης η οποία όταν οξειδωθεί από το ένζυμο οξειδάση μπορεί να δράσει ως χαρακτηριστική ομάδα για το σχηματισμό χιαστών δεσμών μέσα και ανάμεσα στα μόρια (Gallor et al., 1973).



### 1.8.6 Βιοσύνθεση του κολλαγόνου

Τα κύτταρα που παράγουν κολλαγόνο είναι οι ινοβλάστες, οι οστεοβλάστες, οι χονδροβλάστες και οι οδοντοβλάστες. Το κολλαγόνο δημιουργείται ενδοκυτταρικά από μια σειρά αντιδράσεων (Bornstein , 1974 ; Fessler and Fessler,1978). Πρώτα σχηματίζονται οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες και στη συνέχεια γίνεται η υδροξυλίωση της προλίνης και της λυσίνης. Αυτό γίνεται γιατί η υδροξυπρολίνη και η υδροξυλυσίνη δεν προστίθενται στην πολυπεπτιδική αλυσίδα με το συνηθισμένο τρόπο πρωτεϊνοσύνθεσης. Στις υδροξυλυσίνες που δημιουργήθηκαν προστίθενται ενζυμικά, σάκχαρα όπως η γλυκόζη και γαλακτόζη. Οι υδατάνθρακες αυτοί συνδέονται ομοιοπολικά με το κολλαγόνο.

Αφού οι ανώριμες πολυπεπτιδικές αλυσίδες υδροξυλιώνονται και γλυκοξυλιώνονται, τότε σχηματίζεται η τριπλή έλικα. Το προϊόν της σύνθεσης αυτής ονομάζεται προκολλαγόνο και είναι μια πρωτεΐνη αρκετά μεγαλύτερη από το κολλαγόνο. Η σύνθεση του προκολλαγόνου γίνεται στα ριβοσωμάτια και είναι το πρόδρομο μόριο του κολλαγόνου.

Οι δέσμες του προκολλαγόνου εκκρίνονται στον εξκυττάριο χώρο όπου οι πρωτεάσες κόβουν τα μη ελικοειδή άκρα που είναι χαρακτηριστικά για το προκολλαγόνο. Τα μόρια του κολλαγόνου που προκύπτουν συγκροτούνται σε σειρές μετατοπισμένες η μια προς την άλλη και δίνουν τις ίνες του κολλαγόνου, οι οποίες συναθροίζονται και σχηματίζουν τα ινίδια. Εδώ σχηματίζονται και οι χιαστοί δεσμοί. Το ασυνήθιστο χαρακτηριστικό που έχει το κολλαγόνο σε σχέση με άλλες πρωτεΐνες είναι το ότι συντίθεται από έναν πρόδρομο, το προκολλαγόνο το οποίο υφίστανται μια σειρά από τροποποιήσεις για να σχηματιστεί το τελικό μόριο που είναι το κολλαγόνο.



### 1.8.7 Προκολλαγόνο

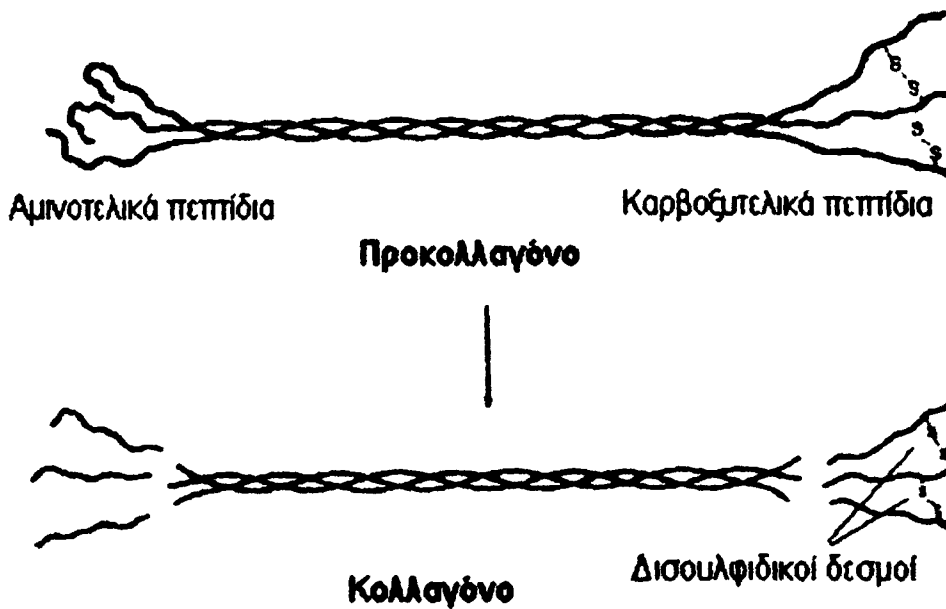
Οι τρεις αλυσίδες του προκολλαγόνου (προ α-αλυσίδες) είναι μακρύτερες από τις α αλυσίδες του κολλαγόνου γιατί περιέχουν πρόσθετα πεπτιδία στα αμινοτελικά άκρα τους.

Τα μη ελικοειδή αμινοτελικά άκρα ξεχωρίζουν από τα καρβοξυτελικά, επειδή περιέχουν δισουλφιδικούς δεσμούς μέσα στην ίδια την αλυσίδα. Επίσης είναι δομικά πιο πολύπλοκα καθώς περιέχουν ένα τμήμα μικρής τριπλής έλικας, σφαιρικές περιοχές και ένα μικρό μη ελικωτό τμήμα αμινοξέων. Οι μη ελικωτές προεκτάσεις του μορίου του προκολλαγόνου είναι πιθανό να παίζουν καθοριστικό ρόλο στην πορεία εξέλιξης και δημιουργίας του τελικού μορίου. Οι ελικωτές προεκτάσεις μπορεί να είναι απαραίτητες για την ευθυγράμμιση των αλυσίδων και το σωστό σχηματισμό της τριπλής έλικας.

### 1.8.8 Σύνθεση του κολλαγόνου

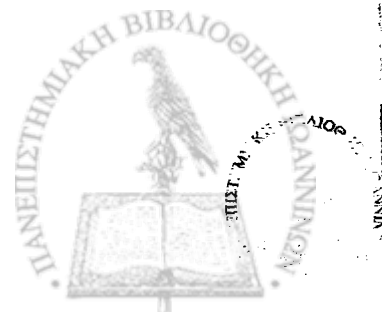
Το προκολλαγόνο εκκρίνεται στον εξωκυττάριο χώρο, όπου οι προ α-αλυσίδες διασπώνται από ειδικές πρωτεάσες που λέγονται πεπτιδάσες. Για κάθε τύπο κολλαγόνου υπάρχει μια για το αμινοτελικό άκρο και μια άλλη για το καρβοξυτελικό άκρο. Στο καρβοξυτελικό άκρο τα τρία πεπτιδία αποσπώνται ως ένα, για να δώσουν το μόριο του κολλαγόνου επειδή συνδέονται με δισουλφιδικούς δεσμούς (σχήμα 1.8).

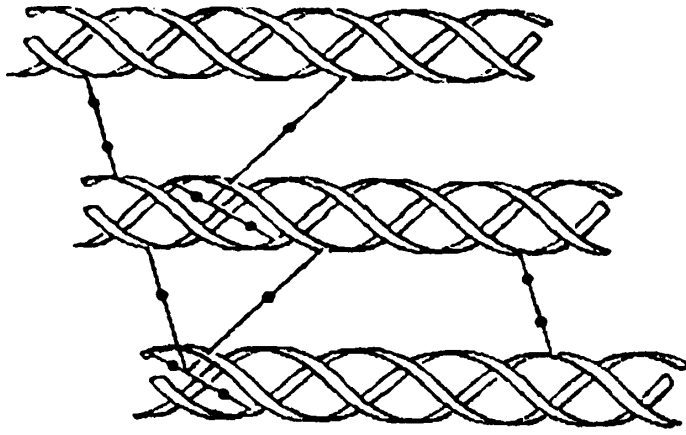




**Σχήμα 1.8:** Σχηματικό διάγραμμα της μετατροπής του προκολλαγόνου σε κολλαγόνο. Οι καρβοξυτελικές περιοχές των τριών αλυσίδων προκολλαγόνου συνδέονται με δισουλφιδικούς δεσμούς (Stryer, 1990).

Τα μόρια κολλαγόνου που σχηματίζονται, συγκεντρώνονται σε ίνες κολλαγόνου. Η διεργασία σταθεροποίησης του κολλαγόνου γίνεται στα νεοσχηματιζόμενα ινίδια, με το σχηματισμό των χιαστών δεσμών (cross links). Οι χιαστοί δεσμοί είναι ομοιοπολικοί δεσμοί, δημιουργούνται τόσο μέσα στις αλυσίδες, όσο και ανάμεσα στα γειτονικά μόρια του κολλαγόνου και σχηματίζονται από τα αμινοξέα της λυσίνης και της υδροξυλυσίνης. Με αυτόν τον τρόπο οι αλυσίδες και τα γειτονικά μόρια συνδέονται μεταξύ τους και σχηματίζεται ένα πλέγμα το οποίο αυξάνει την αντοχή και τη χημική αντίσταση του κολλαγόνου (σχήμα 1.9).





**Σχήμα 1.9:** Σχηματική αναπαράσταση των χιαστών δεσμών μέσα στις αλυσίδες και ανάμεσα στα μόρια του κολλαγόνου (Τζαφλίδου, 1983).

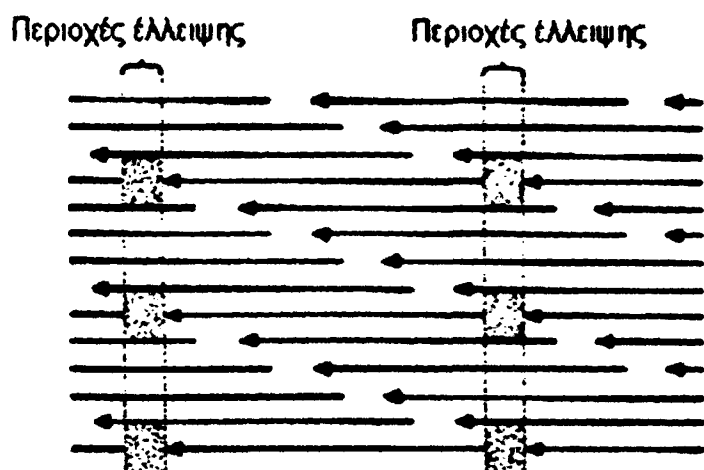
Οι ενδομοριακές διασυνδέσεις προέρχονται από τις πλευρικές αλυσίδες της λυσίνης, οι οποίες δεν ανήκουν στην ελικοειδή περιοχή και βρίσκονται κοντά στο αμινοτελικό άκρο.

Οι διασυνδέσεις μεταξύ διαφορετικών μορίων δημιουργούνται από τη συνένωση δυο καταλοίπων υδροξυλυσίνης και ενός καταλοίπου λυσίνης. Στη διασύνδεση αυτού του είδους μπορούν να συμμετέχουν από κάθε μόριο κολλαγόνου 4 κατάλοιπα αμινοξέων. Δύο λυσίνες κοντά στο αμινοκαρβοτελικό άκρο και δυο υδροξυλυσίνες στις ελικοειδής περιοχές, κοντά στα άκρα του μορίου του κολλαγόνου. Συνδέεται το αμινοτελικό άκρο ενός μορίου σε μια σειρά και το καρβοξυτελικό άκρο του επόμενου μορίου. Οι διασυνδέσεις αυτές δημιουργούνται μεταξύ των αδευδών της λυσίνης και της υδροξυλυσίνης. Επίσης έχει βρεθεί και ένας άλλος χιαστός δεσμός που γίνεται με το αμινοξύ ιστιδίνη (Fairweather , 1972 ; Housley et al., 1975). Η ακριβής θέση των χιαστών δεσμών μέσα στα ινίδια του κολλαγόνου είναι γνωστή.

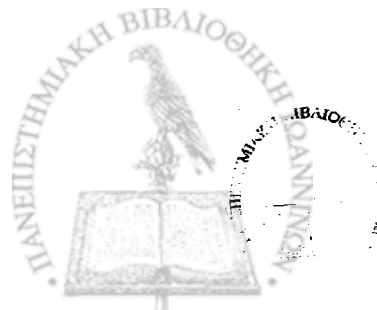
### 1.8.9 Η δομή των ινιδίων του κολλαγόνου

Τα μόρια του κολλαγόνου, όπως αναφέραμε, συγκεντρώνονται και σχηματίζουν τα ινίδια των οποίων η δομή σταθεροποιείται με τη βοήθεια των χιαστών δεσμών.

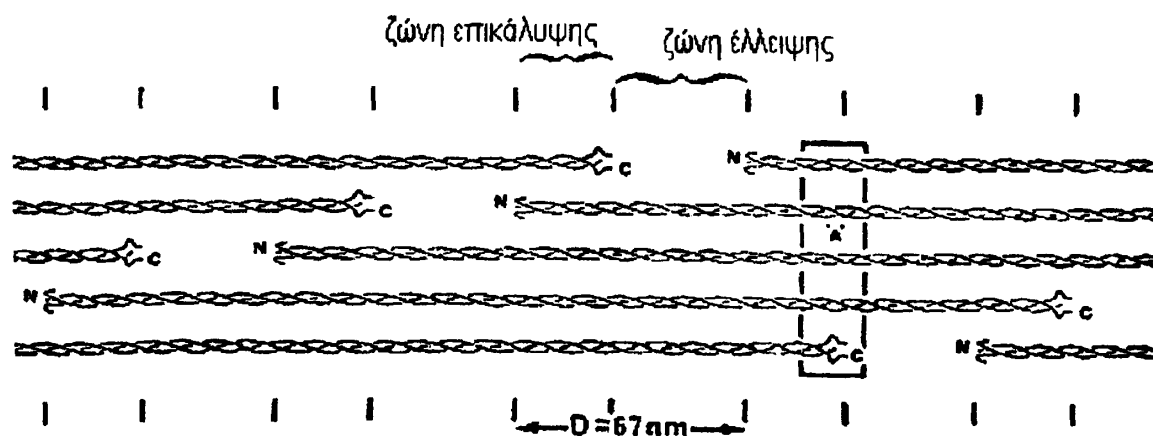
Αν εξετάσουμε τα ινίδια του κολλαγόνου στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο κατά μήκος του άξονά τους, θα παρατηρήσουμε ότι αποτελούνται από επαναλαμβανόμενα τμήματα μήκους  $D$ . Τα μόρια στο ινίδιο διατάσσονται με την ίδια διεύθυνση και φορά και είναι προσανατολισμένα έτσι ώστε να είναι σχεδόν παράλληλα με τον άξονα του ινιδίου (σχήμα 1.10).



**Σχήμα 1.10:** Τα βέλη είναι η διαγραμματική απεικόνιση των μορίων του κολλαγόνου σύμφωνα με το μοντέλο Hodge and Petruska (1963). Τα μόρια μιας σειράς έχουν μετακινηθεί κατά το ένα τέταρτο του μήκους τους σε σχέση με την προηγούμενη. Οι κενοί χώροι μιας σειράς που είναι οι περιοχές έλλειψης μορίων μπορεί να είναι θέσεις πυρήνωσης κατά τον σχηματισμό των οστών.



Η μετατόπιση μεταξύ δυο μορίων είναι ακέραιο πολλαπλάσιο της μονάδας  $D$  (Hodge and Petruska, 1963) και με αυτό τον τρόπο σχηματίζεται η χαρακτηριστική ταινιωτή δομή των ινιδίων του κολλαγόνου. Στο σχήμα 1.11 (Hodge and Petruska, 1963) έχουμε μια σχηματική δισδιάστατη αναπαράσταση της περιοδικότητας των ινιδίων όπου φαίνεται η ακριβής θέση των μορίων, κατά μήκος του άξονα του ινιδίου. Καθώς ο λόγος του μήκους  $L$  του μορίου προς την περιοδικότητα  $D$  δεν είναι ακέραιος ( $L/D=4,47$ ), παρατηρούμε ότι κάθε περίοδος  $D$  είναι χωρισμένη σε δυο ζώνες, όπου σε εγκάρσιες τομές, η μια περιέχει περισσότερα μόρια από την άλλη. Η ζώνη με τα περισσότερα μόρια λέγεται ζώνη επικάλυψης (overlap zone) και περιέχει πέντε μόρια και η ζώνη με τα λιγότερα μόρια λέγεται ζώνη έλλειψης (gap zone) και περιέχει τέσσερα μόρια (σχήμα 1.11).



Σχήμα 1.11: Δισδιάστατη αναπαράσταση της διάταξης των μορίων μέσα σε ένα ινίδιο κολλαγόνου.



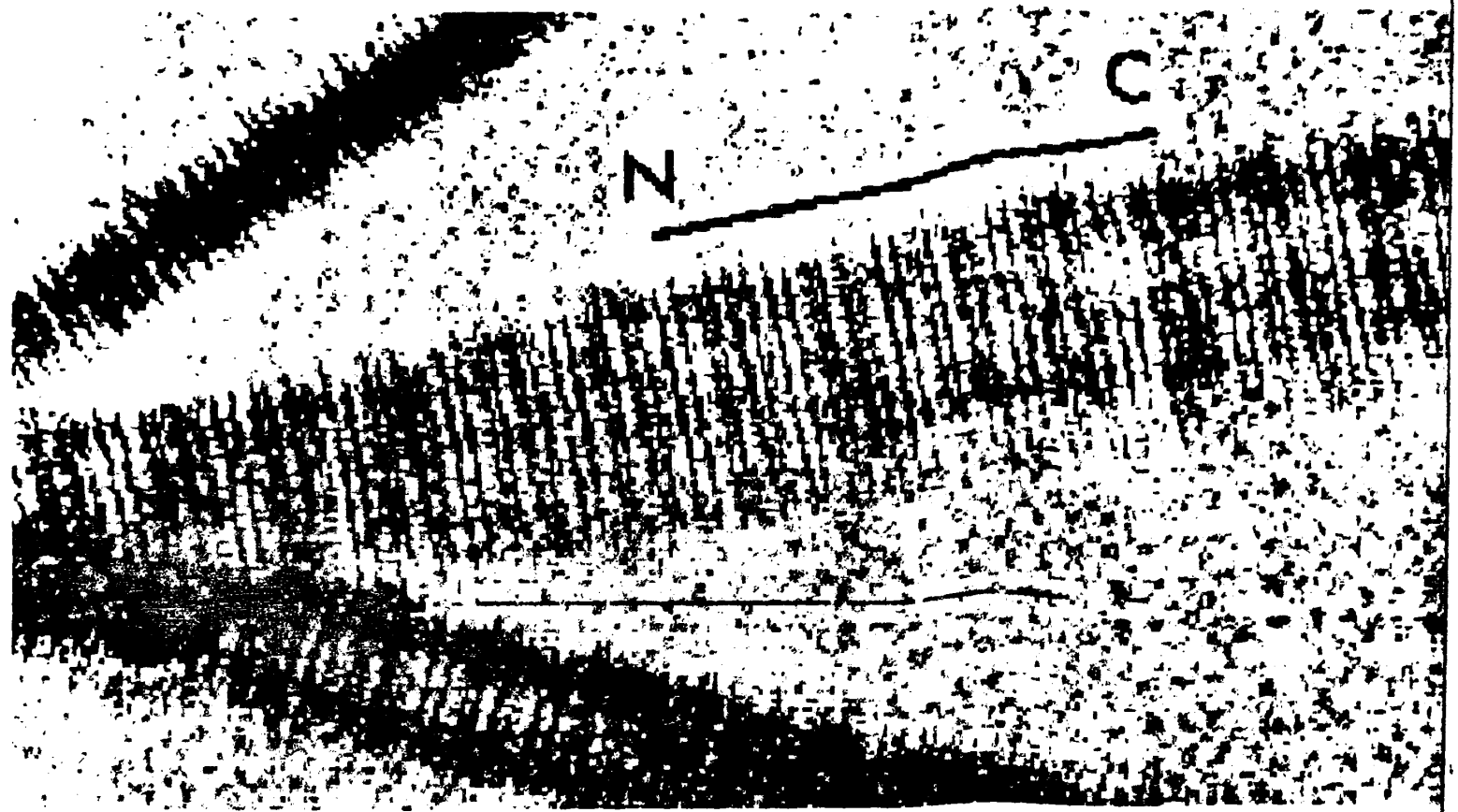
Αν στα ινίδια αυτά γίνει χρώση με άλατα βαρέων μετάλλων, τότε σε κάθε τμήμα D υπάρχουν εναλλασσόμενες σκούρες και ανοιχτές ταινίες διαφορετικού πάχους. Συγκεκριμένα, κάθε τμήμα περιέχει δώδεκα σκούρες ταινίες που οφείλονται στις αλληλεπιδράσεις των μεταλλικών ανιόντων με θετικά φορτισμένα αμινοξέα ή μεταλλικών κατιόντων με αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα (Tzaphlidou et al., 1982a ; 1982b) (σχήμα 1.12).

Ο προσδιορισμός της τιμής της μονάδας D, δηλαδή της αξονικής περιοδικότητας των ινιδίων, γίνεται με τη βοήθεια της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας και με τεχνικές σκέδασης ακτίνων X. Οι πιο ακριβείς μετρήσεις του D, δίνονται από τις μελέτες σκέδασης ακτίνων X σε ινίδια που δεν έχουν υποστεί αφυδάτωση. Τέτοιες μελέτες σε κολλαγόνο τένοντα από ουρά ποντικού που δεν έχει υποστεί αφυδάτωση, έδειξαν για το D τιμή ίση με 67nm (Miller, 1982). Η τιμή αυτή είναι κατά λίγο διαφορετική, ανάλογα με το είδος του ιστού που εξετάζεται.

Ο προσδιορισμός της περιοδικότητας D με τη βοήθεια της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, δίνει τιμές για το D λιγότερο ακριβείς και συνήθως μικρότερες, γεγονός που οφείλεται στην συρρίκνωση λόγω αφυδάτωσης και σε μηχανικές πιέσεις που υφίσταται το δείγμα του κολλαγόνου, κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας του για την παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ή και κατά τη διάρκεια της παρατήρησής του σε αυτό. Έτσι οι τιμές της περιοδικότητας D που υπολογίστηκαν με τη χρήση της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας κυμαίνονται από 55-65nm, ανάλογα με το βαθμό της αφυδάτωσης (Hall et al., 1942).

Η συρρίκνωση των ινιδίων λόγω της αφυδάτωσής τους, υποθέτουμε ότι γίνεται ομοιόμορφα κατά μήκος του άξονα των ινιδίων και δεν επηρεάζει τις μελέτες μας, γιατί σημασία έχει η σχετική θέση των μορίων που συνθέτουν την ταινιωτή δομή του κολλαγόνου σε μια περίοδο D.





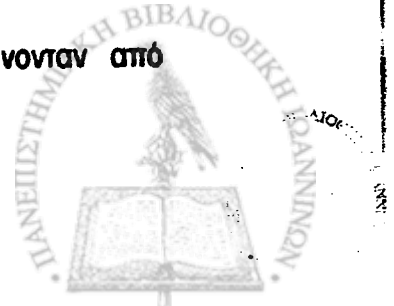
Σχήμα 1.12: Ινίδιο κολλαγόνου τύπου I από δέρμα μόσχου. Το ινίδιο παρουσιάζει περιοδικότητα κατά μήκος του άξονά του και έχει χρωματισθεί θετικά με φωσφοροβολφραμικό οξύ και με οξικό ουρανίλιο (Charman et al., 1990).

Το μήκος του μορίου του κολλαγόνου υπολογίστηκε με ακτίνες X και σε σχέση με το D βρέθηκε  $L=4,47D$  (Tomlin and Worthington, 1956), ενώ μετρήσεις με ηλεκτρονική μικροσκοπία έδωσαν τιμή για το μήκος ίση με  $L=44,2-4,47D$  (Charman, 1974). Έτσι το μήκος  $L$  των μορίων του κολλαγόνου είναι περίπου  $L=300\text{nm}$ .

Η περιοδικότητα στις ίνες του κολλαγόνου έχει την προέλευσή της στις αλληλεπιδράσεις που υπάρχουν μεταξύ των εξωτερικών πλευρικών αλυσίδων των μορίων τα οποία ανασυντάσσονται παράλληλα μεταξύ τους και συγκροτούνται για να σχηματίσουν τα ινίδια. Οι εξωμοριακές αυτές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αντίθετα φορτισμένων πλευρικών αλυσίδων και μεταξύ των υδροφοβικών αλυσίδων γίνονται μεγαλύτερες όταν τα γειτονικά μόρια είναι αμοιβαία μετατοπισμένα αζονικά κατά απόσταση  $D$  ή κατά απόσταση ίση με μη ακέραια πολλαπλάσια του  $D$  (Hulmes et al., 1973). Στη μονάδα  $D$  αντιστοιχούν 234 αμινοξέα.

Αν εξετάσουμε κάθετες τομές ινιδίων κολλαγόνου στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, θα παρατηρήσουμε ότι εμφανίζουν σχεδόν κυκλικό σχήμα. Χαρακτηριστικό των ινιδίων είναι επίσης το γεγονός ότι παρουσιάζουν σε πολλούς ιστούς ομοιομορφία στη διάμετρό τους είτε πρόκειται για ινίδια κολλαγόνου από ώριμο ή ανώριμο ιστό. Παρατηρώντας ινίδια κολλαγόνου στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο από διάφορους ιστούς, οι τιμές των διαμέτρων τους μπορεί να ποικίλουν, αλλά ο μεγαλύτερος αριθμός ινιδίων βρίσκεται να έχει τιμές διαμέτρου γύρω από συγκεκριμένη περιοχή.

Η διάμετρος των ινιδίων της μεμβράνης του κερατοειδούς χιτώνα στα περισσότερα σπονδυλωτά, βρέθηκε να είναι στην περιοχή 22-26nm (Craig and Parry, 1981). Ινίδια κολλαγόνου από τον τένοντα ουράς ποντικού είχαν διάμετρο που κυμαίνονταν από



20-400nm. Όμως πάνω από το μισό του πληθυσμού των ινιδίων βρισκόταν με διάμετρο γύρω στα 300nm (Pamy and Craig, 1978).

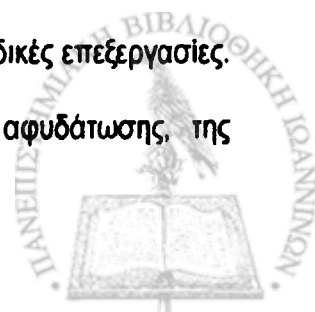
Αξιοσημείωτη είναι επίσης η επίδραση της αφυδάτωσης που λαμβάνει χώρα κατά την επεξεργασία των δειγμάτων, στην τιμή της διαμέτρου των ινιδίων. Η αφυδάτωση προκαλεί μια συρρίκνωση των ινιδίων, με αποτέλεσμα οι διαμέτροι να είναι μεγαλύτερες πριν αυτή γίνει. Αυτό όμως δεν επηρεάζει την ομοιομορφία στη διάμετρο των ινιδίων.

## **1.9 Η παρατήρηση των ινιδίων του κολλαγόνου στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο**

### **1.9.1 Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο**

Η χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου στην παρατήρηση βιολογικών δειγμάτων είναι σημαντική, γιατί προσφέρει πολύ μεγαλύτερη μεγένθυση αλλά και διακριτική ικανότητα, σε σχέση με τα οπτικά μικροσκόπια. Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ανέκλυσε σαν ένα ιδεώδες εργαλείο για τη μελέτη και τη διάγνωση διαφόρων δυσλειτουργιών που αφορούν το κολλαγόνο σε υπερμικροσκοπικό επίπεδο (Tzaphlidou, 1992).

Η λειτουργία του βασίζεται κυρίως στη σκέδαση δέσμης των ηλεκτρονίων όταν αυτά διαπερνούν κάποιο υλικό και την εστίασή της, όταν εξέρχεται από αυτό με τη βοήθεια ηλεκτρομαγνητικών φακών. Για να είναι δυνατή η εξέταση των βιολογικών δειγμάτων από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο πρέπει αυτά να υποβληθούν σε μια σειρά από ειδικές επεξεργασίες. Η σταθεροποίηση είναι το πρώτο βήμα. Ακολουθεί το στάδιο της αφυδάτωσης, της



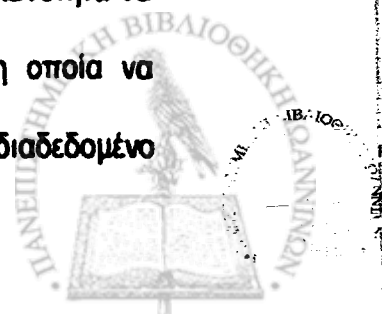
μονιμοποίησης (ή στερέωσης), της κοπής του δείγματος σε υπέρλεπτες τομές και της χρώσης του.

### 1.9.2 Σταθεροποίηση

Σκοπός της σταθεροποίησης είναι η διατήρηση της κυτταρικής δομής των ιστών σε κατάσταση που να μοιάζει όσο το δυνατό περισσότερο με εκείνη των ζωντανών ιστών (Weakley, 1972; Hayat, 1981). Έτσι εμποδίζει την αυτόλυση, την προσβολή από βακτήρια, τις αλλαγές της δομής σε όγκο και σχήμα που επέρχονται με το θάνατο, αλλά και προφυλάσσει τη δομή κατά τη διάρκεια της στερέωσης, της τομής και των άλλων διεργασιών των δειγμάτων. Τα υλικά που χρησιμοποιούνται για τη σταθεροποίηση είναι συνήθως οι αλδεύδες για γρήγορη διείσδυση στον ιστό, το τετροξείδιο του οσμίου για πιο αργή διείσδυση, το υπερμαγγανικό ποτάσιο και οι διϊμιδοεστέρες.

Το μέγεθος του δείγματος είναι σημαντικό για τη σωστή σταθεροποίηση. Δεν επιτυγχάνεται συντήρηση με τη σταθεροποίηση, αν το μέγεθος του κύβου στον οποίο κόβουμε το δείγμα, υπερβαίνει το μισό κυβικό εκατοστό. Η θερμοκρασία στην οποία γίνεται η σταθεροποίηση είναι συνήθως οι 0°.

Η γλουταραλδεύδη είναι ένας σταθεροποιητής που παρουσιάζει ένα σταθερό δίκτυο μέσα στο κύτταρο, με το σχηματισμό χιαστών δεσμών με τα μόρια του κυττάρου (Sabatini et al., 1963). Έτσι προφυλάσσει την κυτταρική δομή και ως ουσία έχει την καλύτερη ικανότητα να σταθεροποιεί τις πρωτεΐνες. Από τότε δεν έχει βρεθεί άλλη χημική ένωση η οποία να σταθεροποιεί καλύτερα τις πρωτεΐνες και για αυτό το λόγο είναι το πιο διαδεδομένο



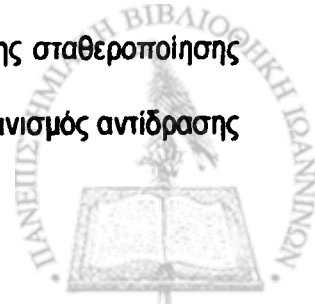
αντιδραστήριο για τη σταθεροποίηση των βιολογικών δειγμάτων κατά την προετοιμασία τους για την παρατήρησή τους στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Hayat, 1981; Bullock, 1984).

Ο μηχανισμός της αντίδρασης δεν είναι ακόμα εντελώς γνωστός. Για τις πρωτεΐνες, οπότε και για το κολλαγόνο, τα πιθανά σημεία δράσης φαίνεται να είναι τα αμινοξέα της λυσίνης και υδροξυλυσίνης και πιθανώς και της ιστιδίνης (Charman et al., 1990). Αντιδράσεις μπορούν να γίνονται και με άλλα αμινοξέα όπως με την τυροσίνη και με τις α-αμινομάδες στα αμινοτελικά άκρα των πολυπεπτιδικών αλυσίδων (Habeeb and Hiramoto, 1968; Hopwood, 1972).

Οι επιδράσεις της γλουταραλδεΐδης και οι διαμορφώσεις που προκαλεί στα πεπτίδια και τις πρωτεΐνες δεν είναι ακόμα γνωστές με βεβαιότητα. Σε μακροσκοπική κλίμακα εμφανίζεται να προκαλεί συρρίκνωση και αλλαγές στις φυσικές ιδιότητες των πεπτιδίων και των πρωτεϊνών. Τα ινίδια του κολλαγόνου όταν σταθεροποιηθούν με γλουταραλδεΐδη, παρουσιάζουν μεγαλύτερη μηχανική, θερμική και χημική σταθερότητα (Gustavson, 1956).

Η σταθεροποίηση όμως, μειώνει αισθητά τη λήψη καλής εικόνας από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, αφού προκαλεί μείωση της αντίθεσης του δείγματος. Η μείωση της αντίθεσης προέρχεται από το γεγονός της ελλιπούς χρώσης, αφού ένας μεγάλος αριθμός φορτισμένων αμινοξέων που αντιδρούν με τα σωμάτια της χρώσης έχει ήδη δημιουργήσει ενώσεις με τη γλουταραλδεΐδη.

Το τετροξειδίο του οσμίου δρα, παρουσιάζοντας ένα σταθερό δίκτυο μέσα στο κύτταρο με το σχηματισμό χιαστών δεσμών με τα μόρια του κυττάρου. Το δίκτυο αυτό εμποδίζει την απώλεια υλικών που βρίσκονται μέσα σε αυτό, καθώς επίσης και το χάσιμο υλικών που ήδη υπάρχουν από την επεξεργασία του δείγματος (Weakley, 1972). Οι χιαστοί δεσμοί δημιουργούνται ανάμεσα στα μόρια του οσμίου και των κυττάρων, ανάμεσα στα ίδια τα μόρια του οσμίου, ή ανάμεσα στα ίδια τα μόρια ιστού που δεν έχει αντιδράσει με το υλικό της σταθεροποίησης (Weakley, 1972). Στις πρωτεΐνες και συγκεκριμένα στο κολλαγόνο, ο μηχανισμός αντίδρασης

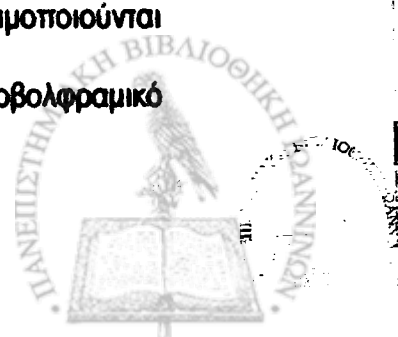


με το όσμιο δεν είναι εντελώς γνωστός. Παράλληλα με τη σταθεροποίηση, το όσμιο προκαλεί και χρώση των βιολογικών δειγμάτων, και πολλές φορές χρησιμοποιείται και σαν υλικό χρώσης (Hayat, 1981).

### 1.9.3 Χρώση

Τα βιολογικά δείγματα αποτελούνται από υλικά χαμηλού ατομικού αριθμού (υδρογόνο 1, άνθρακας 12, οξυγόνο 16, φώσφορος 31, κ.λ.π.). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μικρή σκεδαστική ικανότητα των υλικών αυτών, οπότε ο σχηματισμός ενός ικανοποιητικού ειδώλου δεν είναι δυνατός κατά την παρατήρησή τους στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Έτσι οι εικόνες των δειγμάτων των υλικών αυτών στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έχουν πολύ μικρή αντίθεση. Για να πετύχουμε εικόνες με κατάλληλες αντιθέσεις διαποτίζουμε τα βιολογικά δείγματα με βαριά μέταλλα θετικά ή αρνητικά φορτισμένα, που έχουν την ιδιότητα λόγω του μεγάλου ατομικού τους αριθμού, να σκεδάζουν ισχυρά τα ηλεκτρόνια της δέσμης. Τέτοια μέταλλα είναι ο νιτρικός μόλυβδος, ο σίδηρος, το βολφράμιο, το βισμούθιο, το οξικό ουρανύλιο, άλατα λιθίου κ.λ.π.

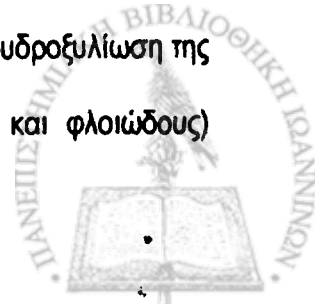
Κατά τη θετική χρώση, τα μεταλλικά κατιόντα ή ανιόντα αλληλεπιδρούν κυρίως ηλεκτροστατικά με τα αρνητικά ή θετικά φορτισμένα σωματίδια του δείγματος και στη συνέχεια το δείγμα ξεπλένεται ώστε να μείνουν σε αυτό μόνο όσα μόρια της χρώσης που αλληλεπίδρασαν και ενσωματώθηκαν. Έτσι αυξάνεται ο ατομικός αριθμός των περιοχών αυτών και αυξάνεται η αντίθεση των δειγμάτων. Τα μέταλλα που συνήθως χρησιμοποιούνται για τη θετική χρώση είναι το οξικό ουρανύλιο (uranyl acetate, UA) και το φωσφοροβολφραμικό οξύ (phosphotungstic acid, PTA).



### 1.10 Κολλαγόνο και οστεοπόρωση

Είναι γνωστό από πολλούς ερευνητές ότι η ποσότητα του κολλαγόνου του δέρματος και η οστική πυκνότητα μειώνονται κατά τη γήρανση στις γυναίκες, καθώς επηρεάζονται από την έλλειψη παραγωγής οιστρογόνων από τις ωθήκες (Castelo-Branco et al., 1992 ; 1994 ; Brinca et al., 1985 ; 1987). Καθώς το δέρμα και τα οστά είναι συνδετικοί ιστοί που το κύριο οργανικό συστατικό τους είναι κολλαγόνο τύπου I, υποστηρίζεται ότι η λέπτυνση του δέρματος και η οστική απώλεια που επέρχονται με τη γήρανση, οφείλονται σε κοινούς γενετικούς μηχανισμούς (Chappard et al., 1991 ; Whitmore and Levine, 1998). Υπάρχουν ενδείξεις ότι το κολλαγόνο τύπου I σε μερικούς οστεοπορωτικούς ασθενείς μπορεί να είναι μη φυσιολογικό. Μελέτες σε οστεοπορωτικούς ασθενείς νεαρής ηλικίας, με μεγάλη τάση σε κατάγματα, έδειξαν ότι μπορεί να υπάρχουν μεταλλαγές στα γονίδια του κολλαγόνου τους (Prockop and Kivirikko, 1984), ενώ περαιτέρω έρευνα έδειξε ότι οι μεταλλαγές αυτές συναντώνται στους τύπους I, II, ή III (Kivirikko, 1993). Οι μεταλλαγές των γονιδίων του κολλαγόνου στους τύπους I, II, III, IX, X, και XI μπορούν να προκαλέσουν μια σειρά από ασθένειες των οστών και ανάμεσά τους οστεοπόρωση (Kuivaniemi et al., 1997).

Από πολλούς ερευνητές διαπιστώθηκε η αλλοίωση του κολλαγόνου του οργανισμού κατά την οστεοπόρωση, διαπιστώθηκε κυρίως με μετρήσεις βιοχημικών δεικτών. Οι βιοχημικοί δείκτες βελτιώνουν τον προγνωστικό προσδιορισμό της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης, σε συνδυασμό με τη μέτρηση της οστικής πυκνότητας. Το επίπεδο της ουρικής απέκκρισης αμινοξέων χιαστών δεσμών κολλαγόνου τύπου I, καθορίζει τον οστικό ανασχηματισμό και είναι πολύ καλός δείκτης της οστικής απορρόφησης στην οστεοπόρωση (Gamero and Delmas 1998 ; de Vernejoul, 1998 ; Knott and Bailey, 1998 ; Ohishi et al., 1998). Υπερυδροξυλίωση της λυσίνης παρατηρήθηκε στο κολλαγόνο τύπου I των οστών (πορώδους και φλοιώδους)





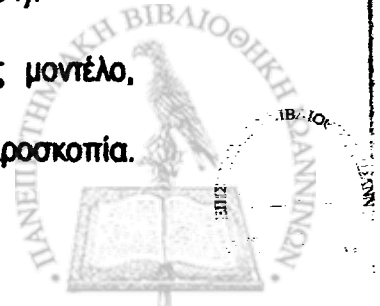
οστεοπορωτικών γυναικών (Kowitz et al., 1997). Μελέτη των χιαστών δεσμών του κολλαγόνου στην οστεοπόρωση έδειξε ότι υπάρχει μείωση της συγκέντρωσης των χιαστών δεσμών διυδρο-διυδροξυλυσινορλευκίνης και υδροξυλυσινορλευκίνης στα οστά που οδηγεί σε αυξημένο κίνδυνο καταγμάτων, παρά το γεγονός ότι η πυκνότητα του κολλαγόνου τους δεν διαφέρει από αυτή των αντίστοιχων φυσιολογικών ατόμων (Oxlund et al., 1996).

Μεταβολές στην υδροξυλίωση της λυσίνης και στη σταθεροποίηση των χιαστών δεσμών του κολλαγόνου των οστών έχουν παρατηρηθεί με την οστεοπόρωση (Bailey et al., 1992 ; 1993) και είναι πιθανόν οι μεταβολές αυτές να παίζουν κάποιο ρόλο στην παθογένεση της ασθένειας. Επίσης κατά την οστεοπόρωση παρατηρήθηκε μια μικρή μεταβολή στην αναλογία του κολλαγόνου τύπου I και σε μερικές περιπτώσεις σημαντική μείωση του κολλαγόνου τύπου VI (Bailey et al., 1993).

Το μοντέλο των επίμυων που υποβλήθηκαν σε ωθηκεκτομή, χρησιμοποιήθηκε και για τη μελέτη των συνεπειών της οστεοπόρωσης στο κολλαγόνο. Μελέτες σε επίμυες έδειξαν ότι η ωθηκεκτομή προκαλεί μείωση της ποσότητας του κολλαγόνου των οστών (Aerssens et al., 1993). Κατά την ωθηκεκτομή, παρατηρήθηκε αύξηση της ουρικής απέκκρισης πυριδινολίνης, γλυκοζυλ-γαλακτοζυλ-υδροξυλυσίνης και γαλακτοζυλ-υδροξυλυσίνης, παράλληλα με οστική απώλεια που καθιστά τις μετρήσεις των ουρικών εκκρίσεων της πυριδινολίνης και της υδροξυλυσίνης, πολύ καλούς δείκτες ανίχνευσης οστικών μεταβολών (Casari et al., 1997).

Άλλες μελέτες ωθηκεκτομής επίμυων έδειξαν ότι τα οστά τους περιείχαν λιγότερη υδροξυπρολίνη, λιγότερο ασβέστιο και φώσφορο ανά μονάδα όγκου (Kalu et al., 1984).

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιώντας τους επίμυες με ωθηκεκτομή ως μοντέλο, μελετήθηκε το κολλαγόνο δέρματος και οστών με βασική μέθοδο την ηλεκτρονική μικροσκοπία.



**Με τις τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν έγινε προσπάθεια ανιχνεύσεως δομικών αλλαγών του κολλαγόνου ως συνέπεια της ωθηκεκτομής και συσχέτισης των αποτελεσμάτων του δέρματος και των οστών.**



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 2.1 Εισαγωγή

Όπως ήδη αναφέραμε, οι επίμυες που υποβάλλονται σε ωθηκεκτομή, είναι ένα πολύ χρήσιμο και αξιόπιστο μοντέλο για τη μελέτη των επιπτώσεων της οστεοπόρωσης.

Αναφέραμε επίσης ότι υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές που μαρτυρούν ότι το κολλαγόνο του δέρματος επηρεάζεται από την οστεοπόρωση. Ο McConkey και οι συνεργάτες του ήταν οι πρώτοι το 1963, που ανέφεραν ότι υπάρχει σχέση ανάμεσα στο διαφανές δέρμα και στην οστεοπόρωση. Καθώς το βασικό οργανικό συστατικό των οστών είναι το κολλαγόνο τύπου I, οι παράγοντες που επιδρούν στο κολλαγόνο και επηρεάζουν τόσο τα οστά όσο και το δέρμα θα μπορούσαν να είναι ίδιοι.

Η μελέτη μας ερεύνησε τις επιπτώσεις της νόσου της οστεοπόρωσης όπως αυτές εκδηλώνονται στο κολλαγόνο των οστών και του δέρματος. Συγκεκριμένα έγινε μια ολοκληρωμένη μελέτη σε υπερμικροσκοπικό επίπεδο του κολλαγόνου των οστών, πορώδους και φλοιώδους και του δέρματος, κατά την προκλητή με ωθηκεκτομή οστεοπόρωση σε επίμυες, εξετάζοντας τις μεταβολές στη δομή, των ινιδίων του (μορφολογία, διάμετρος, περιοδικότητα). Επίσης, μελετήθηκε ο ρόλος της εμπλουτισμένης διατροφής με ασβέστιο και βιταμίνη D ή και συνδυασμού των δυο τροφών, στα ινίδια του κολλαγόνου των οστών.

Όλες οι παραπάνω μετρήσεις και παρατηρήσεις στη διάταξη των ινιδίων έγιναν με βασική μέθοδο την ηλεκτρονική μικροσκοπία. Η ηλεκτρονική μικροσκοπία έχει χρησιμοποιηθεί στο



παρελθόν για τη μελέτη διαφόρων δομικών αλλοιώσεων των ινιδίων κολλαγόνου που προκαλούνται από διάφορες ασθένειες.

Στο πείραμά μας, χρησιμοποιήθηκαν θηλυκοί επίμυες τύπου wistar, ηλικίας 3 μηνών και βάρους 250-300 γρ. Οι επίμυες χειρουργήθηκαν με γενική αναισθησία ( αιθέρας – κεταμίνη- διαζεπάμη). Με μέση λαπαροτομία μήκους 4-5 cm, ανοίχθηκε η περιτοναϊκή κοιλότητα και στη συνέχεια έγινε έλεγχος όλων των ενδοκοιλιακών οργάνων και προσεκτική αναγνώριση των ωθηκών. Ακολούθως, με προσεκτική παρασκευή, πραγματοποιήθηκε ολική αφαίρεση και των δυο ωθηκών. Μετά από λεπτομερή αιμόσταση, ακολούθησε σύγκλιση της περιτοναϊκής κοιλότητας με συνεχή ραφή με ράμμα vicryl 2/0 σε δυο στρώματα.

## 2.2 Πειράματα

Στα πειράματά μας χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 54 θηλυκοί επίμυες ηλικίας 3 μηνών. Οι 36 από αυτούς υποβλήθηκαν σε ωθηκεκτομή και χωρίστηκαν σε ομάδες ανάλογα με το χρόνο θανάτωσής τους. Δημιουργήσαμε αντίστοιχες ομάδες από τα υπόλοιπα 18 ζώα με τον ίδιο χρόνο θανάτωσης. Τα ζώα αυτά αναπτύχθηκαν φυσιολογικά και χρησίμευσαν ως μάρτυρες.

### 2.2.1 Πρώτη ομάδα

Τέσσερις επίμυες θανατώθηκαν 6 εβδομάδες μετά την ωθηκεκτομή, καθώς και ίδιος αριθμός από μάρτυρες αντίστοιχης ηλικίας. Αυτό το πείραμα είχε σαν σκοπό να ερευνηθεί -αν υπάρχουν- τις επιπτώσεις της ωθηκεκτομής στο κολλαγόνο των οστών (πορώδους και φλοιώδους) και του δέρματος, αμέσως μετά την επέμβαση.



## 2.2.2 Δεύτερη ομάδα

Είκοσι τέσσερις επίμυες θανατώθηκαν 6 μήνες μετά την ωθηκεκτομή, καθώς και έξι μάρτυρες αντίστοιχης ηλικίας.

Από τους είκοσι τέσσερις επίμυες

- 1) Πρώτη υποομάδα: έξι είχαν διαιτολόγιο με κανονική διατροφή, όπου ο λόγος ασβεστίου φωσφόρου ήταν 1 : 1 και η βιταμίνη D 3000 IU.
- 2) Δεύτερη υποομάδα: έξι είχαν διαιτολόγιο που περιείχε διατροφή εμπλουτισμένη με ασβέστιο (2%), όπου ο λόγος ασβεστίου φωσφόρου ήταν 2 : 1 και η βιταμίνη D 3000 IU.
- 3) Τρίτη υποομάδα: έξι είχαν διαιτολόγιο που περιείχε διατροφή εμπλουτισμένη σε βιταμίνη D 5000IU, όπου ο λόγος ασβεστίου φωσφόρου ήταν 1 : 1.
- 4) Τέταρτη υποομάδα: έξι είχαν διαιτολόγιο που περιείχε διατροφή εμπλουτισμένη σε ασβέστιο (2%) και βιταμίνη D (5000 IU) μαζί, όπου ο λόγος ασβεστίου φωσφόρου είναι 2 : 1.

Στις περιπτώσεις αυτές εξετάσθηκαν οι συνέπειες της ωθηκεκτομής, αρκετό χρονικό διάστημα μετά την επέμβαση, όταν το μέγεθος της οστικής απώλειας αναμένεται να είναι μεγαλύτερο.

Στην πρώτη περίπτωση, εξετάσθηκαν οι επιπτώσεις της προκλητής με ωθηκεκτομή οστεοπόρωσης στο κολλαγόνο του δέρματος και των οστών, με επίμυες που είχαν φυσιολογική διατροφή.

Στις περιπτώσεις 2,3,4,εφαρμόσθηκε ειδικό διαιτολόγιο στους επίμυες, έξι εβδομάδες μετά την ωθηκεκτομή και για 80 ημέρες. Εξετάσθηκαν οι επιδράσεις της ειδικής διατροφής στην προκλητή με ωθηκεκτομή οστεοπόρωση, στο κολλαγόνο των οστών και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με αυτά της πρώτης περίπτωσης όπου οι επίμυες διατρέφονταν με φυσιολογικό διαιτολόγιο και με αυτά των μαρτύρων της αντίστοιχης ηλικίας.



### 2.2.3 Τρίτη ομάδα

Οκτώ επίμυες θανατώθηκαν ένα χρόνο μετά την ωθηκεκτομή, καθώς και οκτώ αντίστοιχης ηλικίας. Στην περίπτωση αυτή, μελετήθηκαν τα αποτελέσματα της προκλητής με ωθηκεκτομή οστεοπόρωσης στο κολλαγόνο του δέρματος και των οστών. Ο σκοπός του πειράματος αυτού, ήταν να εξετασθούν οι επιπτώσεις της οστεοπόρωσης, όσο το δυνατόν μεγαλύτερο διάστημα μετά την επέμβαση. Τα πειραματικά στάδια όπως τα περιγράψαμε παραπάνω, απεικονίζονται και στον πίνακα 2.1. Ο πίνακας 2.2 απεικονίζει τη δοσολογία της ειδικής διατροφής στην οποία υποβλήθηκαν οι επίμυες της δεύτερης ομάδας των πειραματοζώων.

**Πίνακας 2.1:** Απεικόνιση των πειραματικών σταδίων. Γίνεται περιγραφή του χρόνου θανάτωσης της κάθε ομάδας ζώων, του αριθμού των πειραματοζώων, της διατροφής στην οποία υποβλήθηκαν, καθώς και των αντίστοιχων μαρτύρων που αναπτύχθηκαν φυσιολογικά.

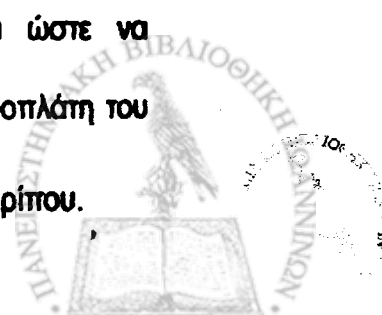
Χρόνος θανάτωσης μετά την ωθηκεκτομή	Αριθμός ζώων που υποβλήθηκαν σε ωθηκεκτομή	Ειδική διατροφή	Αριθμός ζώων μαρτύρων αντίστοιχης ηλικίας
6 εβδομάδες	4	-	4
6 μήνες	6	-	6
6 μήνες	6	Ασβέστιο	6
6 μήνες	6	Βιταμίνη D	6
6 μήνες	6	Ασβέστιο+Βιταμίνη D	6
12 μήνες	8	-	8

**Πίνακας 2.2:** Περιγραφή της δοσολογίας της ειδικής διατροφής στην οποία υποβλήθηκαν τα ζώα της δεύτερης ομάδας πειραματόζων, τα οποία θανατώθηκαν 6 μήνες μετά την ωθηκεκτομή. Η ειδική διατροφή στις περιπτώσεις 2,3,4,εφαρμόστηκε έξι εβδομάδες μετά την επέμβαση και για 80 ημέρες.

Δεύτερη ομάδα πειραματόζων	Πρώτη υποομάδα	Δεύτερη υποομάδα	Τρίτη υποομάδα	Τέταρτη υποομάδα
Βιταμίνη D IU	3000	3000	5000	5000
Ασβέστιο %	1	2	1	2
Φώσφορος %	1	1	1	1

### 2.3 Προετοιμασία δειγμάτων δέρματος και οστών για την παρατήρησή τους στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Τα δείγματα των οστών και του δέρματος, υποβλήθηκαν σε ειδικές χημικές επεξεργασίες έτσι ώστε να είναι δυνατή η παρατήρησή τους στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Οι επεξεργασίες αυτές, περιλαμβάνουν τα στάδια της σταθεροποίησης, της αφυδάτωσης, του εμποτισμού, της κοπής πολύ λεπτών τομών και της χρώσης αυτών. Αμέσως μετά τη θυσία του κάθε πειραματόζου και σε όσο το δυνατό μικρότερο χρονικό διάστημα, έτσι ώστε να αποφευχθούν οι αλλοιώσεις, πάρθηκαν δείγματα δέρματος από την αριστερή ωμοπλάτη του κάθε ζώου. Το μέγεθος των δειγμάτων ήταν σε σχήμα κύβου και μεγέθους  $1\text{mm}^3$  περίπου.



Δείγματα πορώδους και φλοιώδους οστού πάρθηκαν από την αριστερή κνήμη των ζώων, αφού καθαρίστηκαν προσεκτικά από το δέρμα και το μυελό. Τα δείγματα πάρθηκαν αρχικά σε μεγάλα κομμάτια.

### 2.3.1. Σταθεροποίηση

#### 1) Σταθεροποίηση του δέρματος

Η σταθεροποίηση ως πρώτο στάδιο της επεξεργασίας έχει όπως έχει ήδη αναφερθεί σκοπό τη διατήρηση του δέρματος σε κατάσταση όσο το δυνατό λιγότερο αλλοιωμένη, ώστε να μοιάζει με την κατάσταση των ζωντανών ιστών. Τα δείγματα δέρματος κόπηκαν σε σχήμα κύβου με διάσταση  $1\text{mm}^2$  περίπου. Η σταθεροποίηση των δειγμάτων έγινε σε δυο στάδια με τη χρήση δυο διαφορετικών σταθεροποιητών.

Αρχικά τα δείγματα δέρματος σταθεροποιούνται σε διάλυμα γλουταραλδεΐδης. Η γλουταραλδεΐδη που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρείας SERVA, με συγκέντρωση 25% σε νερό. Για την παρασκευή του διαλύματος της σταθεροποίησης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα κακοδυλικού νατρίου (sodium cacodylate) με συγκέντρωση 0.1M και  $\text{pH} = 7.4$ . Στο παραπάνω διάλυμα κακοδυλικού νατρίου προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα από το 25% διάλυμα γλουταραλδεΐδης, ώστε τελικά να φτιαχθεί διάλυμα του οποίου η συγκέντρωση σε γλουταραλδεΐδη να είναι 2.5%. Στο τελικό αυτό διάλυμα και σε θερμοκρασία  $4^\circ\text{C}$  τα δείγματα δέρματος έμειναν όλη τη νύχτα.





Για να εφαρμοσθεί το δεύτερο στάδιο σταθεροποίησης, τα δείγματα ξεπλύθηκαν δυο φορές με διάλυμα 0.1M κακοδυλικού νατρίου  $\text{pH}=7.4$ . Στη συνέχεια, η δεύτερη σταθεροποίηση έγινε με τετροξείδιο του οσμίου σε κρυσταλλική μορφή της εταιρείας MERCK. Το διάλυμα της σταθεροποίησης έγινε με 1% τετροξείδιο του οσμίου σε 0.1M κακοδυλικό νάτριο, με  $\text{pH}=7.4$ .

Τα δείγματα παρέμειναν στο διάλυμα αυτό για δυο ώρες στους  $4^{\circ}\text{C}$ .

Μετά το στάδιο αυτό τα δείγματα ξεπλύθηκαν δυο φορές με διάλυμα κακοδυλικού νατρίου 0.1M και  $\text{pH}=7.4$  και δυο φορές με απεσταγμένο νερό, ώστε να είναι έτοιμα για την περαιτέρω επεξεργασία τους.

## 2) Σταθεροποίηση των οστών

### α) Αρχική σταθεροποίηση και μερική αφαλάτωση

Τα κομμάτια πορώδους και φλοιώδους οστού όπως πάρθηκαν από τα ζώα σταθεροποιήθηκαν και έπειτα αφαλατώθηκαν προκειμένου να παραμείνει μόνο ο μαλακός ιστός και να απομακρυνθούν τα άλατα. Αρχικά τα οστά σταθεροποιούνται και αφαλατώνονται μερικώς σε διάλυμα γλουταραλδεΐδης και EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid). Η γλουταραλδεΐδη με συγκέντρωση 25% σε νερό και το EDTA σε μορφή σκόνης είναι της εταιρείας SERVA.

Για την παρασκευή του διαλύματος σταθεροποίησης χρησιμοποιήθηκε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα με συγκέντρωση 0.05M και  $\text{pH}=7.2$  στο οποίο προστέθηκε γλουταραλδεΐδη 25% και διάλυμα EDTA 12.5% σε νερό. Τα δείγματα παρέμειναν στο διάλυμα αυτό για 2 ώρες στους  $4^{\circ}\text{C}$ .



### β) Αφαλάτωση

Η αφαλάτωση των οστών έχει σκοπό να απομακρύνει τα μέταλλα του κρυστάλλου του υδροξυαπατίτη και τα οστά να παραμείνουν με τα υπόλοιπα συστατικά και το κολλαγόνο. Το υλικό που προκύπτει, είναι μαλακός ιστός που εύκολα μπορεί να τεμαχιστεί σε μικρά κομματάκια για τη περαιτέρω επεξεργασία. Το τελικό διάλυμα αφαλάτωσης που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από διάλυμα EDTA 12.5% σε νερό και φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.05M και pH= 7.2. Στα δείγματα των οστών έγιναν συνεχείς αλλαγές με το διάλυμα αυτό για 24 ώρες. Μετά το στάδιο αυτό και αφού τα οστά είναι απαλλαγμένα από τα άλατα, ξεπλύθηκαν επί τέσσερις φορές και για 5 λεπτά τη φορά, με απεσταγμένο νερό και επί δυο φορές και για 5 λεπτά τη φορά, σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.05M και pH= 7.2.

Τα δείγματα των οστών (πορώδους και φλοιώδους) κόπηκαν σε σχήμα κύβου μεγέθους  $0.5\text{mm}^3$  περίπου και μέσα σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα.

### γ) Τελική σταθεροποίηση

Τα δείγματα των οστών κομμένα σε κομματάκια, σταθεροποιήθηκαν σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.05M και pH= 7.2, στο οποίο προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα από το 25% διάλυμα γλουταραλδεΐδης ώστε τελικά να παρασκευαστεί διάλυμα του οποίου η συγκέντρωση σε γλουταραλδεΐδη να είναι 2.5%. Στο τελικό αυτό διάλυμα και σε θερμοκρασία  $4^{\circ}\text{C}$  τα δείγματα παρέμειναν όλη τη νύχτα.

Μετά το στάδιο αυτό τα δείγματα ξεπλύθηκαν δυο φορές με φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.05M και pH=7.2 και δυο φορές με απεσταγμένο νερό, ώστε να είναι έτοιμα για την περαιτέρω επεξεργασία τους.



Τα παρακάτω στάδια επεξεργασίας δηλαδή η αφυδάτωση, ο εμποτισμός, η κοπή σε υπέρλεπτες τομές και η χρώση, είναι κοινά για το δέρμα και τα οστά.

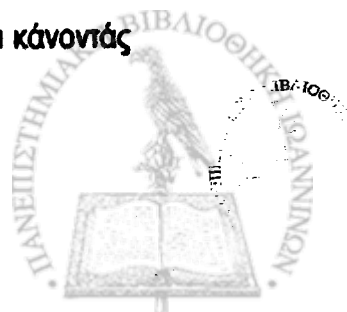
### 2.3.2 Αφυδάτωση

Ο σκοπός της αφυδάτωσης των δειγμάτων, είναι να αφαιρεθούν τα μόρια του νερού από αυτά. Η αφυδάτωση έγινε με τη χρήση διαλυμάτων αιθυλικής αλκοόλης διαφόρων συγκεντρώσεων σε νερό, και σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα παρέμειναν :

- α) Σε διάλυμα 50% αιθυλικής αλκοόλης για 15 λεπτά.
- β) Σε διάλυμα 70% αιθυλικής αλκοόλης για 15 λεπτά. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε 3 φορές.
- γ) Σε διάλυμα 90% αιθυλικής αλκοόλης για 30 λεπτά. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε 2 φορές.
- δ) Σε διάλυμα 100% αιθυλικής αλκοόλης για 30 λεπτά. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε 3 φορές.

### 2.3.3 Εμποτισμός

Ο εμποτισμός (ή στερέωση) των δειγμάτων έγινε με ρητίνη, τα μόρια της οποίας κατέλαβαν τα μεσοκυττάρια διαστήματα μέσα στα δείγματα, σταθεροποιώντας τη δομή τους και κάνοντάς τη ανθεκτική στις αλλοιώσεις κατά την κοπή τους σε υπέρλεπτες τομές.



Τα δείγματα για να δεχθούν τη ρητίνη εμποτίστηκαν 2 φορές και για 15 λεπτά τη φορά, σε οξείδιο του προπυλενίου (propylene oxide) της εταιρείας SERVA, το οποίο είναι διαλυτικό της ρητίνης και σε θερμοκρασία δωματίου.

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε μίγμα από οξείδιο του προπυλενίου και ρητίνης με αναλογία 1:1 και παρέμειναν σε αυτό, όλη νύχτα σε ανοιχτά φιαλίδια και σε θερμοκρασία δωματίου. Το οξείδιο του προπυλενίου ως ιδιαίτερα πηκτικό, εξατμίσθηκε και στα κενά σημεία των δειγμάτων παρέμεινε η ρητίνη.

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ειδικές κάψουλες και εγκλείσθηκαν με φρέσκο διάλυμα ρητίνης. Οι κάψουλες τοποθετήθηκαν σε φούρνο για 48 ώρες στους 60°C, ώστε να γίνει ο πολυμερισμός της ρητίνης και από υγρή να πάρει στερεά μορφή. Έτσι δημιουργήθηκε ένα στερεό τεμάχιο ρητίνης που στο άκρο του περιέχει δείγμα δέρματος ή οστών.

Για την παρασκευή της ρητίνης αναμίχθηκαν τα εξής υλικά:

12ml 2-Dodecenylsuccinic acid anhydride ή DDSA (C<sub>12</sub> H<sub>26</sub> O<sub>3</sub>) της εταιρείας SERVA.

4ml Araldite CY 212 της εταιρείας SERVA.

5ml Resin 812 της εταιρείας TAAB.

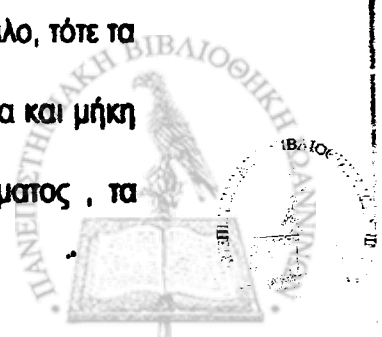
0,6ml Επιταχυντής DMP-30 (2,4,6-Tri(dimethylaminomethyl) phenol) της εταιρείας TAAB.



### 2.3.4 Κοπή λεπτών τομών

Στη συνέχεια το κόψιμο πολύ λεπτών τομών των δειγμάτων δέρματος και οστών έγινε με υπερμικροτόμο. Η κάψουλα της ρητίνης με το δείγμα τοποθετήθηκε στον υπερμικροτόμο (Ultra cut E) της εταιρείας REICHERT-JUNG και με διαμάντινο μαχαίρι κόπηκαν τομές πάχους από 40nm έως 90nm. Κριτήριο για το πάχος των τομών είναι το χρώμα τους μέσα στο υγρό στο οποίο συλλέχθηκαν, δηλαδή το νερό. Τομές με πάχος 40-50 nm έχουν χρώμα γκριζο, με πάχος 50-70 έχουν χρώμα ασημί και με πάχος 70-90nm έχουν χρώμα χρυσαφί. Οι τομές συλλέχθηκαν πάνω σε χάλκινα πλέγματα (grid), ώστε να είναι δυνατή η μεταφορά και ο χειρισμός τους. Τα πλέγματα αυτά τοποθετούνται στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και έτσι είναι δυνατή η παρατήρηση των δειγμάτων.

Το κόψιμο υπέρλεπτων τομών είναι βασική υπόθεση για την παρατήρηση των δειγμάτων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Η αρχή λειτουργίας του μικροσκοπίου βασίζεται στην σκέδαση των ηλεκτρονίων του, καθώς αυτά πέφτουν στο βιολογικό δείγμα. Τα ηλεκτρόνια που δεν σκεδάζονται διαπερνούν το δείγμα, πέφτουν σε φθορίζουσα οθόνη και σχηματίζουν τις φωτεινές περιοχές στην εικόνα, ενώ αυτά που δεν σκεδάστηκαν τις σκοτεινές. Οι τομές πρέπει να είναι τόσο λεπτές ώστε να μην ξεπερνούν το μέσο πάχος ενός ζωντανού κυττάρου, ειδάλλως τα ηλεκτρόνια του μικροσκοπίου δεν θα μπορέσουν να διαπεράσουν το δείγμα και έτσι αυτό θα είναι αδιαφανές. Αυτό γίνεται γιατί τα ηλεκτρόνια επιταχύνονται από δυναμικό 20KV έως 100KV οπότε το μήκος κύματός τους είναι τέτοιο που μόνο τομές μερικίων nm μπορούν να διαπερνούν. Άλλος σημαντικός λόγος που οι τομές πρέπει να είναι πολύ λεπτές είναι η μείωση του χρωματικού σφάλματος. Όταν το πάχος του δείγματος είναι μεγάλο, τότε τα ηλεκτρόνια που το διαπερνούν, αποκτούν μέσα σε αυτό διαφορετικές ταχύτητες άρα και μήκη κύματος. Έτσι λόγω των πολλαπλών αλληλεπιδράσεων με τα άτομα του δείγματος, τα



ηλεκτρόνια εστιάζονται σε διαφορετικά σημεία. Το αποτέλεσμα είναι η εμφάνιση ενός θολού ειδώλου.

### 2.3.5 Χρώση

Όπως ήδη έχει αναφερθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο, επειδή τα βιολογικά δείγματα αποτελούνται από υλικά χαμηλού ατομικού αριθμού, έχουν μικρή σκεδαστική ικανότητα, οπότε από μόνα τους παρουσιάζουν κατά την παρατήρησή τους στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο εικόνα με πολύ μικρή αντίθεση. Για εικόνες με κατάλληλες αντιθέσεις, τα βιολογικά δείγματα διαποτίζονται με βαριά μέταλλα, τα οποία αντιδρούν με τα φορτισμένα σωματίδια των δειγμάτων και έτσι ενσωματώνονται σε αυτά. Η παραπάνω διαδικασία είναι το τελευταίο στάδιο επεξεργασίας των δειγμάτων για την προετοιμασία τους για το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Οι υπέρλεπτες τομές που κόπηκαν με τη βοήθεια του υπερμικροτόμου χρώσθηκαν θετικά σε δυο στάδια. Πρώτα με φωσφοροβολφραμικό οξύ ( phosphotungstic acid, PTA) και έπειτα με οξικό ουρανύλιο ( uranyl acetate, UA).

α) Σε διάλυμα 2% PTA και  $pH = (3,2- 3,4)$ , το οποίο ρυθμίζεται με τη βοήθεια διαλύματος 1N NaOH, τα χάλκινα πλέγματα με τις τομές, παρέμειναν για 1 ώρα. Έπειτα ξεπλύθηκαν δυο φορές με απεσταγμένο νερό και στεγνώθηκαν μερικώς.

β) Σε διάλυμα 2% UA και  $pH = (4,2- 4,4)$ , το οποίο ρυθμίζεται με τη βοήθεια διαλύματος 0,1N NaOH, τα χάλκινα πλέγματα με τις τομές, παρέμειναν για 1/2 ώρα. Έπειτα ξεπλύθηκαν με απεσταγμένο νερό και στεγνώθηκαν καλά.



Οι τομές των δειγμάτων δέρματος και οστών είναι έτοιμες για παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

## 2.4 Ηλεκτρονική μικροσκοπία

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το JEOL JEM 100CX- II. Τα ηλεκτρόνιά του επιταχύνθηκαν σε δυναμικό 80 KV. Οι ηλεκτρονικές μικρογραφίες που πήραμε ήταν διαφόρων μεγεθύσεων από x8000- x53000. Οι ηλεκτρονικές μικρογραφίες μεγένθυσης 53000 χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση της περιοδικότητας των ινιδίων του κολλαγόνου.

Για τις ηλεκτρονικές μικρογραφίες χρησιμοποιήθηκαν αρνητικά Kodak (Kodak Electron microscope film Estar Thick Base 4489). Η εμφάνιση των αρνητικών έγινε σε υγρά Kodak: α) developer D-19 και β) fixer. Τα αρνητικά εμφανίστηκαν σε χαρτί kodak και η μεγέθυνση από το φιλμ στο φωτογραφικό χαρτί ήταν 2.2.

## 2.5 Ανάλυση των ηλεκτρονικών μικρογραφιών

Η ανάλυση των ηλεκτρονικών μικρογραφιών περιλαμβάνει την παρατήρηση της αρχιτεκτονικής των ινιδίων, τη μέτρηση της διαμέτρου και της περιόδου τους. Οι μετρήσεις έγιναν με τη χρήση ειδικών λογισμικών προγραμμάτων.



### 2.5.1 Αρχιτεκτονική των ινιδίων

Για τη μελέτη της αρχιτεκτονικής των ινιδίων οι ηλεκτρονικές μικρογραφίες που χρησιμοποιήθηκαν απεικόνιζαν περιοχές που περιείχαν ινίδια παράλληλα με τον άξονά τους. Οι μεγενθύνσεις των μικρογραφιών ήταν από x8000-x20000. Οι μικρογραφίες αυτές από το δέρμα και τα οστά των οστεοπορωτικών ζώων, συγκρίθηκαν με αντίστοιχες από τα φυσιολογικά ζώα. Η παρατήρηση τυχόν μεταβολών στη δομή των ινιδίων έγινε για όλες τις ομάδες των ζώων.

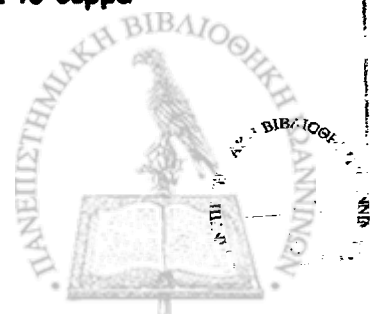
### 2.5.2 Μέτρηση της διαμέτρου των ινιδίων με τη χρήση λογισμικού

Για τη μέτρηση της διαμέτρου των ινιδίων οστών και δέρματος, φωτογραφήθηκαν περιοχές που περιείχαν κάθετες τομές. Με χρήση scanner υψηλής διακριτικής ικανότητας, οι περιοχές των ηλεκτρονικών μικρογραφιών αποθηκεύτηκαν σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Γνωρίζοντας τις μεγενθύνσεις από το μικροσκόπιο, από το φιλμ στο χαρτί της φωτογραφίας και την ανάλυση του scanner, μετατρέψαμε τις φαινομενικές διαστάσεις σε πραγματικές. Μέσω ρυθμίσεων του προγράμματος επεξεργασίας εικόνας, προσπαθήσαμε να πετύχουμε τη βέλτιστη αντίθεση (contrast) της ψηφιακής μικρογραφίας. Η εικόνα αυτή αποθηκεύτηκε ως eps αρχείο στη μνήμη του υπολογιστή. Για τον υπολογισμό της διαμέτρου των ινιδίων, χρησιμοποιήθηκε ειδικό λογισμικό το οποίο επεξεργάστηκε τμηματικά την εικόνα. Μέσω του προγράμματος, αποκλείσαμε τα ελάχιστα και μέγιστα εμβαδά ινιδίων κολλαγόνου τα οποία προφανώς ήταν είτε ηλεκτρονικός θόρυβος είτε συσσωματώματα ινιδίων τα οποία εξαιρέθηκαν από τις μετρήσεις μας και μετρήθηκαν ξεχωριστά. Επειδή πολλά ινίδια ήταν κολλημένα μεταξύ τους και επίσης το σχήμα πολλών δε θύμιζε τέλειο κύκλο, η εικόνα πέρασε από πολλά στάδια μέχρι να γίνει μετρήσιμη. Η εικόνα αυτόματα φιλτραρίστηκε, δίνοντας στα ινίδια κυκλικότερο σχήμα,



αφαιρώντας από την περιφέρειά τους γωνίες και τεθλασμένες που οφείλονται σε ηλεκτρονικούς θορύβους, γεμίζοντας τα τυχόν κενά μέσα στα ινίδια και διαχωρίζοντάς τα μεταξύ τους. Στο στάδιο που ακολούθησε, έγινε αυτόματα η επιλογή των ινιδίων που περιλήφθηκαν στις μετρήσεις, αφού ήδη είχαμε καθορίσει ελάχιστη και μέγιστη τιμή εμβαδού, εξαρτώμενη κάθε φορά από τις μετρούμενες φωτογραφίες. Η αυτόματη μέτρηση του εμβαδού κάθε ινιδίου έγινε σε pixels, στηριζόμενο στον κωδικό χρώματος των pixels, στην κλίμακα του γκριζου (0 μαύρο, 255 άσπρο). Το πρόγραμμα είχε παράλληλα, τη δυνατότητα να απορρίπτει ινίδια τα οποία προέρχονταν από συσσωματώσεις ή η «εικόνα» τους δεν ήταν «εικόνα» ινιδίου. Στις περιπτώσεις όπου το πρόγραμμα είχε αμφιβολία για το σχήμα ή το μέγεθος κάποιου ινιδίου, υπήρχε η δυνατότητα επιλογής από το χρήστη. Το εμβαδό μετρήθηκε σε pixels<sup>2</sup> και αυτόματα μετατράπηκε mm<sup>2</sup>. Δεχόμενοι ότι τα ινιδιά μας έχουν το σχήμα ενός τέλειου κύκλου, από το εμβαδό  $\pi r^2$ , υπολογίστηκε αυτόματα η τιμή της διαμέτρου τους. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων σώθηκαν ως αρχεία txt και επεξεργάστηκαν στατιστικά στο microsoft excel.

Για τις μετρήσεις της διαμέτρου των ινιδίων του δέρματος πάρθηκαν από κάθε ζώο 4 περίπου ηλεκτρονικές μικρογραφίες μεγένθυσης x16000 - x20000. Από κάθε ηλεκτρονική μικρογραφία μετρήθηκαν 300 περίπου τιμές διαμέτρων ινιδίων. Αντίστοιχα για τις μετρήσεις της διαμέτρου των ινιδίων του πορώδους και του φλοιώδους οστού, από κάθε ζώο χρησιμοποιήθηκαν περίπου 4 ηλεκτρονικές μικρογραφίες από πορώδες οστό και 4 από φλοιώδες οστό μεγένθυσης x16000 - x20000. Από κάθε ηλεκτρονική μικρογραφία μετρήθηκαν 100 περίπου τιμές διαμέτρων ινιδίων. Επειδή τα ζώα που αποτελούσαν την κάθε ομάδα ήταν 4-8 (Πίνακας 2.1) για κάθε ομάδα πάρθηκαν 4800-9600 μετρήσεις για το δέρμα και 1600-3200 για τα οστά.



Για κάθε ομάδα ζώων έγινε στατιστική ανάλυση και βρέθηκε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της διαμέτρου των ινιδίων του δέρματος, καθώς και του πορώδους και του φλοιώδους οστού. Μεταξύ των μέσων τιμών διαμέτρων ινιδίων φυσιολογικών και οστεοπορωτικών ζώων έγινε το unpaired t-test, που μας επιτρέπει να διαπιστώσουμε αν υπάρχει σημαντική στατιστική διαφορά ανάμεσά τους. Επίσης το τέστ αυτό έγινε και ανάμεσα σε ομάδες οστεοπορωτικών ζώων για να διαπιστωθούν στατιστικές διαφορές στις ομάδες των ζώων που υποβλήθηκαν σε ειδική διατροφή, στις ομάδες με διαφορετικούς χρόνους θανάτωσης καθώς και στις τιμές διαμέτρων ινιδίων πορώδους και φλοιώδους οστού. Η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση καθώς και το unpaired t-test, υπολογίστηκαν σε υπολογιστή του Εργαστηρίου μας σύμφωνα με τους Snedecor και Cochran (1967) και Hays (1988). Επίσης η σημασία της διαφοράς μεταξύ δυο συγκρινόμενων ομάδων υπολογίζεται, χρησιμοποιώντας την τιμή του  $p$ , ακολουθώντας τις στατιστικές μεθόδους που περιγράφονται από τους Snedecor και Cochran (1967).

### 2.5.3 Μέτρηση της περιόδου των ινιδίων

Για τη μέτρηση της περιοδικότητας των ινιδίων, πάρθηκαν ηλεκτρονικές μικρογραφίες παράλληλων ινιδίων σε μεγένθυση  $\times 53000$ . Μετρήθηκε η περιοδικότητα των ινιδίων του δέρματος των ομάδων των ζώων που θανατώθηκαν έξι εβδομάδες, ένα χρόνο μετά την ωθηκεκτομή και των αντίστοιχων φυσιολογικών. Επίσης μετρήθηκε η περιοδικότητα των ινιδίων πορώδους και φλοιώδους οστού, των ομάδων των ζώων που θανατώθηκαν ένα χρόνο μετά την ωθηκεκτομή και των αντίστοιχων φυσιολογικών. Οι ηλεκτρονικές μικρογραφίες μέσω scanner επεξεργάστηκαν από ειδικό λογισμικό πρόγραμμα, το οποίο βασίζεται στις



περιοδικές αλλαγές της έντασης κατά μήκος της ίνας. Τουλάχιστον 70 περίοδοι μετρήθηκαν για κάθε ομάδα ζώων.

ΑΠΟΦΑΣΙΣΤΟΡΙΑ

... ... ... ... ...

... ... ... ... ...

... ... ... ... ...

... ... ... ... ...

... ... ... ... ...

... ... ... ... ...

... ... ... ... ...

... ... ... ... ...

... ... ... ... ...

... ... ... ... ...



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3**

### **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

**3.1 Επιπτώσεις της ωθηκεκτομής στο κολλαγόνο του δέρματος και των οστών επίμυων που υποβλήθηκαν σε κανονική διατροφή.**

#### **3.1.1 Εισαγωγή**

Εξετάσθηκαν οι επιπτώσεις της ωθηκεκτομής στο κολλαγόνο των οστών και του δέρματος επίμυων που η διατροφή τους ήταν κανονική (δηλαδή  $Ca/P=1/1$ , βιταμίνη  $D=3000IU$ ) με τη χρήση της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα μαρτύρων ίδιας ηλικίας. Τα ζώα που εξετάσθηκαν θανατώθηκαν έξι εβδομάδες, έξι μήνες και δώδεκα μήνες μετά την ωθηκεκτομή. Μελετήθηκε η αρχιτεκτονική των ινιδίων του κολλαγόνου και με τη χρήση ειδικών λογισμικών που αναπτύχθηκαν στο Εργαστήριο Ιατρικής Φυσικής, μετρήθηκε η διάμετρος και η περιοδικότητα των ινιδίων, που είναι δυο πολύ χαρακτηριστικές δομικές παράμετροι.

#### **3.1.2 Αρχιτεκτονική των ινιδίων δέρματος και οστών**

Η μελέτη σε υπερμικροσκοπικό επίπεδο, έδειξε ότι η ωθηκεκτομή έχει επιδράσεις στην αρχιτεκτονική των ινιδίων του κολλαγόνου του δέρματος και των οστών σε όλες τις περιπτώσεις των επίμυων των πειραμάτων μας που θυσιάστηκαν διάφορους χρόνους μετά



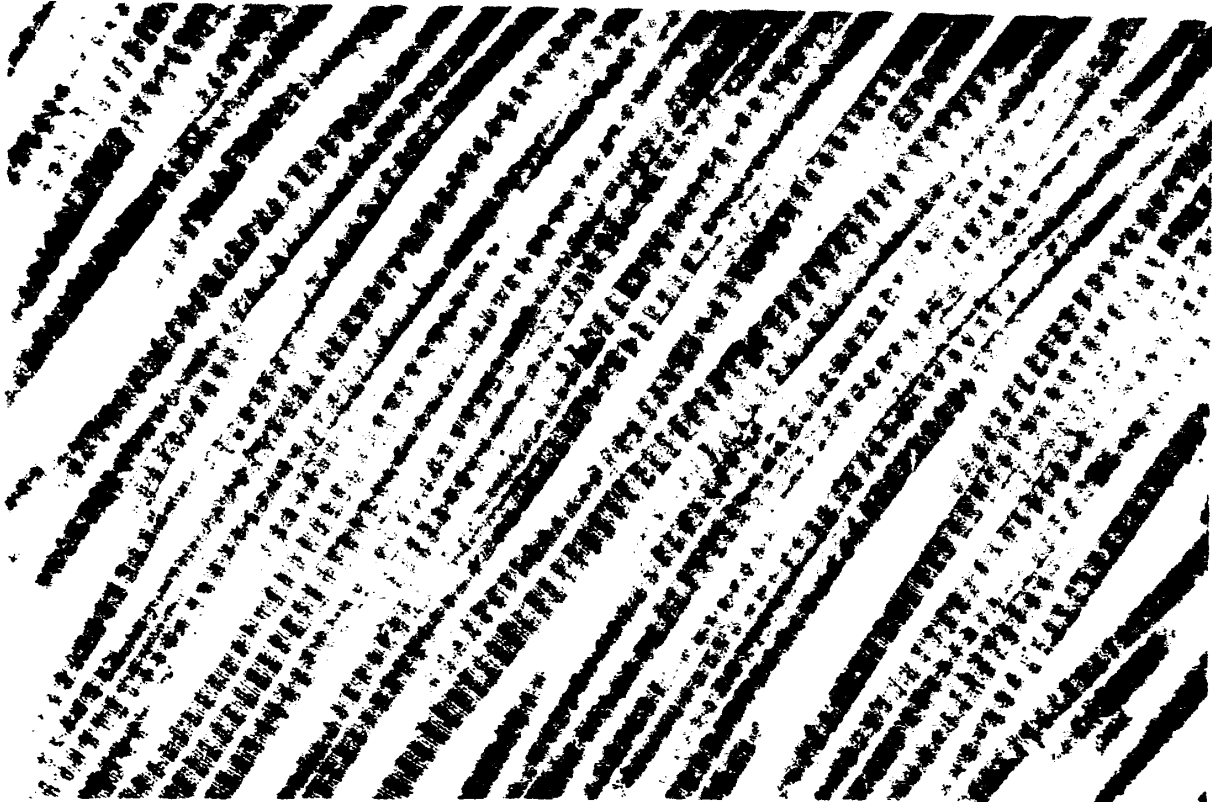
την ωθηκεκτομή. Η μελέτη της αρχιτεκτονικής, έγινε με ηλεκτρονικές μικρογραφίες που περιείχαν παράλληλες τομές ινιδίων.

Τα ινίδια δέρματος φυσιολογικού κολλαγόνου έχουν χαρακτηριστική μορφή. Είναι συγκροτημένα σε δέσμες και παράλληλα μεταξύ τους ενώ η διεύθυνση και η φορά τους μέσα στη δέσμη δεν αλλάζει σχήμα 3.1.

Εξετάζοντας δείγματα δέρματος πειραματόζων με ωθηκεκτομή στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, ανωμαλίες στην οργάνωση των ινών παρατηρήθηκαν από το πρώτο στάδιο των πειραμάτων, δηλαδή όταν οι επίμυες θανατώθηκαν 6 εβδομάδες μετά την ωθηκεκτομή. Σε αυτό το στάδιο, αν και η χαρακτηριστική παράλληλη διάταξη των ινιδίων σε πολλές περιοχές παραμένει, σε μερικές όμως χάνεται, ενώ παρατηρήθηκαν επίσης ίνες σε αταξία, να είναι διάσπαρτες μαζί με φυσιολογικές σχήμα 3.2.

Οι διαταραχές στην αρχιτεκτονική των ινιδίων του δέρματος, έγιναν εντονότερες στα μετέπειτα στάδια όταν ο χρόνος θανάτωσης ήταν 6 μήνες και 12 μήνες μετά την ωθηκεκτομή. Στα στάδια αυτά υπάρχουν περιοχές όπου τα ινίδια έχουν χάσει εντελώς τον παράλληλο προσανατολισμό τους σχήμα 3.3 α,β. Επίσης παρατηρήθηκαν περιοχές όπου και μεν η παράλληλη διάταξη των ινιδίων παραμένει, αλλά εμφανίζονται μερικά ινίδια με σημαντική κάμψη και σε μερικές περιπτώσεις τέτοια, ώστε να έχουμε αλλαγή διεύθυνσης κατά 180° (hairpin loop) σχήμα 3.4.





α



β

**Σχήμα 3.1:** α) Ηλεκτρονική μικρογραφία μεγένθυσης (x44000) με ινίδια φυσιολογικού κολλαγόνου δέρματος που είναι παράλληλα μεταξύ τους από επίμυα ηλικίας 15 μηνών

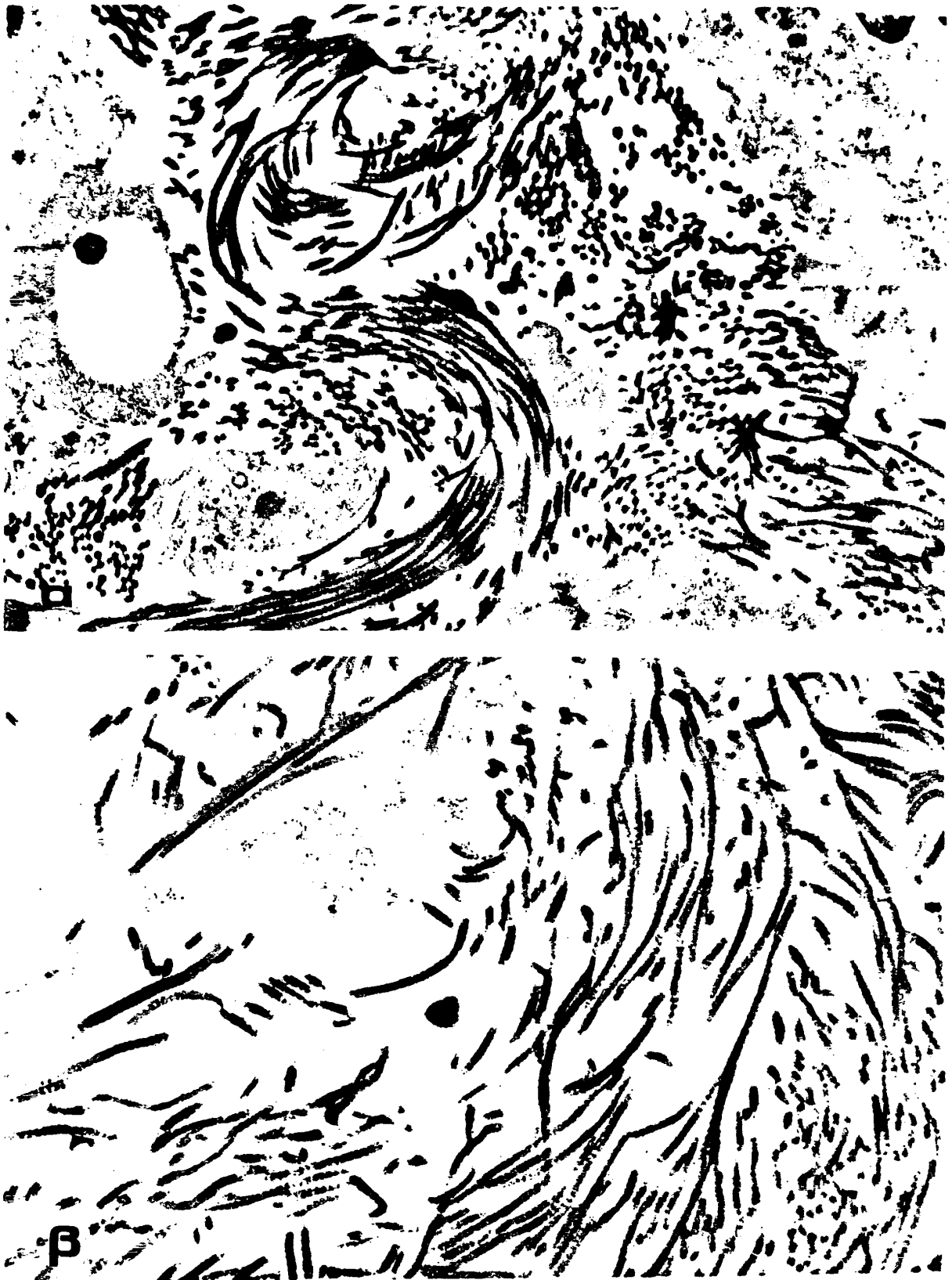
β) μεγενθυμένο τμήμα ινιδίου (x116600) όπου φαίνεται η περιοδικότητα και οι 12 σκούρες ταινίες κάθε περιόδου





Σχήμα 3.2: Ινίδια κολλαγόνου δέρματος από επίρμα που θανατώθηκε 6 εβδομάδες μετά την ωθηκεκτομή. Οι ανωμαλίες στην αρχιτεκτονική των ινιδίων είναι εμφανείς μιας και δεν ακολουθούν τη φυσιολογική παράλληλη διάταξη. Η ηλεκτρονική μικρογραφία είναι μεγένθυσης (x17600).

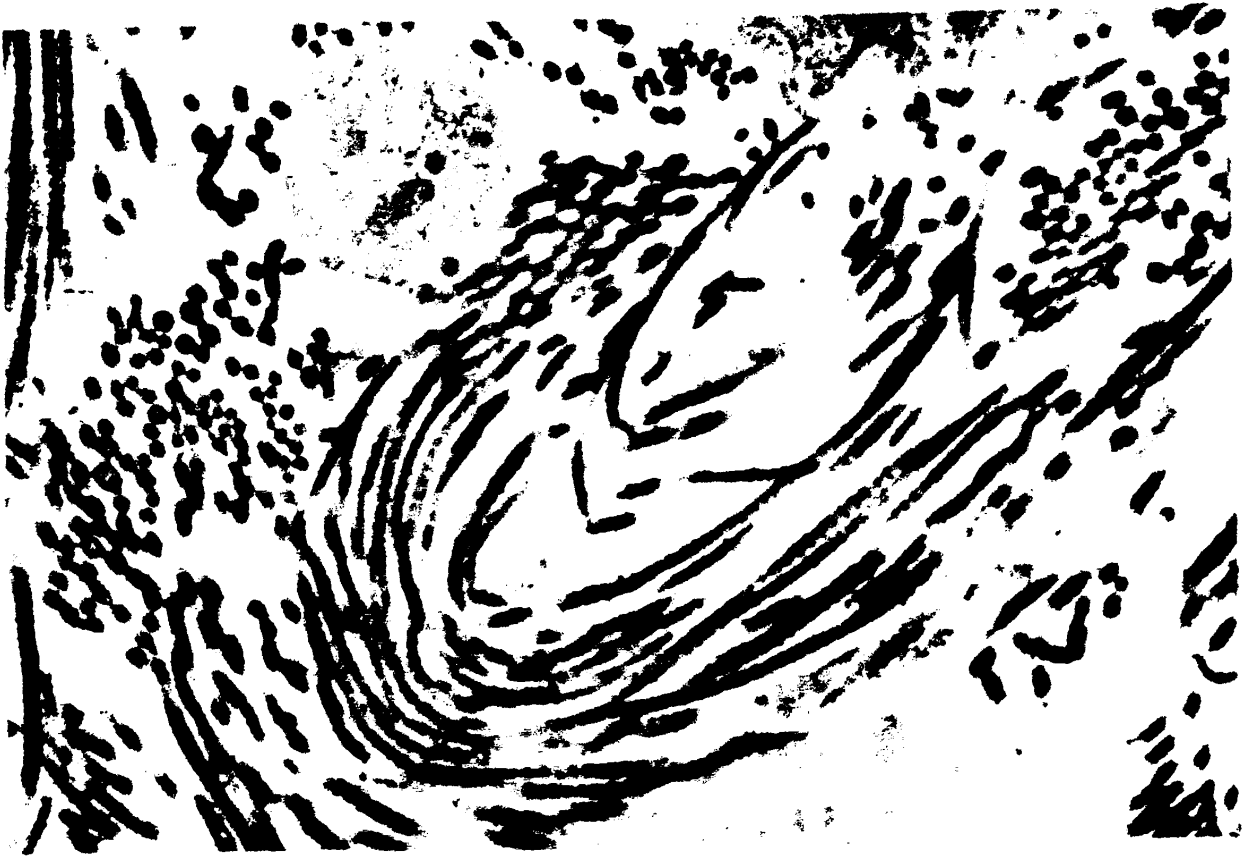




Σχήμα 3.3: Ηλεκτρονικές μικρογραφίες με περιοχές παράλληλων ινιδίων κολλαγόνου δέρματος από πειραματόζωα που θανατώθηκαν α) 6 μήνες (x17600) β) 12 μήνες (x22000) μετά την ωθηκεκτομή. Παρατηρούμε περιοχές με ινίδια που έχουν χάσει εντελώς τον προσανατολισμό τους.







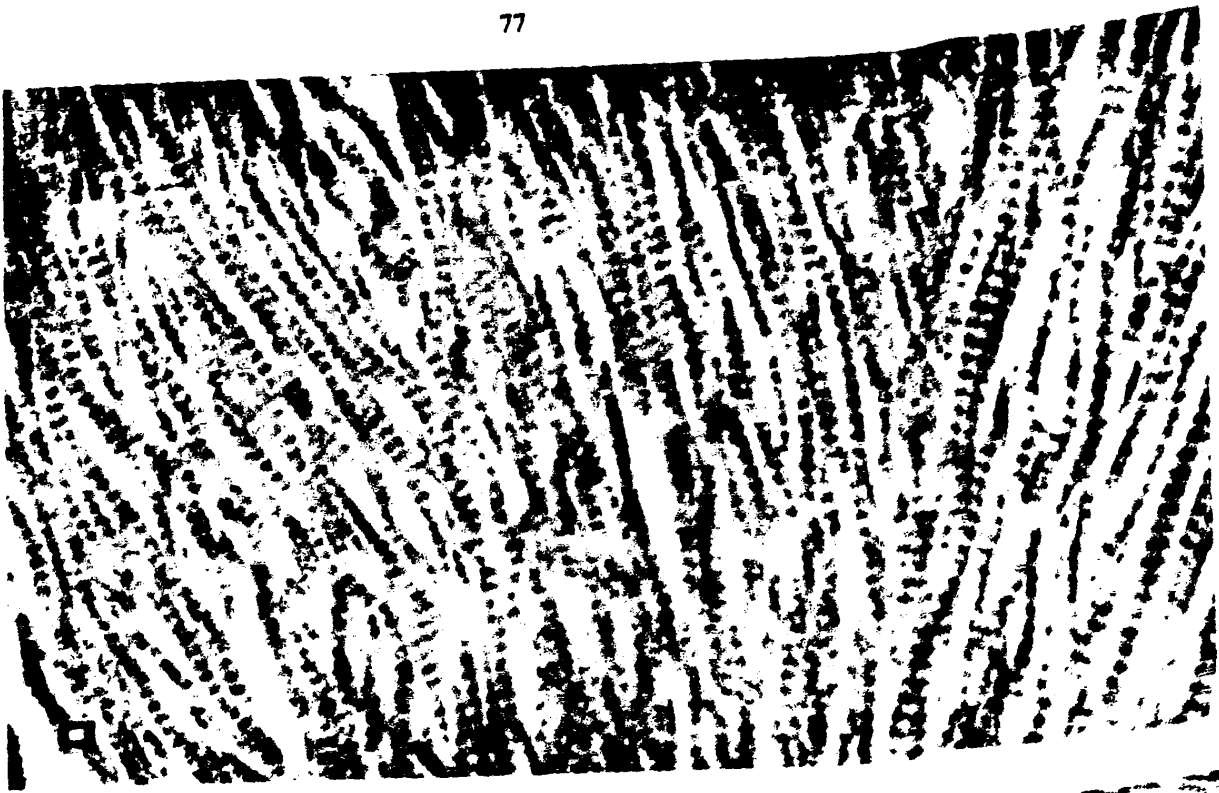
Σχήμα 3.4: Ηλεκτρονική μικρογραφία μεγέθυνσης (x35200) ινιδίων κολλαγόνου δέρματος από πειραματόζωο που θανατώθηκε 6 μήνες μετά την ωθηκεκτομή. Παρατηρούμε περιοχή με ινίδια που έχουν αλλαγή διεύθυνσης κατά  $180^\circ$  (hairpin loop).



Τα ινίδια κολλαγόνου φυσιολογικού πορώδους και φλοιώδους οστού δεν έχουν την ίδια αρχιτεκτονική διάταξη με αυτά του δέρματος. Οι περιοχές που επικρατούν είναι δυο τύπων. Ο πρώτος τύπος περιλαμβάνει ινίδια των οποίων η διάταξη είναι παράλληλη και μοιάζει με αυτή του δέρματος. Ο δεύτερος τύπος περιλαμβάνει ινίδια που δεν είναι οργανωμένα σε δέσμες και δεν ακολουθούν τη χαρακτηριστική παράλληλη διάταξη των ινιδίων του δέρματος, ούτε έχουν συγκεκριμένη φορά και διεύθυνση, σχήμα 3.5 α.

Ανιχνεύθηκαν μεταβολές στην αρχιτεκτονική των ινιδίων κολλαγόνου των οστών επίμυων με ωθηκεκτομή όλων των ομάδων. Παρατηρήθηκε ότι υπήρχαν περιοχές όπου η οργάνωση των ινιδίων ήταν ίδια με αυτή των φυσιολογικών, αλλά και όπου η αποδιοργάνωση των ινιδίων ήταν πολύ έντονη, σχήμα 3.5 β. Επίσης παρατηρήθηκαν και ινίδια με μεγάλη αλλαγή διεύθυνσης έως και  $180^\circ$  (hairpin loop) στις άκρες τους, σχήμα 3.5 γ.





χήμα 3.5: Ηλεκτρονικές μικρογραφίες με περιοχές παράλληλων ινιδίων κολλαγόνου οστών  
 από α) φλοιώδες φυσιολογικό οστό επίμυα 9 μηνών (x35200) β) φλοιώδες οστό επίμυα που  
 θανατώθηκε 6 εβδομάδες μετά την ωθηκεκτομή (x35200), παρατηρούμε έντονη  
 τοδιοργάνωση των ινιδίων γ) φλοιώδες οστό επίμυα που θανατώθηκε 6 εβδομάδες μετά την  
 ωθηκεκτομή (x17600), παρατηρούμε ινίδια που έχουν αλλαγή διεύθυνσης κατά  $180^\circ$  (hairpin  
 ιρ) στις άκρες τους.

### 3.1.3 Μορφομετρική ανάλυση

Η μορφομετρική ανάλυση των ινιδίων του κολλαγόνου του δέρματος και των οστών έγινε με τη μέτρηση της διαμέτρου τους από ηλεκτρονικές μικρογραφίες που περιείχαν εγκάρσιες τομές, με τη χρήση ειδικού λογισμικού προγράμματος.

Οι εγκάρσιες τομές ινιδίων κολλαγόνου φυσιολογικού δέρματος έχουν κυκλικό σχήμα σχεδόν ομοιογενές στον πληθυσμό των ινιδίων όπου οι διακυμάνσεις στις τιμές της διαμέτρου τους δεν είναι μεγάλες. Το ίδιο ισχύει και για τα ινίδια φυσιολογικού κολλαγόνου πορώδους και φλοιώδους οστού.

Η διάμετρος των ινιδίων κολλαγόνου δέρματος επίμυων που υποβλήθηκαν σε ωθηκεκτομή όλων των ομάδων, είναι στατιστικά σημαντικά ( $p < 0.001$ ) μικρότερη από εκείνη των αντίστοιχων φυσιολογικών σε όλες τις περιπτώσεις θανάτωσης. Ο πίνακας 3.1 περιέχει τιμές μέσης διαμέτρου ινιδίων κολλαγόνου δέρματος οστεοπορωτικών και φυσιολογικών επίμυων, στις διάφορες ηλικίες και την τυπική απόκλιση τους. Από κάθε ζώο μελετήθηκαν τουλάχιστον περίπου 4 ηλεκτρονικές μικρογραφίες. Από κάθε ηλεκτρονική μικρογραφία μετρήθηκαν 300 περίπου τιμές διαμέτρων ινιδίων. Έτσι από κάθε ομάδα ζώων που περιέχει 6 ζώα πάρθηκαν 7000 τιμές διαμέτρων ινιδίων. Ο αριθμός τιμών διαμέτρων είναι ίδιος στους μάρτυρες. Επίσης στον πίνακα 3.1 γίνεται στατιστική σύγκριση των αποτελεσμάτων προερχομένων από πειραματόζωα που υποβλήθηκαν σε ωθηκεκτομή, με εκείνα από μάρτυρες, χρησιμοποιώντας, όπως αναφέρθηκε στο 2 κεφάλαιο, το unpaired t-test.



**Πίνακας 3.1:** Οι επιπτώσεις της ωθηκετομής στα ινίδια κολλαγόνου δέρματος: η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της διαμέτρου των ινιδίων πειραματόζων που υποβλήθηκαν σε ωθηκετομή και θυσιάστηκαν σε διάφορους χρόνους μετά την επέμβαση, συγκρίνεται με αυτή των μαρτύρων αντίστοιχης ηλικίας.

Μέση τιμή και τυπική απόκλιση της διαμέτρου ινιδίων κολλαγόνου δέρματος (nm)			
Χρόνος θανάτωσης των πειριζων μετά την ωθηκετομή	Πειριζωα που υποβλήθηκαν σε ωθηκετομή	Μάρτυρες αντίστοιχης ηλικίας	Unpaired t-test μεταξύ πειριζων και μαρτύρων
6 εβδομάδες	100.6±13.8	106.9±12.0	p<0.001
6 μήνες	75.9±8.4	108.3±13.0	p<0.001
12 μήνες	88.7±13.3	108.2±10.9	p<0.001

\* Οι μέσες τιμές των διαμέτρων των ινιδίων κάθε ομάδας προκύπτουν από τουλάχιστον 7000 τιμές διαμέτρων ινιδίων.



Η διάμετρος των ινιδίων του κολλαγόνου πορώδους και φλοιώδους οστού επίμυων που υποβλήθηκαν σε ωθηκεκτομή όλων των ομάδων, είναι στατιστικά σημαντικά ( $p < 0.001$ ) μικρότερη από εκείνη των αντίστοιχων φυσιολογικών. Οι πίνακες 3.2 και 3.3 περιέχουν τιμές μέσης διαμέτρου ινιδίων κολλαγόνου πορώδους και φλοιώδους οστού, αντίστοιχα, οστεοπορωτικών και φυσιολογικών ζώων στις διάφορες ηλικίες καθώς και την τυπική απόκλισή τους. Επίσης περιέχονται και τα αποτελέσματα του unpaired t-test για τις αντίστοιχες ομάδες. Από κάθε ζώο μελετήθηκαν 4 ηλεκτρονικές μικρογραφίες. Από κάθε μικρογραφία μετρήθηκαν 100 περίπου ινίδια. Έτσι από κάθε ομάδα ζώων που περιέχει 6 περίπου ζώα πάρθηκαν 2400 τιμές διαμέτρων ινιδίων. Ο αριθμός διαμέτρων ινιδίων είναι ίδιος στους μάρτυρες.

Οι επιπτώσεις της ωθηκεκτομής στο κολλαγόνο, με το πέρασμα του χρόνου μετά την επέμβαση, γίνονται όλο και πιο έντονες. Αυτό επιβεβαιώνεται τόσο από τις μορφολογικές παρατηρήσεις όσο και από τη μορφομετρική ανάλυση. Για παράδειγμα, αν συγκρίνουμε τις τιμές των διαμέτρων των ινιδίων στο πορώδες οστό, η μέση διάμετρος των ινιδίων των επίμυων που θυσιάστηκαν 12 μήνες μετά την ωθηκεκτομή  $48.1 \pm 5.5 \text{ nm}$  είναι στατιστικά σημαντικά  $p < 0.001$  μικρότερη από αυτή των επίμυων που θυσιάστηκαν 6 μήνες μετά την επέμβαση  $49.6 \pm 5.8 \text{ nm}$ . Στο φλοιώδες οστό, η μέση διάμετρος των ινιδίων των επίμυων που θυσιάστηκαν 12 μήνες μετά την ωθηκεκτομή  $48.4 \pm 4.8 \text{ nm}$  είναι στατιστικά σημαντικά  $p < 0.005$  μικρότερη από αυτή των επίμυων που θυσιάστηκαν 6 εβδομάδες μετά την επέμβαση  $49.4 \pm 4.5 \text{ nm}$ .



**Πίνακας 3.2:** Οι επιπτώσεις της ωθηκεκτομής στα ινίδια κολλαγόνου του πορώδους οστού: η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της διαμέτρου των ινιδίων πειραματόζων που υποβλήθηκαν σε ωθηκεκτομή και θυσιάστηκαν σε διάφορους χρόνους μετά την επέμβαση, συγκρίνεται με αυτή των μαρτύρων αντίστοιχης ηλικίας.

Μέση τιμή και τυπική απόκλιση της διαμέτρου ινιδίων κολλαγόνου πορώδους οστού (nm)			
Χρόνος θανάτωσης των πειρ/ζων μετά την ωθηκεκτομή	Πειρ/ζωα που υποβλήθηκαν σε ωθηκεκτομή	Μάρτυρες αντίστοιχης ηλικίας	Unpaired t-test μεταξύ πειρ/ζων και μαρτύρων
6 εβδομάδες	49.1 ± 3.8	51.2 ± 6.1	p<0.001
6 μήνες	49.6 ± 5.8	52.1 ± 7.5	p<0.001
12 μήνες	48.1 ± 5.5	53.2 ± 4.9	p<0.001

\* Οι μέσες τιμές των διαμέτρων των ινιδίων κάθε ομάδας προκύπτουν από τουλάχιστον 2400 τιμές διαμέτρων ινιδίων.



**Πίνακας 3.3:** Οι επιπτώσεις της ωθηκεκτομής στα ινίδια κολλαγόνου του φλοιώδους οστού: η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της διαμέτρου των ινιδίων πειραματόζων που υποβλήθηκαν σε ωθηκεκτομή και θυσιάστηκαν σε διάφορους χρόνους μετά την επέμβαση, συγκρίνεται με αυτή των μαρτύρων αντίστοιχης ηλικίας.

Μέση τιμή και τυπική απόκλιση της διαμέτρου ινιδίων κολλαγόνου φλοιώδους οστού (nm)			
Χρόνος θανάτωσης των πειριζων μετά την ωθηκεκτομή	Πειριζωα που υποβλήθηκαν σε ωθηκεκτομή	Μάρτυρες αντίστοιχης ηλικίας	Unpaired t-test μεταξύ πειριζων και μαρτύρων
6 εβδομάδες	49.4± 4.5	51.6± 5.3	p<0.001
6 μήνες	49.2± 5.0	51.8± 6.5	p<0.001
12 μήνες	48.4± 4.8	52.9± 5.5	p<0.001

\* Οι μέσες τιμές των διαμέτρων των ινιδίων κάθε ομάδας προκύπτουν από τουλάχιστον 2400 τιμές διαμέτρων ινιδίων.





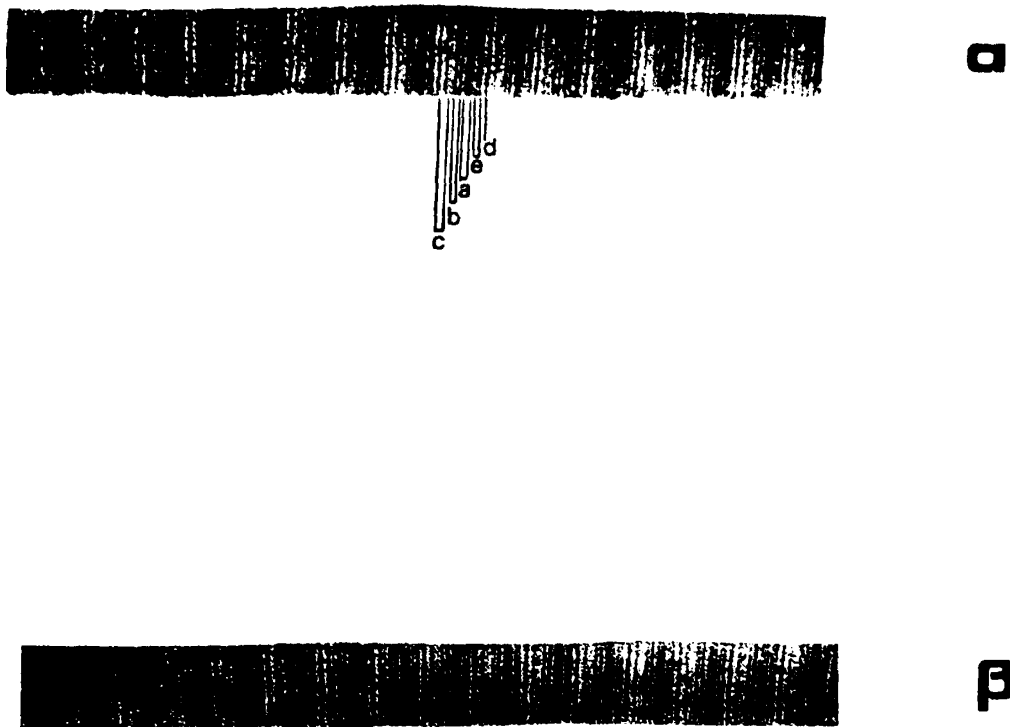
### 3.1.4 Ανάλυση εικόνας – Μέτρηση της περιοδικότητας των ινιδίων

Για να εξετάσουμε αν τα ινίδια του κολλαγόνου του δέρματος και των οστών επίμυων που υποβλήθηκαν σε ωθηκεκτομή, διατηρούν τη φυσιολογική ταινιωτή περιοδικότητά τους κατά μήκος του άξονά τους, χρησιμοποιήσαμε ηλεκτρονικές μικρογραφίες μεγάλης μεγένθυσης από περιοχές που περιείχαν παράλληλα ινίδια και τις συγκρίναμε με αυτές από μάρτυρες αντίστοιχης ηλικίας. Το πρώτο στάδιο σύγκρισης ήταν μια οπτική συσχέτιση των μικρογραφιών, ενώ στο δεύτερο στάδιο, με χρήση ειδικού λογισμικού προγράμματος, μετρήθηκε η περιοδικότητα.

Στο σχήμα 3.6 γίνεται σύγκριση ενός ταινιωτού τμήματος ινιδίου δέρματος από φυσιολογικό επίμυα σχήμα 3.6 α, με αντίστοιχο επίμυα με ωθηκεκτομή σχημα 3.6 β. Η περιοδικότητα  $D$  κατά μήκος του άξονα του παθολογικού ινιδίου παραμένει. Παρατηρήθηκε ότι όλα τα ινίδια συμπεριλαμβανομένων και των τμημάτων όπου παρατηρείται η αποδιοργάνωση, διατηρούν τη φυσιολογική ταινιωτή περιοδικότητά τους και ότι αυτό ισχύει για όλες τις ομάδες των πειραματόζων με ωθηκεκτομή ακόμα και σε αυτή όπου ο χρόνος θανάτωσης ήταν 12 μήνες μετά την επέμβαση. Ο έλεγχος αυτός είναι ενδεικτικός, για την ύπαρξη ή μη αλλοιώσεων του προσανατολισμού των μορίων μέσα στο ινίδιο, καθώς και για τις αλληλεπιδράσεις των μορίων. Η ύπαρξη αυτής της περιοδικότητας, αποδίδεται στη συγκέντρωση των μορίων μέσα στο ινίδιο, σε σχεδόν παράλληλη διάταξη και στην αξονική μετατόπισή τους κατά μια σταθερή απόσταση  $D$  ή ακέραια πολλαπλάσιά της (Hulmes et al., 1973).

Η ύπαρξη της περιοδικότητας ισχύει και για τα ινίδια κολλαγόνου του πορώδους και φλοιώδους οστού όλων των ομάδων των οστεοπορωτικών επίμυων. Όλα αυτά οδηγούν στη διαπίστωση ότι η προκλητή οστεοπόρωση με ωθηκεκτομή δεν αλλοιώνει τη φυσιολογική αξονική σχέση μεταξύ των μορίων στα ινίδια δέρματος και οστών των επίμυων.



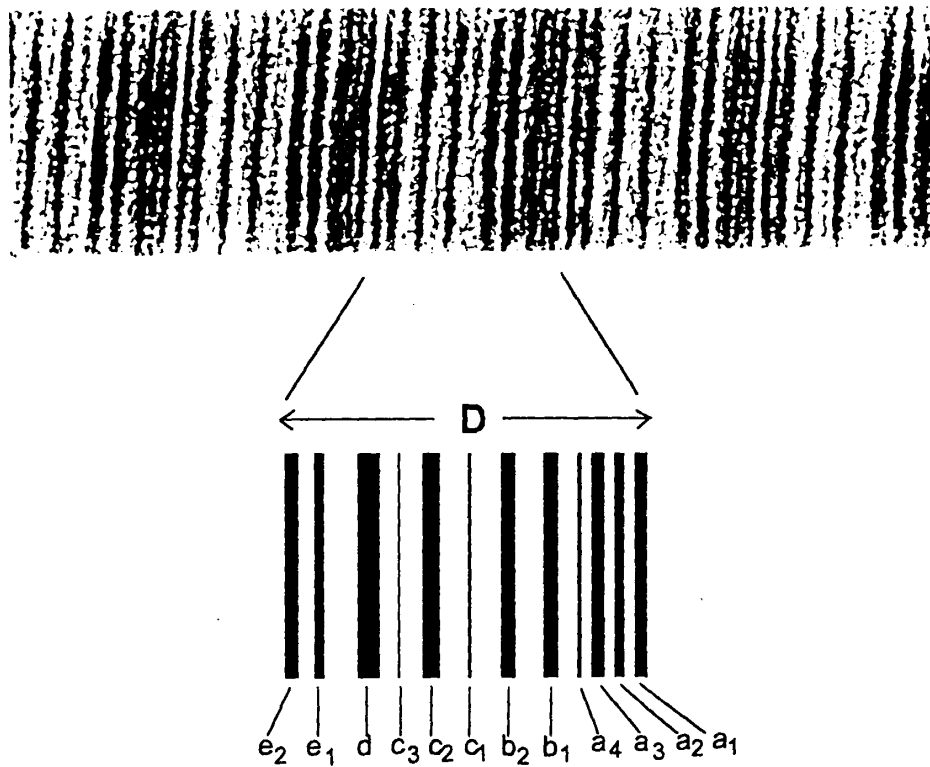


**Σχήμα 3.6:** Ηλεκτρονικές μικρογραφίες ταινιωτών τμημάτων ινιδίων κολλαγόνου δέρματος σε μεγάλη μεγέθυνση (x116600) α) ινίδιο από κολλαγόνο φυσιολογικού επίμυα β) ινίδιο από κολλαγόνο επίμυα αντίστοιχης ηλικίας που θανατώθηκε 12 μήνες μετά την ωσθηκεκτομή. Παρατηρούμε ότι το παθολογικό ινίδιο διατηρεί τη φυσιολογική ταινιωτή περιοδικότητά του.

Η ταινιωτή μορφή των ινιδίων είναι αποτέλεσμα της θετικής τους χρώσης. Οι σκούρες ταινίες που εμφανίζονται, οφείλονται στις αλληλεπιδράσεις των φορτισμένων αμινοξέων με τα μεταλλικά ιόντα της χρώσης. Μια περίοδος D φυσιολογικού κολλαγόνου, περιέχει 12 σκούρες ταινίες (Charman, 1974). Στο σχήμα 3.6 α φαίνεται σε μια περίοδο D η ονομασία των ταινιών σύμφωνα με την κλασσική ονοματολογία (Hodge and Schmitt, 1960). Στα φυσιολογικά ινίδια οι τέσσερις ταινίες α που είναι πολύ κοντά μεταξύ τους, είναι ενδεικτικές για τη διακριτική ικανότητα του ταινιωτού δείγματος. Έτσι, αν μειωθεί η διακριτική ικανότητα εξ αιτίας κάποιου παράγοντα, οι πρώτες γραμμές που θα επηρεαστούν θα είναι αυτές. Η οπτική σύγκριση των ινιδίων του σχήματος 3.6, μας δείχνει ότι οι περισσότερες ταινίες του ινιδίου από οστεοπορωτικό ζώο, φαίνονται καθαρά, όμως η διακριτική ικανότητα κυρίως στην περιοχή όπου υπάρχουν οι ταινίες α, είναι περιορισμένη. Το φαινόμενο αυτό συμβαίνει και σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (Tzaphlidou et al., 1991a), σε κολλαγόνο από ιστό που έχει δεχθεί γ-ακτινοβολία (Tzaphlidou et al., 1991b) και σε ποντικούς υπο την επίδραση λιθίου (Kounadi et al., 1994). Γιατί συμβαίνει αυτό, δεν είναι ακόμη γνωστό. Το φαινόμενο αυτό βρίσκεται υπό έρευνα στο Εργαστήριο Ιατρικής Φυσικής. Ίσως η ωθηκεκτομή, να κάνει τους ιστούς και τα μακρομόρια που βρίσκονται γύρω από το κολλαγόνο, πιο συμπαγείς με συνέπεια τη μείωση της διακριτικής ικανότητας στο κολλαγόνο.

Μετρήθηκε η περιοδικότητα D των ινιδίων από τους οστεοπορωτικούς επίμυες και από τους μάρτυρες, με ειδικό λογισμικό πρόγραμμα το οποίο βασίζεται στις περιοδικές αλλαγές της έντασης των σκούρων ταινιών της θετικής χρώσης του δείγματος κατά μήκος του ινιδίου σχήμα 3.7. Η περιοδικότητα, όπως αυτή μετρήθηκε από το ειδικό λογισμικό πρόγραμμα, έδειξε μια συρρίκνωση των ιστών από ωθηκεκτομή, σε σχέση με τους μάρτυρες. Στα ινίδια του κολλαγόνου του δέρματος, η συρρίκνωση αυτή παρατηρήθηκε από τα πρώτα στάδια του πειράματος, δηλαδή σε επίμυες που θανατώθηκαν 6 εβδομάδες μετά την ωθηκεκτομή αλλά





Σχήμα 3.7: Υπόδειγμα θετικής χρώσης ινιδίου κολλαγόνου και η ονομασία των 12 σκούρων ταινιών σε μια περίοδο D σύμφωνα με την κλασική ονοματολογία (Hodge and Schmitt).



και στους επίμυες με χρόνο θανάτωσης 12 μήνες μετά την ωθηκεκτομή και ήταν στατιστικά σημαντική ( $p < 0.001$ ). Ο πίνακας 3.4 περιέχει μέσες τιμές περιοδικότητας, την τυπική απόκλιση τους και τα αποτελέσματα του unpaired t-test μεταξύ των ομάδων των μαρτύρων και των οστεοπορωτικών επίμυων. Τουλάχιστον 70 περίοδοι μετρήθηκαν από κάθε ομάδα ζώων.

**Πίνακας 3.4:** Οι επιπτώσεις της ωθηκεκτομής στην περιοδικότητα ινιδίων κολλαγόνου δέρματος: η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της περιοδικότητας των ινιδίων επίμυων με ωθηκεκτομή που θυσιάστηκαν έξι εβδομάδες, 12 μήνες μετά την επέμβαση συγκρίνεται με αυτή των μαρτύρων αντίστοιχης ηλικίας.

Μέση τιμή και τυπική απόκλιση της περιοδικότητας ινιδίων κολλαγόνου δέρματος (nm)			
Χρόνος θανάτωσης των πειρ/ζωνών μετά την ωθηκεκτομή	Πειρ/ζωα που υποβλήθηκαν σε ωθηκεκτομή	Μάρτυρες αντίστοιχης ηλικίας	Unpaired t-test μεταξύ πειρ/ζωνών και μαρτύρων
6 εβδομάδες	55.6 ± 5.3	58.5 ± 3.9	p < 0.001
12 μήνες	56.9 ± 3.3	60.0 ± 2.9	p < 0.001

\* Οι μέσες τιμές της περιοδικότητας των ινιδίων κάθε ομάδας προκύπτουν από τουλάχιστον 70 τιμές περιοδικότητας ινιδίων.



Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στα οστά όπου για κάθε μέση τιμή του D μετρήθηκαν τουλάχιστον 70 περίοδοι. Η μέση τιμή για το D ινιδίων κολλαγόνου φλοιώδους οστού επίμυων που θανατώθηκαν 12 μήνες μετά την ωθηκεκτομή, ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότερη ( $p < 0.001$ ) από την αντίστοιχη των φυσιολογικών.

**Πίνακας 3.5:** Οι επιπτώσεις της ωθηκεκτομής στην περιοδικότητα ινιδίων κολλαγόνου πορώδους και φλοιώδους οστού: η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της περιοδικότητας των ινιδίων επίμυων με ωθηκεκτομή που θυσιάστηκαν 12 μήνες μετά την επέμβαση συγκρίνεται με αυτή των μαρτύρων αντίστοιχης ηλικίας.

Μέση τιμή και τυπική απόκλιση της περιοδικότητας ινιδίων κολλαγόνου οστών επίμυων με χρόνο θανάτωσης 12 μήνες μετά την ωθηκεκτομή και των αντίστοιχων μαρτύρων (nm).			
	Πειρ/ζωα με ωθηκεκτομή	Μάρτυρες αντίστοιχης ηλικίας	Unpaired t-test μεταξύ πειρ/ζωων και μαρτύρων
Πορώδες οστό	55.6 ± 5.3	58.5 ± 3.9	$p < 0.001$
Φλοιώδες οστό	56.9 ± 3.3	60.0 ± 2.9	$p < 0.001$

\* Οι μέσες τιμές της περιοδικότητας των ινιδίων κάθε ομάδας προκύπτουν από τουλάχιστον 70 τιμές περιοδικότητας ινιδίων.



## 3.2 Επιπτώσεις της ειδικής διατροφής στο κολλαγόνο των οστών επίμυων που υποβλήθηκαν σε ωθηκεκτομή

### 3.2.1 Εισαγωγή

Στο στάδιο αυτό του πειράματος, εξετάσαμε πώς η ειδική διατροφή μπορεί να επηρεάσει τις επιπτώσεις της οστεοπόρωσης στο κολλαγόνο των οστών. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα των οστεοπορωτικών επίμυων ίδιας ηλικίας που υποβλήθηκαν σε κανονική διατροφή, καθώς και με αυτά των αντίστοιχων μαρτύρων. Η κανονική διατροφή περιλαμβάνει: 3000 IU βιταμίνης D και λόγο Ca/P=1/1. Μελετήθηκε η αρχιτεκτονική των ινιδίων και με τη χρήση ειδικού λογισμικού μετρήθηκε η διάμετρος τους. Οι επίμυες που χρησιμοποιήθηκαν είχαν χρόνο θανάτωσης 6 μήνες μετά την ωθηκεκτομή και ήταν χωρισμένοι ανάλογα με το είδος της διατροφής τους σε τρεις ομάδες:

- 1) Επίμυες με εμπλουτισμένη διατροφή σε βιταμίνη D σε ποσότητα 5000 IU και λόγο Ca/P=1/1.
- 2) Επίμυες με εμπλουτισμένη διατροφή σε ασβέστιο με λόγο Ca/P=2/1 και ποσότητα βιταμίνης D 3000 IU.
- 3) Επίμυες με εμπλουτισμένη διατροφή σε ασβέστιο και βιταμίνη D, με λόγο 2/1 και 5000 IU αντίστοιχα.

Η ειδική διατροφή των ωθηκεκτετημένων επίμυων άρχισε 6 εβδομάδες μετά την επέμβαση και είχε διάρκεια 80 ημέρες.



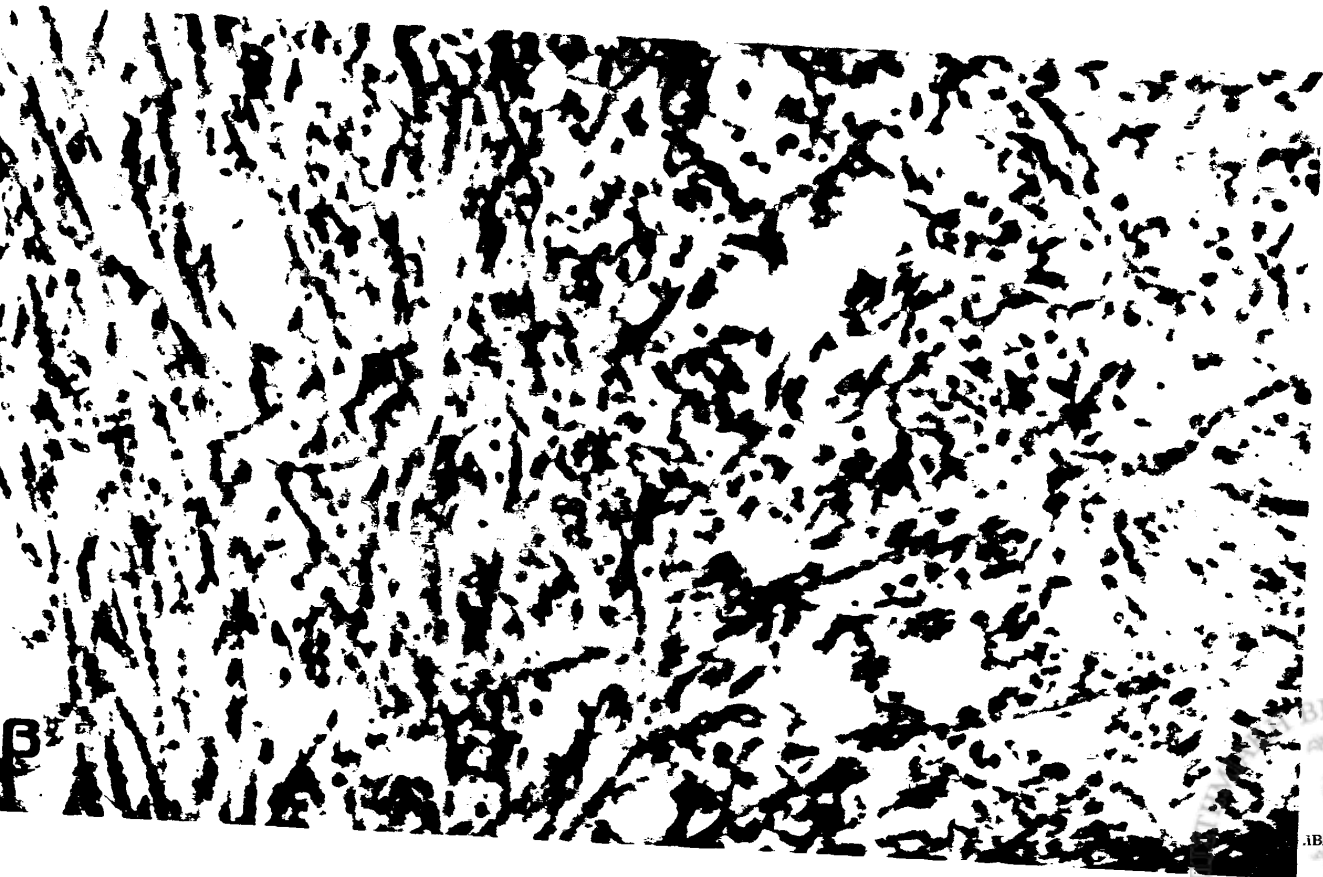
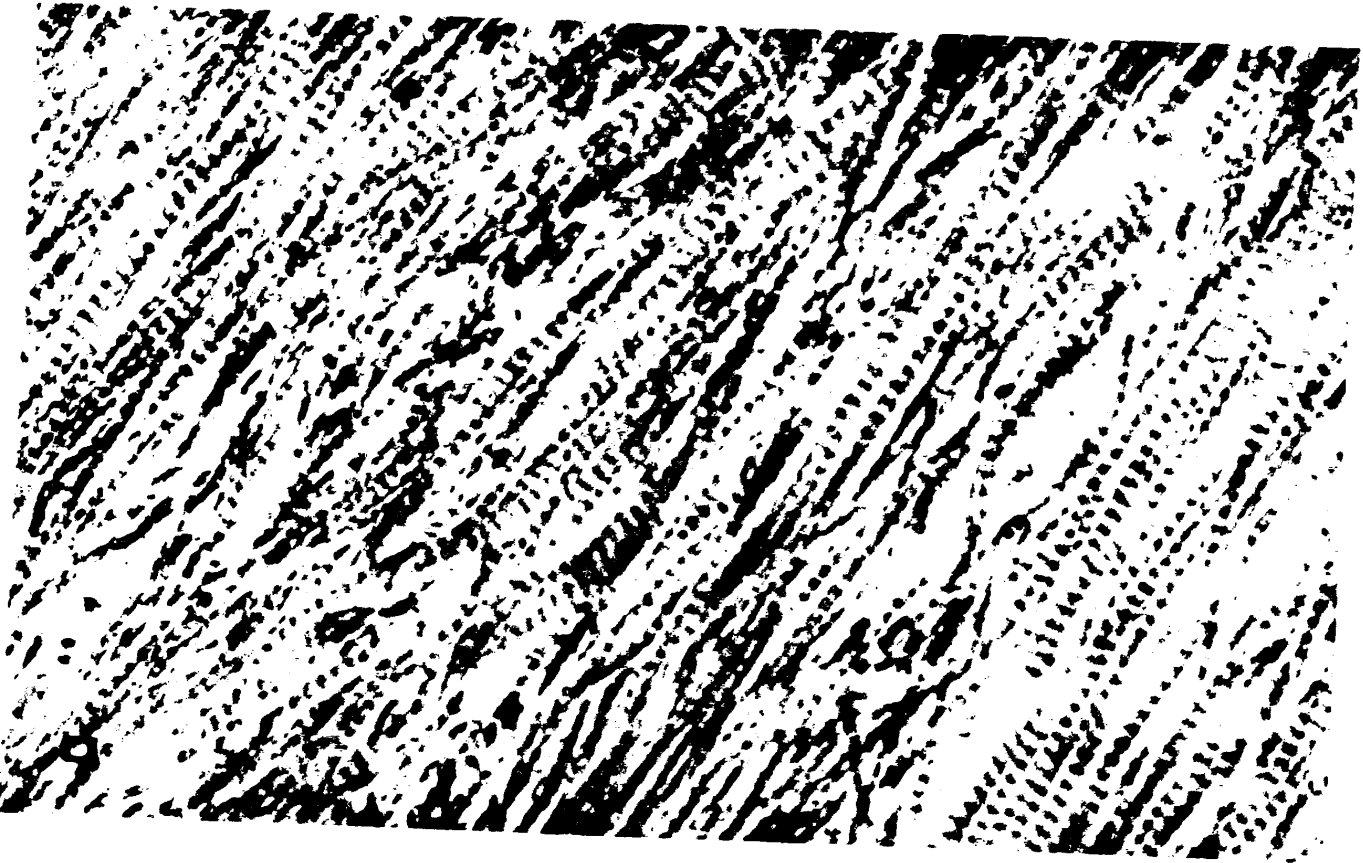
### 3.2.2 Αρχιτεκτονική των ινιδίων

Όπως διαπιστώθηκε στα προηγούμενα πειράματά μας, η ωθηκεκτομή είχε δομικές επιπτώσεις στα ινίδια του κολλαγόνου των οστών των επίμυων που θανατώθηκαν 6 μήνες μετά την επέμβαση. Οι ανωμαλίες που διαπιστώθηκαν στην οργάνωση των ινιδίων στο πορώδες και στο φλοιώδες οστό, είναι παρόμοιες, γι' αυτό και τα συμπεράσματα που διαπιστώσαμε αναφέρονται γενικά στα οστά.

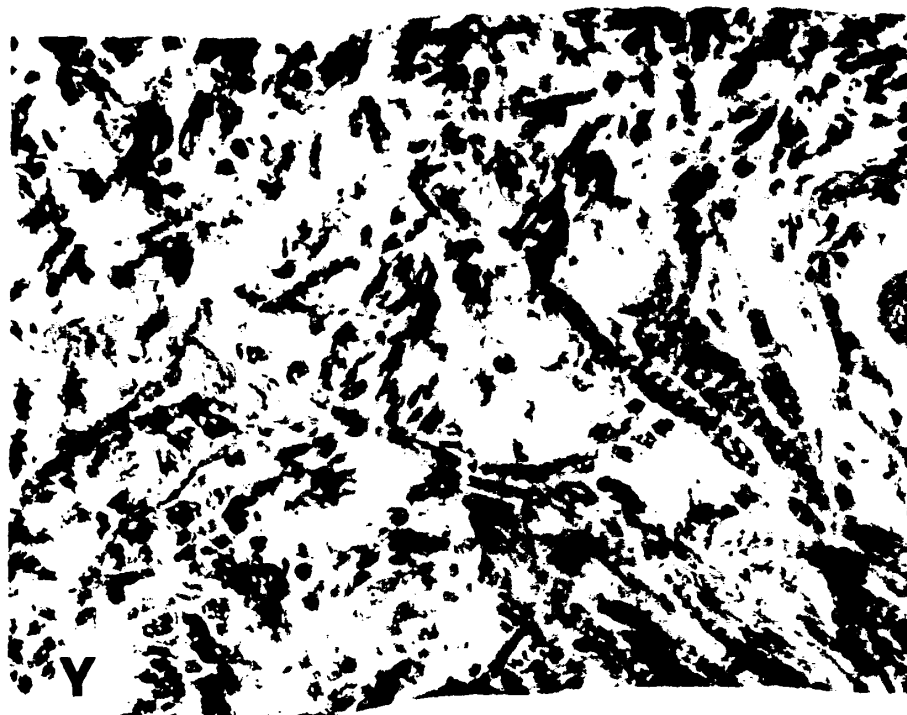
Στην ομάδα των επίμυων όπου το διαιτολόγιο περιελάμβανε διατροφή εμπλουτισμένη μόνο με βιταμίνη D, 5000IU, η αποδιοργάνωση των ινιδίων που επέφερε η ωθηκεκτομή, παρέμεινε, σχήμα 3.8γ. Οι επιπτώσεις της ωθηκεκτομής ήταν λιγότερο εμφανείς στην ομάδα των επίμυων όπου η διατροφή τους ήταν εμπλουτισμένη με ασβέστιο Ca/P=2/1. Στην περίπτωση αυτή, η οργάνωση των ινιδίων δεν ήταν σε μεγάλη αταξία σχήμα 3.8δ. Όταν το διαιτολόγιο των επίμυων, περιελάμβανε συνδυασμό εμπλουτισμένης διατροφής με βιταμίνη D και ασβέστιο, η οργάνωση των ινιδίων ήταν παρόμοια με εκείνη των φυσιολογικών, σχήμα 3.8ε. Επίσης, γίνεται σύγκριση των παραπάνω περιπτώσεων, με ωθηκεκτημένους επίμυες με κανονική διατροφή, καθώς και με αντίστοιχους φυσιολογικούς, σχήματα 3.8α, 3.8 β.







TAMM  
BIBLIOTEK  
UNIVERSITI  
MALAYSIA  
SARAWAK



Σχήμα 3.8: Ηλεκτρονικές μικρογραφίες με περιοχές ινιδίων κολλαγόνου από σπογγώδες οστό επίμυων ηλικίας 9 μηνών α) φυσιολογικό οστό (x35200) β) οστό ωθηκεκτημένου επίμυα (x35200) με κανονική διατροφή γ) οστό ωθηκεκτημένου επίμυα (x35200) με διατροφή εμπλουτισμένη με βιταμίνη D δ) οστό ωθηκεκτημένου επίμυα (x35200) με διατροφή εμπλουτισμένη με Ca ε) οστό ωθηκεκτημένου επίμυα (x35200) με διατροφή εμπλουτισμένη με Ca και βιταμίνη D.



### 3.2.3. Μορφομετρική ανάλυση

Η μορφομετρική ανάλυση των ινιδίων του κολλαγόνου των οστών επίμυων με ωθηκεκτομή που υποβλήθηκαν σε ειδική διατροφή, μετρήθηκε όπως και στα προηγούμενα πειράματα με χρήση ειδικού λογισμικού. Το πορώδες και το φλοιώδες οστό μελετήθηκαν ξεχωριστά και σε αυτά τα πειράματα για τις τρεις ομάδες των πειραματόζων. Σε κάθε ομάδα, από κάθε ζώο χρησιμοποιήθηκαν 4 ηλεκτρονικές μικρογραφίες. Από κάθε μικρογραφία μετρήθηκαν 100 περίπου τιμές διαμέτρων ινιδίων. Έτσι από κάθε ομάδα με 6 πειραματόζωα, μετρήθηκαν περίπου 2400 ινίδια.

α) Επίμυες με ωθηκεκτομή και διατροφή εμπλουτισμένη με βιταμίνη D, 5000 IU.

Η μέση διάμετρος των ινιδίων κολλαγόνου πορώδους και φλοιώδους οστού αυτών των επίμυων, είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή των επίμυων με κανονική διατροφή και στατιστικά σημαντικά μικρότερη από αυτή των φυσιολογικών ζώων, όπως φαίνεται στους πίνακες 3.6 – 3.9. Η βιταμίνη D από μόνη της, ναί μεν προκάλεσε μια αύξηση της διαμέτρου, δηλαδή πλησίασε περισσότερο στις φυσιολογικές τιμές, αλλά δεν ήταν ικανή να έχει κάποια αξιοσημείωτη δράση και να βελτιώσει τις συνέπειες της οστεοπόρωσης στο πορώδες και φλοιώδες οστό.

β) Επίμυες με ωθηκεκτομή και διατροφή εμπλουτισμένη σε ασβέστιο με λόγο Ca/P=2/1.

Η μέση διάμετρος των ινιδίων κολλαγόνου του φλοιώδους και πορώδους οστού αυτών των επίμυων, είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή των επίμυων με κανονική διατροφή. Η απόκλιση από τις φυσιολογικές τιμές είναι μικρότερη από την προηγούμενη περίπτωση (πίνακες 3.6 – 3.9). Η εμπλουτισμένη διατροφή σε ασβέστιο είχε καλύτερα



αποτελέσματα από τη χρήση της βιταμίνης D, δεν ήταν ικανή ώστε να μειωθούν ικανοποιητικά οι επιπτώσεις της ωθηκεκτομής.

γ) Επίμυες με ωθηκεκτομή και διατροφή εμπλουτισμένη με βιταμίνη D 5000 IU και σε ασβέστιο με λόγο Ca/P=2/1.

Μπορούμε να αναφέρουμε ως ευεγερτική, μόνο τη δράση του συνδυασμού της εμπλουτισμένης διατροφής με βιταμίνη D και σε ασβέστιο. Οι τιμές των διαμέτρων των ινιδίων του φλοιώδους και πορώδους οστού αυτής της ομάδας, προσεγγίζουν τις φυσιολογικές τιμές. Η στατιστική διαφορά μεταξύ της διαμέτρου του πορώδους οστού των πειραματόζωνων αυτής της ομάδας και της διαμέτρου των φυσιολογικών δεν είναι σημαντική ( $p < 0.5$ ) καθώς και εκείνη του φλοιώδους ( $p < 0.025$ ).



**Πίνακας 3.6:** Οι επιπτώσεις της ειδικής διατροφής στα ινίδια κολλαγόνου πορώδους οστού: η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της διαμέτρου των ινιδίων επίμυων με ωθηκεκτομή και τις διάφορες ειδικές διατροφές που θυσιάστηκαν 6 μήνες μετά την επέμβαση, συγκρίνεται με αυτή των αντίστοιχων επίμυων με ωθηκεκτομή και κανονική διατροφή.

Μέση τιμή και τυπική απόκλιση της διαμέτρου ινιδίων κολλαγόνου πορώδους οστού (nm)		
Ωθηκεκτ.επίμυες	Ωθηκεκτ.επίμυες + βιτ. D	Unpaired t-test
49.6± 5.8	50.7± 5.2	p<0.005
	Ωθηκεκτ.επίμυες + Ca 2%	
	51.3± 4.7	p<0.001
	Ωθηκεκτ.επίμυες + Ca 2%+ βιτ. D	
	52.0± 5.2	p<0.001

\* Οι μέσες τιμές των διαμέτρων των ινιδίων κάθε ομάδας προκύπτουν από τουλάχιστον 2400 τιμές διαμέτρων ινιδίων.



**Πίνακας 3.7:** Οι επιπτώσεις της ειδικής διατροφής στα ινίδια κολλαγόνου πορώδους οστού: η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της διαμέτρου των ινιδίων επίμυων με ωθηκεκτομή και τις διάφορες ειδικές διατροφές που θυσιάστηκαν 6 μήνες μετά την επέμβαση, συγκρίνεται με αυτή των αντίστοιχων φυσιολογικών επίμυων.

Μέση τιμή και τυπική απόκλιση της διαμέτρου ινιδίων κολλαγόνου πορώδους οστού (nm)		
Φυσιολογ. επίμυες	Ωθηκεκτ.επίμυες + βιτ. D	Unpaired t-test
52.1± 7.5	50.7± 5.2	p<0.005
	Ωθηκεκτ.επίμυες + Ca 2%	
	51.3± 4.7	p<0.1
	Ωθηκεκτ.επίμυες + Ca 2%+βιτ. D	
	52.0± 5.2	p<0.5

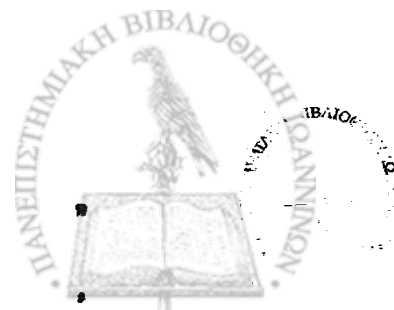
\* Οι μέσες τιμές των διαμέτρων των ινιδίων κάθε ομάδας προκύπτουν από τουλάχιστον 2400 τιμές διαμέτρων ινιδίων.



**Πίνακας 3.8:** Οι επιπτώσεις της ειδικής διατροφής στα ινίδια κολλαγόνου φλοιώδους οστού: η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της διαμέτρου των ινιδίων επίμυων με ωθηκεκτομή και τις διάφορες ειδικές διατροφές που θυσιάστηκαν 6 μήνες μετά την επέμβαση, συγκρίνεται με αυτή των αντίστοιχων επίμυων με ωθηκεκτομή και κανονική διατροφή.

Μέση τιμή και τυπική απόκλιση της διαμέτρου ινιδίων κολλαγόνου φλοιώδους οστού (nm)		
Ωθηκεκτ.επίμυες	Ωθηκεκτ.επίμυες + βιτ. D	Unpaired t-test
49.2± 5.0	50.0± 4.8	p<0.025
	Ωθηκεκτ.επίμυες + Ca 2%	
	50.4± 4.7	p<0.001
	Ωθηκεκτ.επίμυες + Ca 2%+ βιτ. D	
	50.9± 4.5	p<0.001

\* Οι μέσες τιμές των διαμέτρων των ινιδίων κάθε ομάδας προκύπτουν από τουλάχιστον 2400 τιμές διαμέτρων ινιδίων.



**Πίνακας 3.9:** Οι επιπτώσεις της ειδικής διατροφής στα ινίδια κολλαγόνου φλοιώδους οστού: η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση της διαμέτρου των ινιδίων επίμυων με ωθηκεκτομή και τις διάφορες ειδικές διατροφές που θυσιάστηκαν 6 μήνες μετά την επέμβαση, συγκρίνεται με αυτή των αντίστοιχων φυσιολογικών επίμυων.

Μέση τιμή και τυπική απόκλιση της διαμέτρου ινιδίων κολλαγόνου φλοιώδους οστού (nm)		
Φυσιολογ. επίμυες	Ωθηκεκτ.επίμυες + βιτ. D	Unpaired t-test
51.8± 6.5	50.0± 4.8	p<0.001
	Ωθηκεκτ.επίμυες + Ca 2%	
	50.4± 4.7	p<0.001
	Ωθηκεκτ.επίμυες + Ca 2%+βιτ. D	
	50.9± 4.5	p<0.025

\* Οι μέσες τιμές των διαμέτρων των ινιδίων κάθε ομάδας προκύπτουν από τουλάχιστον 2400 τιμές διαμέτρων ινιδίων.



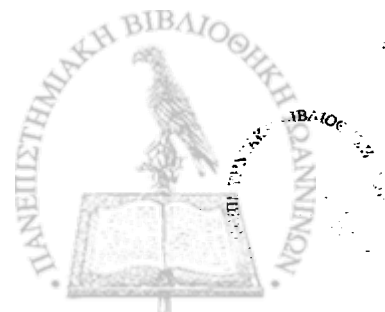


## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Είναι γνωστό ότι η έλλειψη οιστρογόνων, επηρεάζει το μεταβολισμό των οστών και προκαλεί οστεοπόρωση. Η προκλητή έλλειψη ορμονών με ωθηκεκτομή και επομένως η προκλητή οστεοπόρωση σε επίμους, είναι ένα πολύ αξιόπιστο μοντέλο για τη διερεύνηση της νόσου της μετεμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης. Χρησιμοποιήσαμε το μοντέλο των ωθηκεκτημένων επίμυων, για να εξετάσουμε τις επιπτώσεις της ωθηκεκτομής και ακολούθως της οστεοπόρωσης στο κολλαγόνο του δέρματος και των οστών. Ο λόγος που μελετήθηκε το κολλαγόνο είναι, ότι αποτελεί το βασικό συστατικό όλων των ιστών και οργάνων. Όσον αφορά στο δέρμα και στα οστά, περιέχουν τους ίδιους τύπους κολλαγόνου και επομένως η μελέτη τους θα μπορούσε να οδηγήσει σε αξιοσημείωτα συμπεράσματα.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας επιβεβαιώνουν το γεγονός ότι η προκλητή οστεοπόρωση με ωθηκεκτομή σε επίμους επιφέρει αποδιοργάνωση στη διάταξη των ινιδίων του κολλαγόνου καθώς και μείωση της διαμέτρου και της περιόδου των ινιδίων του δέρματος και των οστών. Οι δομικές αυτές μεταβολές εμφανίστηκαν σε όλα τα χρονικά διαστήματα που εξετάσαμε τους επίμους μετά την επέμβαση, αλλά έγιναν πιο έντονες όσο μεγαλύτερο ήταν το χρονικό διάστημα από την ωθηκεκτομή. Επίσης τα πειράματά μας επιβεβαιώνουν το γεγονός ότι με τη χρήση ειδικής διατροφής, οι επιπτώσεις της ωθηκεκτομής στην αρχιτεκτονική και τη διάμετρο του κολλαγόνου των οστών, μπορούν να ελαττωθούν σε μεγάλο βαθμό.



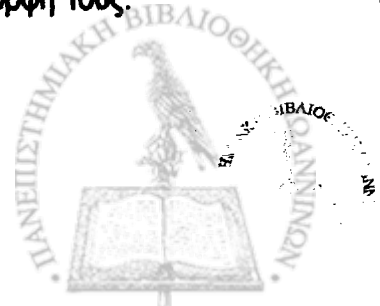
Σύμφωνα με τα πειράματά μας, η διάμετρος των ινιδίων του κολλαγόνου του δέρματος και των οστών, μειώνεται στατιστικά σημαντικά με την ωθηκεκτομή. Το δέρμα και τα οστά περιέχουν κυρίως κολλαγόνο τύπου I, αλλά και κάποιο μικρό ποσοστό κολλαγόνο τύπου III, το οποίο πιστεύεται ότι μπορεί να καθορίσει την τιμή της διαμέτρου των ινιδίων (Erstein, 1974 ; Lapiere et al., 1977). Σύμφωνα με τον Garabedian (1995) δομικές ανωμαλίες του κολλαγόνου τύπου I, ευθύνονται για αρκετές περιπτώσεις βαρείας οστεοπόρωσης. Τα αποτελέσματα αναλύσεων κολλαγόνου οστεοπορωτικού ανθρώπινου οστού έδειξαν μικρές μεταβολές της αναλογίας του κολλαγόνου τύπου III και σε μερικές περιπτώσεις του τύπου VI (Bailey et al., 1993). Όσον αφορά στο δέρμα, δεν μπορούμε να βεβαιώσουμε αν οι ανωμαλίες που παρατηρήσαμε, οφείλονται στον τύπο I ή III ή αν με την οστεοπόρωση ο λόγος I/III αλλάζει. Πρόσφατα οι Imamura et al., (1998), αναφέρουν ότι ο τύπος V κολλαγόνου που υπάρχει σε πολύ μικρό ποσοστό στους ιστούς επηρεάζει το σχήμα και τη διάμετρο ινιδίων τύπου I. Διαφορετικά επίπεδα κολλαγόνου τύπου V σε επίμυες με ωθηκεκτομή μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στις ανωμαλίες που παρατηρήθηκαν.

Η ωθηκεκτομή προκαλεί ανωμαλίες στο σχηματισμό και τη σταθεροποίηση των ινιδίων του κολλαγόνου. Ο σχηματισμός των ινιδίων του κολλαγόνου είναι μια πολύπλοκη διαδικασία και εξαρτάται κατά κύριο μέρος από τη σύνθεση του προκολλαγόνου, το οποίο υφίσταται πολλές τροποποιήσεις για να δώσει το μόριο του κολλαγόνου. Η σύνθεση του προκολλαγόνου γίνεται ενδοκυτταρικά στα ριβοσωμάτια, ενώ το κολλαγόνο συντίθεται στον εξωκυττάριο χώρο. Τα μόρια του κολλαγόνου συναθροίζονται και σχηματίζουν τα ινίδια. Ενδομοριακοί χιαστοί δεσμοί υπάρχουν, τόσο ανάμεσα στις αλυσίδες, όσο και ανάμεσα στα μόρια του κολλαγόνου. Έτσι οι αλυσίδες και τα γειτονικά μόρια συνδέονται μεταξύ τους, σχηματίζοντας ένα πλέγμα.



Κατά την οστεοπόρωση, σημαντικές μεταβολές παρατηρήθηκαν στη σταθερότητα των χιαστών δεσμών και της υδροξυλίωσης του κολλαγόνου (Bailey et al., 1993). Το πλέγμα αυξάνει την μηχανική αντοχή και τη χημική αντίσταση του κολλαγόνου (Bailey et al., 1974) και κάθε εξασθένηση, οδηγεί σε μια ραγδαία απώλεια της σταθερότητας των ινιδίων και ακολούθως μείωση των μηχανικών ικανοτήτων των οστών και ελαστικών ικανοτήτων του δέρματος. Κατά τον Charman (1984), υπάρχει πιθανότητα οι χιαστοί δεσμοί κατά τη διάρκεια της συνάθροισης των μορίων για το σχηματισμό του ινιδίου, να επηρεάζουν την ανάπτυξη των ινιδίων και τη διάμετρό τους. Οι ανωμαλίες των ινιδίων του κολλαγόνου που παρατηρήσαμε στη μελέτη μας, μπορούν να εξηγηθούν σε αυτή τη βάση. Αφού ο σχηματισμός του κολλαγόνου και των χιαστών δεσμών είναι μια εξωκυτάρια διαδικασία, μεταβολές στις λειτουργικές ιδιότητες του εξωκυτάριου χώρου μπορούν να εμπλέκονται στην οστεοπόρωση (Robey et al., 1993) και την αλλοίωση του κολλαγόνου του δέρματος και των οστών. Πράγματι, σε μελέτες που έγιναν σε οστεοπορωτικά οστά παρατηρήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις πρωτεϊνών του εξωκυτάριου χώρου (Aerssens et al., 1994) ή και αλλαγή στη μοριακή δομή τους (Kent et al., 1983 ; Ferris et al., 1987), καθώς και μείωση του λόγου Ca/P (Fountos et al., 1998). Η ποσότητα των οστών όπως επίσης και η ποιότητα μπορούν γενικά να επηρεαστούν από την οστεοπόρωση (Kent et al., 1983 ; Ferris et al., 1987 ; Bailey et al., 1993 ; Prockop et al., 1976 ; Eaton-Evans, 1994) και η μεταβολή του λόγου Ca/P μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης της οστικής ποιότητας των οστών. Κατά πόσο ή όχι οι ανωμαλίες που παρατηρήθηκαν στα πειράματά μας είναι αποτέλεσμα αυτών των μεταβολών, χρειάζεται περαιτέρω έρευνα.

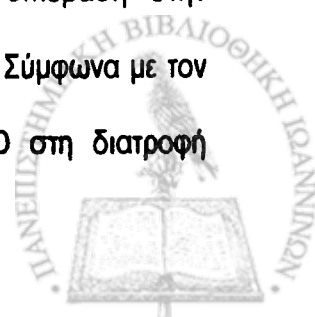
Η παρατήρηση των ηλεκτρονικών μικρογραφιών μας έδειξε ότι τα ινίδια του κολλαγόνου του δέρματος και των οστών των επίμυων με ωθηκεκτομή, διατηρούν την ταινιωτή μορφή τους. Όμως η περιοδικότητα των ινιδίων μειώνεται.



Είναι αξιοσημείωτο ότι υπάρχει συσχέτιση των αποτελεσμάτων του δέρματος και των οστών. Η μελέτη μας έδειξε ότι τόσο στα οστά όσο και στο δέρμα παρατηρείται αποδιοργάνωση των ινιδίων, μειώνεται η διάμετρός τους, καθώς και η περίοδός τους κατά τον ίδιο τρόπο. Επίσης παρατηρήσαμε ότι το πορώδες όσο και το φλοιώδες οστό επηρεάζονται κατά τον ίδιο τρόπο από την οστεοπόρωση. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται και σε μελέτες του κολλαγόνου των οστών και του δέρματος οστεοπορωτικών κουνελιών (Kounadi et al., 1998). Έτσι μπορούμε να επικαλεσθούμε ότι κοινοί παράγοντες επηρεάζουν το σκελετό και το δέρμα στην οστεοπόρωση. Παρόμοια συμπεράσματα συναντάμε και σε μελέτες άλλων ερευνητών (Brinca et al., 1987a ; 1987b ; Castelo- Branco et al., 1994).

Η εφαρμογή ειδικής διατροφής στους επίμους με ωθηκεκτομή, σε σύγκριση με τους μάρτυρες αλλά και τους επίμους με ωθηκεκτομή αλλά με κανονική διατροφή είχε επίδραση στην αρχιτεκτονική και στη διάμετρο των ινιδίων του κολλαγόνου των οστών (φλοιώδες, πορώδες). Παρατηρήσαμε ότι και η αρχιτεκτονική και η διάμετρος επηρεάζονται σημαντικά από το διατροφικό λόγο Ca/P καθώς και τη συγκέντρωση της βιταμίνης D. Όπως αναφέραμε σε προηγούμενο κεφάλαιο, πολλοί ερευνητές υποστηρίζουν ότι ο λόγος Ca:P στη διατροφή διαφαίνεται να είναι ένας σημαντικός παράγοντας στη διατήρηση της οστικής πυκνότητας στην οστεοπόρωση και ότι η δράση του ασβεστίου είναι αποτελεσματική όταν συνοδεύεται από δίαιτα χαμηλή σε φώσφορο. Έρευνα σε οστά επίμους έδειξε αύξηση των μεταλλικών στοιχείων των οστών, όταν η διατροφή περιελάμβανε ασβέστιο και φώσφορο σε λόγο 2:1 (Shah et al., 1967).

Η αυξημένη συγκέντρωση στη διατροφή της βιταμίνης D δεν είχε επίδραση στην αρχιτεκτονική των ινιδίων αλλά είχε μόνο στην αύξηση της διαμέτρου τους. Σύμφωνα με τον Erben (1998) τα αναβολικά αποτελέσματα της χρήσης της βιταμίνης D στη διατροφή



οστεοπορωτικών των επίμυων με ωθηκεκτομή, επέρχονται μέσω μιας άμεσης δράσης της στα οστά. Είναι γνωστό ότι η ωθηκεκτομή προκαλεί μια σημαντική ελάττωση της μάζας του πορώδους οστού. Ερευνητές (Geusens et al., 1991 ; Erben et al., 1998) υποστηρίζουν ότι η χρήση της βιταμίνης D στη διατροφή ωθηκεκτημένων επίμυων έχει ως αποτέλεσμα τη μεγάλη αύξηση της οστικής μάζας.

Θεαματικά αποτελέσματα όσον αφορά στην αρχιτεκτονική και τη διάμετρο των ινιδίων του κολλαγόνου με την εφαρμογή της ειδικής διατροφής στους επίμυες με ωθηκεκτομή, είχαμε μόνο όταν αυξήσαμε το επίπεδο του διαιτητικού ασβεστίου ως προς τον φώσφορο σε λόγο 2:1 καθώς και τα επίπεδα της βιταμίνης D σε συνδυασμό. Σε αυτή την περίπτωση οι δομικοί παράμετροι κολλαγόνου των οστών ήταν παρόμοιες με εκείνες των φυσιολογικών.

Όμως ο τρόπος με τον οποίο η βιταμίνη D και ο διατροφικός λόγος Ca/P επηρεάζουν τη δομή των ινιδίων κολλαγόνου δεν μπορεί με ακρίβεια να εξηγηθεί.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

### ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μελέτη με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και η ανάλυση των ηλεκτρονικών μικρογραφιών έδειξε ότι η ωθηκεκτομή και ακολούθως η οστεοπόρωση έχει επίδραση στη δομή του κολλαγόνου των οστών και του δέρματος των επίμυων στους οποίους εφαρμόστηκε. Οι επιδράσεις της παρατηρήθηκε να είναι πιο έντονες, όσο τα χρονικά διαστήματα ήταν μεγαλύτερα μετά την ωθηκεκτομή. Αλλοιώσεις του κολλαγόνου παρατηρήθηκαν στην αρχιτεκτονική των ινιδίων του, στη διάμετρό τους, καθώς και στην περιοδικότητά τους.

Τα αποτελέσματα της ωθηκεκτομής στα οστά με την εφαρμογή ειδικής διατροφής στους επίμυες μετριάστηκαν αρκετά έως και απαλείφθηκαν. Συγκεκριμένα η δράση της βιταμίνης D καθώς και του ασβεστίου Ca από μόνες τους δεν ήταν αρκετές, ώστε να έχουμε εμφανή βελτίωση στις δομικές παραμέτρους του κολλαγόνου που επηρεάζονται με την ωθηκεκτομή. Η εφαρμογή όμως του διατροφικού συνδυασμού ασβεστίου Ca φωσφόρου P σε λόγο 2:1 και βιταμίνης D είχε θετικά αποτελέσματα στις παραμέτρους αυτές.

Το κολλαγόνο του δέρματος και των οστών επηρεάζεται σημαντικά λόγω έλλειψης οιστρογόνων που προκαλείται εξαιτίας της ωθηκεκτομής. Η έλλειψη οιστρογόνων αναπτύσσεται κατά τα χρόνια της εμμηνόπαυσης και μπορεί να έχει σημαντικές συνέπειες στο κολλαγόνο των οστών και του δέρματος κατά τη γήρανση. Το κολλαγόνο αποτελεί το κύριο συστατικό των ιστών και των οργάνων και η μελέτη του μπορεί να διαφωτίσει μερικές πτυχές της νόσου της οστεοπόρωσης αλλά και τις επιπτώσεις της νόσου στα διάφορα όργανα και τους ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού. Ξεκάθαρα το κολλαγόνο αλλοιώνεται με την



οστεοπόρωση. Το ερώτημα αν αυτές οι μεταβολές παίζουν κάποιο ρόλο στην παθογένεση της ασθένειας απομένει να απαντηθεί.

[The following text is extremely faint and illegible due to heavy noise and low contrast. It appears to be a multi-paragraph discussion, possibly related to the osteoporosis mentioned in the header.]



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ωθηκεκτομή είναι μια αξιόπιστη μέθοδος προκλητής οστεοπόρωσης που εφαρμόζεται ευρέως σε επίμους. Η οστεοπόρωση είναι μια σοβαρή νόσος των οστών που εμφανίζεται ως επί το πλείστον σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και είναι υπεύθυνη για μια σειρά σοβαρών επιπτώσεων στην υγεία τους αλλά και στη θνησιμότητά τους. Επιπλέον, το οικονομικό κόστος της ασθένειας και των επιπτώσεών της τείνει να γίνει δυσβάσταχτο για την Ευρωπαϊκή και Παγκόσμια οικονομία.

Στη μελέτη μας εξετάσαμε, με τη βοήθεια της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, τις επιπτώσεις της προκλητής οστεοπόρωσης με ωθηκεκτομή σε επίμους στο κολλαγόνο των οστών. Το κολλαγόνο αποτελεί το κύριο συστατικό των οστών. Παράλληλα, εξετάσαμε αν επηρεάζεται και το κολλαγόνο του δέρματος (επειδή περιέχει τους ίδιους τύπους κολλαγόνου με τα οστά) και βρήκαμε ότι υπάρχει συσχετισμός των επιπτώσεων στο δέρμα και τα οστά. Επιπλέον, βρέθηκε πως η εφαρμογή της ειδικής διατροφής μπορεί να επηρεάσει τις επιπτώσεις της οστεοπόρωσης στο κολλαγόνο. Η έρευνα περιελάμβανε τη μελέτη δομικών παραμέτρων των ινιδίων: αρχιτεκτονική, μέτρηση της διαμέτρου και της περιοδικότητάς τους σε διάφορα χρονικά διαστήματα μετά την ωθηκεκτομή. Τα αποτελέσματα συγκρίνονταν κάθε φορά με αυτά των αντίστοιχων μαρτύρων.

Οι επίμους που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματά μας ηλικίας 4 μηνών υποβλήθηκαν σε ωθηκεκτομή. Δημιουργήθηκαν αντίστοιχες ομάδες από φυσιολογικά ζώα ίδιας ηλικίας. Η θανάτωση των ομάδων των οστεοπορωτικών επίμους έγινε έξι εβδομάδες, έξι μήνες και ένα χρόνο μετά την ωθηκεκτομή.





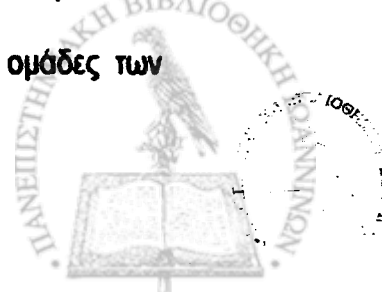
Δείγματα δέρματος και οστών (πορώδους και φλοιώδους) πάρθηκαν από την αριστερή ωμοπλάτη και κνήμη αντίστοιχα των ζώων. Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε ειδική επεξεργασία για ηλεκτρονική μικροσκοπία και κοπή σε υπέρλεπτες τομές. Έγινε θετική χρώση των τομών, έτσι ώστε να είναι δυνατή η παρατήρησή τους στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Η διάμετρος των ινιδίων του κολλαγόνου καθώς και η περίοδος μετρήθηκαν με ειδικά λογισμικό προγράμματα μέσω scanner.

Με την οστεοπόρωση διαταράχθηκε η αρχιτεκτονική των ινιδίων του κολλαγόνου του δέρματος και των οστών όλων των ομάδων. Στην ομάδα των ζώων με χρόνο θανάτωσης 6 εβδομάδες μετά την ωθηκετομή παρατηρήθηκαν ίνες σε σταθ να είναι διάσπαρτες μαζί με φυσιολογικές. Στα στάδια όπου ο χρόνος θανάτωσης ήταν 6 μήνες και ένας χρόνος μετά την επέμβαση, υπήρχαν περιοχές όπου τα ινίδια είχαν χάσει εντελώς τον παράλληλο προσανατολισμό τους. Επίσης υπήρχαν περιοχές όπου εμφανίζονταν μερικά ινίδια με σημαντική κάμψη και των οποίων η διεύθυνση σε μερικές περιπτώσεις άλλαζε και κατά 180° (hairpin loop).

Η διάμετρος ινιδίων κολλαγόνου δέρματος και οστών των οστεοπορωτικών επίμυων όλων των ομάδων ήταν στατιστικά μικρότερη από εκείνη των αντίστοιχων φυσιολογικών και μάλιστα οι τιμές ήταν ακόμα μικρότερες, όσο μεγαλύτερος ήταν ο χρόνος θανάτωσης μετά την επέμβαση.

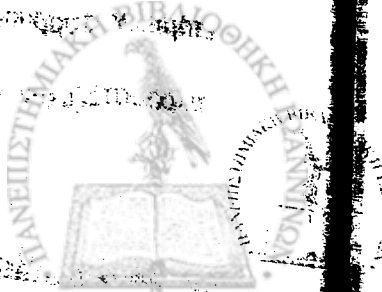
Η περιοδικότητα D των ινιδίων κολλαγόνου δέρματος και οστών των οστεοπορωτικών επίμυων συρρικνώθηκε στατιστικά σημαντικά. Παρατηρήθηκε ότι σε όλες τις ομάδες των πειραματόζων διατηρήθηκε η ταινιωτή μορφή των ινιδίων.



Συμπερασματικά, η προκλητή οστεοπόρωση με ωθηκετομή έχει επιπτώσεις στη δομή του κολλαγόνου του δέρματος και των οστών (φλοιώδους, πορώδους) επίμυων. Οι παρατηρήσεις αυτές μπορεί να οδηγήσουν στη χρήση του κολλαγόνου ως μοντέλο για τη μελέτη και κατανόηση των παρενεργειών της οστεοπόρωσης στα διάφορα όργανα του σώματος, καθώς και στην περαιτέρω διερεύνηση των μηχανισμών δράσης της.

Παράρτημα Α

... (The following text is extremely faint and largely illegible due to the quality of the scan. It appears to be a list of items or a detailed report section.)



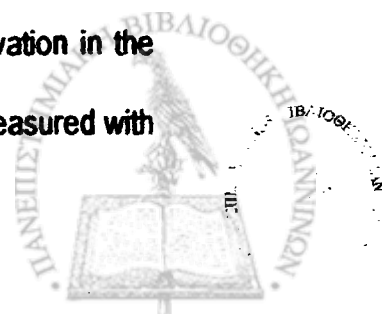
## SUMMARY

Ovariectomy is a very reliable method that is widely applied on rats in order to provoke osteoporosis. Osteoporosis is a very serious bone disease that is mostly appears in postmenopausal women and is responsible for many serious consequences in their health and in their mortality as well. Additionally the cost of curing this disease tends to be very high for the European and Global economy.

In our study we examined by means of electron microscopy the consequences of provoked osteoporosis by ovariectomy in rat bone collagen since it is the main constituent of bones. As the prevalent type of collagen in bone matrix is the same as that in skin we also studied skin collagen in order to investigate if osteoporosis provoked by ovariectomy has any consequences on this tissue as well. We additionally examined how the application of special nutrition can affect side effects of osteoporosis on collagen. This work contains: the study of the architecture of collagen fibrils, morphometric measurements (measurements of the diameter of collagen fibrils) and image analysis (measurements of D- periodicity).

The rats used in our experiments were ovariectomized at the age of 4 months. They were sacrificed six weeks, six months and one year after the ovariectomy. Animals without ovariectomy served as controls. They were age- matched with the ovariectomized rats.

Samples of skin and bone (trabecular, cortical) were taken from the left shoulder area and left tibia of the rats respectively. The samples were prepared for electron microscopy. Ultrathin sections were positively stained with such a way that made possible their observation in the electron microscope. The diameter of collagen fibrils and the periodicity- D were measured with suitable algorithms developed in the laboratory.



With ovariectomy the overall skin and bone collagen fibril architecture was disturbed. When rats were sacrificed six weeks after ovariectomy fibrils in disarray with normal ones were seen. In the next stages where sacrifice took place six months and one year after surgery, there were regions where the fibrils had completely lost their parallel orientation. Also there were areas in which fibrils showed a helical twisting and in others a 'hairpin loop' was formed.

The diameter of ovariectomized skin and bone collagen fibrils was statistically smaller than that of the control. The difference in mean diameter between the index and control subjects becomes more pronounced at prolonged times after surgery.

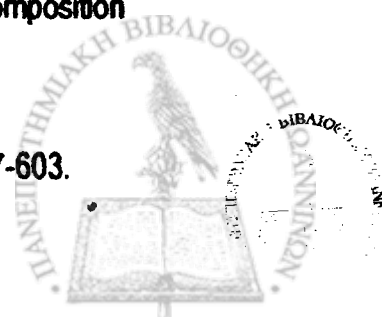
The axial periodicity of skin and bone collagen from ovariectomized rats was shorter than that of the control. However, the banding patterns of fibrils were normal in all cases.

In conclusion, the provoked osteoporosis by ovariectomy has structural consequences in the rat skin and bone collagen. These observations may prove that collagen could be a valuable model for understanding side-effects of osteoporosis on various organ systems of the body and exploring its mechanisms of action.



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- AERSSENS J., VAN AUDEKERCKE R., GEUSENS P., SCHOT L.P., OSMAN A.A. and DEQUEKER J., (1993). Mechanical properties, bone mineral content, and bone composition (collagen, osteocalcin, IGF-I) of the rat femur: influence of ovariectomy and nandrolane decanoate (anabolic steroid) treatment. *Calcif. Tissue Int.*, **53**, 269-277.
- AERSSENS J., DEQUEKER J. and MBUYI-MUAMBA J.M., (1994). Bone tissue composition: biochemical anatomy of bone. *Clinical Rheumatology*, **13**, 54-62.
- AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION, (1993). Δίαιτα και διατροφή. Εκδόσεις Μανιστάς.
- AVIOLI L. V. and KRANE S. M., (1990). Metabolic Bone Disease and clinically related disorders. WB Saunders Company, second edition.
- BAEKSGAARD L., ANDERREN K.P. and HYLDSTRUP L., (1998). Calcium and vitamin D supplementation increases spinal BMD in healthy, postmenopausal women. *Osteoporos. Int.*, **8**, 255-260.
- BAILEY A.J., ROBINS S.P. and BALIAN G., (1974). Biological significance of the intermolecular crosslinks of collagen. *Nature*, **251**, 105-109.
- BAILEY A.J., WOTTON S.F., SIMS T.J. and THOMPSON P.W., (1992). Post-translational modifications in the collagen of human osteoporotic femoral head. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **185**, 801-805.
- BAILEY A.J., WOTTON S.F., SIMS T.J. and THOMPSON P.W., (1993). Biochemical changes in the collagen of human osteoporotic bone matrix. *Connect. Tissue Res.*, **29**, 119-132.
- BARNES M. J., CONSTABLE B.J., MORTON L.F. and ROYCE P. M., (1974). Age related variations in hydroxylation of lysine and proline in collagen. *Biochem. J.*, **139**, 461-468.
- BORNSTEIN P., (1970). Structure of  $\alpha 1$ -CB8, a large cyanogen bromide produced fragment from the  $\alpha 1$  chain of rat collagen: the nature of hydroxylamine-sensitive bond and composition of tryptic peptides. *Biochemistry*, **9**, 2408-2421.
- BORNSTEIN P., (1974). The biosynthesis of collagen. *Ann. Rev. Biochem.*, **43**, 567-603.



- BORNSTEIN P. and BYERS P.H., (1980). Collagen Metabolism. The Upjohn Co., Washington.
- BRINCAT M., MONIZ C.F., STUDD J.W.W., DARBY A.J., MAGOS A., EMBUREY G. and VERSI E., (1985). Long-term effects of the menopause and sex hormones on skin thickness. *Br. J. Obstet. Gynecol.*, **92**, 256-259.
- BRINCAT M., VERSI E., MONIZ C.F., MAGOS A., TRAFFORD J. and STUDD J.W.W., (1987a). Skin collagen changes in post-menopausal women receiving of estrogen therapy. *Obstetrics and Gynecology*, **70**, 123-127.
- BRINCAT M., KABALAN S., STUDD J.W.W., MONIZ C.F., DE TRAFFORD J. and MONTGOMERY J., (1987b). A study of the decrease of skin collagen content, skin thickness and bone mass in the postmenopausal woman. *Obstetrics Gynecology*, **70**, 840-845.
- BULLOCK G.R., (1984). The current status of fixation for electron microscopy: a review. *J. Microsc.*, **133**, 1-15.
- CALVO M.S., (1993). Dietary phosphorous, calcium metabolism and bone. *J.Nutr.*, **123**, 1627-1633.
- CASARI E., ALFANO M., VALENTE M., CLARKE G.D., FERNI G. and GRAZIOLI B., (1997). Ovariectomy in the rat induces a rapid increase in the urinary excretion of hydroxylysine glycosides and non-reducible crosslink residues. *Osteoporos. Int.*, **7**, 538-543.
- CASTELO-BRANCO C., DURAN M. and GONZALEZ-MERLO J., (1992). Skin collagen changes related to age and hormone replacement therapy. *Maturitas*, **15**, 113-119.
- CASTELO-BRANCO C., PONS F., GRATACOS E., FORTUNY A., VANRELL J.A. and GONZALEZ-MERLO J., (1994). Relationship between skin collagen and bone changes during aging. *Maturitas*, **18**, 199-206.
- CHAPPARD D., ALEXANDRE C., ROBERT J.M. and RIFFAT G., (1991). Relationships between bone and skin atrophies during aging. *Acta Anat.*, **141**, 239-244.
- CHAPMAN J. A., (1974). The staining pattern of collagen fibrils. An analysis of electron micrographs. *Connect. Tissue. Res.*, **2**, 137-150.



CHAPMAN J. A., HOLMES D.F., MEEK K.M. and RATTEW C.J., (1981). Electron-optical studies of collagen fibril assembly. In :7<sup>th</sup> Aharon Katzir-Katchalsky Conference on Structural aspects of recognition and assembly in biological macromolecules, Vol. 1, Nof. Ginossar, p. 387.

CHAPMAN J. A., (1984). *Connective Tissue Matrix*. (Macmillan, London).

CHAPMAN J. A., TZAPHLIDOU M., MEEK K.M. and KADLER K.E., (1990). The collagen fibril-A model system for studying the staining and fixation of a protein. *Electron Microsc. Rev.*, **3**, 143-182.

CHEN C. and KALU D.N., (1998). Modulation of intestinal estrogen receptor by ovariectomy, estrogen and growth hormone. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **286**, 328-333.

COSMAN F. and LINDSAY R., (1998). Is parathyroid hormone a therapeutic option for osteoporosis? A review of the clinical evidence. *Calcif Tissue Int.*, **62**, 475-480.

CRAIG A.S. and PARRY D.A.D., (1981). *J. Ultrastruct. Rs.*, **74**, 232.

DE VERNEJOU M.C., (1998). Markers of bone remodelling in metabolic bone disease. *Drugs Aging*, **12**, 9-14.

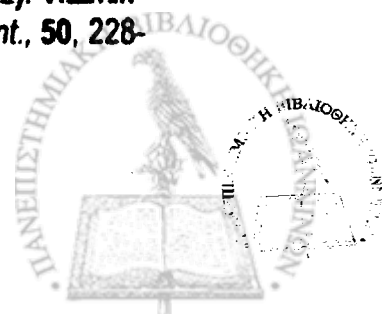
DICK I.M., ST JOHN A., HEAL S. and PRINCE R.L., (1996). The effect of estrogen deficiency on bone mineral density, renal calcium and phosphorous handling and calcitropic hormones in the rat. *Calcif. Tissue Int.*, **59**, 174-178.

DRAPER H.H. and SCYTHES C.A., (1981). Calcium, phosphorous and osteoporosis. *Fed. Proc.*, **40**, 2434-2438.

EATON-EVANS J., (1994). Osteoporosis and the role of diet. *Br. J. Biomed.Sc.*, **51**, 358-370.

EPSTEIN E., H., JR., (1974). [ $\alpha$ 1(III)] 3 Human skin collagen: release by pepsin digestion and preponderance in fetal life. *J. Biol. Chem.*, **249**, 3225-3231.

ERBEN R.G., WEISER H., SINOWATZ F., RAMBECK W.A. and ZUCKER H., (1992). Vitamin D metabolites prevent vertebral osteopenia in ovariectomized rats. *Calcif. Tissue Int.*, **50**, 228-236.



ERBEN R.G., BANTE U., BIRNER H. and STANGASSINGER M., (1997). 1alpha - hydroxyvitamin D2 partially dissociates between prevention of cancellous bone mass and effects on calcium homeostasis in ovariectomized rats. *Calcif. Tissue Int.*, **60**, 449-456.

ERBEN R.G., BROMM S. and STANGASSINGER M., (1998). Therapeutic efficacy of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and calcium in osteopenic ovariectomized rats: evidence for a direct anabolic effect of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 on bone. *Endocrinology*, **139**, 4319-4328.

FAIRWEATHER R.B., TANZER M.L. and GALLOP P.M., (1972). Aldolhistidine, a new trifunctional collagen crosslink. *Bioch. Bioph. Res. Comm.*, **48**, 1311.

FERRIS B.D., KLENERMAN L., DODDS R.A., BITENSKY L. and CHAYEN J., (1987). Altered Organization of Non-Collagenous Bone Matrix in osteoporosis. *Bone*, **8**, 285-288.

FESSLER J.H., and FESSLER L.I., (1978). Biosynthesis of procollagen. *Annu. Rev. Biochem.*, **47**, 129-162.

FIETZEK P.P. and KUHN K., (1976). The primary structure of collagen. *Int. Rev. Conn. Tissue. Res.*, **7**, 1-60.

FINKELMAN R.D. and BUTLER W.T., (1985). Vitamin D and skeletal tissues. *J.Oral. Pathol.*, **14**, 191-215.

FOUNTOS G., KOUNADI E., TZAPHLIDOU M., YASUMURA S. and GLAROS D., (1998). 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.

FUNG B.M. and WEI S.C., (1973). The effect of alcali and alkaline earth salts on the structure of hydrated collagen fibers as studied by deuterium NMR. *Biopolymers*, **12**, 1053-1062.

GALLOP P.M., BLUMENFELD O. and SEIFTER S., (1973). Structure and metabolism of connective tissue proteins. *Annu. Rev. Bioch.*, **41**, 617-672.

GARABEDIAN M., (1995). Genetic aspects of osteoporosis. *Current Opinion in Rheumatology*, **7**, 237-239.





GARNERO P. and DELMAS P.D., (1998). Biochemical markers of bone turnover. Applications for osteoporosis. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, 27, 303-323.

GEUSENS P., DEQUEKER J., NIJS J., VERSTRAETEN A. and BRAMM E., (1991). Prevention and treatment of osteopenia in the ovariectomized rat: effect of combined therapy with estrogens, 1-alpha vitamin D and prednisolone. *Calcif. Tissue Int.*, 48, 127-137.

GRANT M.E. and PROCKOP D.J., (1972). The biosynthesis of collagen. *New Engl. J. Med.*, 286, 194-195.

GROSS E. and WITKOP B., (1961). Selective cleavage of methionyl peptide bonds in ribonuclease with cyanogen bromide. *J. Amer. Chem. Soc.*, 83, 1510-1516.

GUSTAVSON K.H., (1956). The Chemistry and reactivity of collagen. Chap. 9, Academic Press, New York.

HABEEB A.F.S.A. and HIRAMOTO R., (1968). Reaction of proteins with glutaraldehyde. *Archs. Biochem. Biophys.*, 9, 157-166.

HALL C.E., JAKUS M.A. and SCHMITT F.O., (1942). Electron microscope observations of collagen. *J. Amer. Chem. Soc.*, 64, 1234.

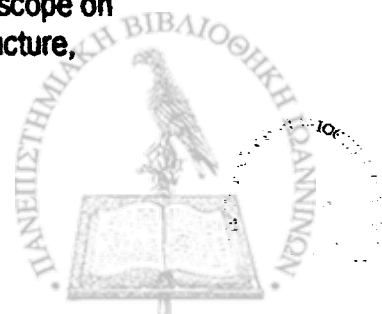
HAYAT M.A., 1981. Fixation for Electron Microscopy, Academic Press, New York.

HAYS W.L., 1988. Statistics. 4<sup>th</sup> Edition. (Holt, Rinehart and Winston Inc., New York).

HESHMATI H.M., KHOSLA S., BURRITT M.F., O'FALLON W.M. and RIGGS B.L., (1998). A defect in renal calcium conservation may contribute to the pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 83, 1916-1920.

HODGE A.J. and SCHMITT F.O., (1960). The charge profile of the tropocollagen macromolecule and packing arrangement in native-type collagen fibrils. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.*, 46, 186-197.

HODGE A.J. and PETRUSKA J. A., (1963). Recent studies with the electron microscope on ordered aggregates of the tropocollagen macromolecule. In: Aspects of Protein Structure, Ramachandran G.N. (ed.), Academic Press, New York, pp.289-334.



HOPWOOD D., (1972). Theoretical and practical aspects of glutaraldehyde fixation. *Histochem. J.*, **4**, 267-303.

HOUSLEY T., TANZER M.L., HENSON E. and GALLOP P.M., (1975). Collagen crosslinking: isolation of hydroxyaldolhistidine, a naturally- occurring crosslink. *Bioch. Bioph. Res. Comm.*, **67**, 824-830.

HULMES D.J.S., MILLER A., PARRY D.A.D., PIEZ K.A. and WOODHEAD-GALLOWAY J., (1973). Analysis of the primary structure of collagen for the origins of molecular packing. *J. Molec. Biol.*, **79**, 137-148.

IWAMOTO J., TAKEDA T. and ICHIMURA S., (1998). Effects of moderate intensity exercise on tibial bone mass in mature ovariectomized rats: bone histomorphometry study. *Keio J. Med.*, **47**, 162-167.

IMAMURA Y., STEIGLITZ B.M. and GREENSPAN D.S., (1998). Bone morphogenetic protein-1 processes the NH<sub>2</sub>- terminal propeptide, and a furin- like proprotein convertase processes the COOH- terminal propeptide of pro- alpha 1(V) collagen. *Journal of Biol. Chem.*, **273**, 27511-27517.

KALU D.N., HARDIN R.R. and COCKERHAM R., (1984). The evaluation of the pathogenesis of skeletal changes in ovariectomized rats. *Endocrinology*, **115**, 507-512.

KALU D.N., LIU C.C., HARDIN R.R. and HOLLIS B.W., (1989). The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. *Endocrinology*, **124**, 7-16.

KALU D.N., (1991). The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner.*, **15**, 175-191.

KENT G.N., DODDS R.A., BITENSKY L., KLENERMAN L., WATTS R.W.E. and CHAYEN J., (1983). Changes in crystal size and orientation of acidic glycosaminoglycans at the fracture site in fractured necks of femur. *J. Bone Jt. Surg.*, **65**, 189-194.

KIVIRIKKO K.I., (1993). Collagens and their abnormalities in a wide spectrum of diseases. *Ann. Med.*, **25**, 113-126.

KOLB E., (1981). New findings on the metabolism and importance of the D vitamins, with special reference to the use of vitamin D. *Z. Gesamte Inn. Med.*, **36**, 597-602.



KOUNADI E., TZAPHLIDOU M., and GLAROS D., (1994). An electron microscopic study of collagen fibril structure after lithium treatment- I. The effect of different lithium doses on mouse skin collagen. *Micron*, **25**, 233-240.

KOUNADI E., FOUNTOS G. and TZAPHLIDOU M., (1998). The influence of inflammation-mediated osteopenia (IMO) on the structure of rabbit bone and skin collagen fibrils. *Connect. Tiss. Res.*, **117**, 419-428.

KOWITZ J., KNIPPEL M., SCHUHR T. and MACH J., (1997). Alteration in the extent of collagen I hydroxylation, isolated from femoral heads of women with a femoral neck fracture caused by osteoporosis. *Calcif. Tissue Int.*, **60**, 501-505.

KNOTT L. and BAILEY A.J.,(1998). Collagen cross-links in mineralizing tissues: a review of their chemistry, fuction and clinical relevance. *Bone*, **22**, 181-187.

KUIVANIEMI H., TROMP G. and PROCKOP D.J., (1997). Mutations in fibrillar collagens (types I,II,III and XI), fibril-associated collagen (type IX) and network-forming collagen (type X) cause a spectrum of diseases of bone, cartilage and blood vessels. *Hum. Mutat.*, **9**, 300-315.

LAPIERE C. M., NUSGENS B. V. and PIERARD G.E., (1977). Interaction between collagen type I and type III in conditioning bundles organization. *Connect. Tissue Res.*, **5**, 21-29.

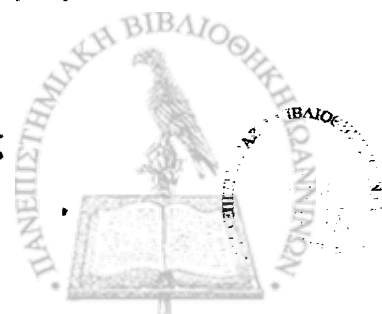
LANYON L.E., (1993). Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling. *Calcif. Tissue Int.*, **53**, S102-S106.

LEE C.J., LAWLER G.S. and JOHNSON G.H., (1981). Effects of supplementation of the diets with calcium and calcium-rich foods on bone density of elderly females with osteoporosis. *Am. J. Clin. Nutr.*, **34**, 819-823.

LUESCHER M., RUEGG M. and SCHINDLER P., (1974). Effect of hydration upon the thermal stability of tropocollagen and its dependence on the presence of neutral salts. *Biopolymers*, **13**, 2489-2503.

LUKERT B.P., CAREY M., MCCARTHY B., TIEMANN S., GOODNIGHT L., HELM M., HASSANEIN R., STEVENSON C., STOSKOPF M. and DOOLAN L., (1987). Influence of nutritional factors on calcium-regulating hormones and bone loss. *Calcif. Tissue Int.*, **40**, 119-125.

ΛΥΡΙΤΗΣ Γ., (1991). Μεταβολικά νοσήματα των οστών. Ελληνική Εταιρεία Μελέτης Μεταβολισμού των οστών.



MASIUKIEWICZ U.S., INSOGNA K.L., (1998). The role of parathyroid hormone in the pathogenesis, prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *Ageing*, **10**, 232-239.

MATSUMOTO T., EZAWA I., MORITA K., KAWANOBE Y. and OGATA E., (1985). Effect of vitamin D metabolites on bone metabolism in a rat model of postmenopausal osteoporosis. *J. Nutr. Sci. vitaminol (Tokyo)*, **31**, S61-S65.

MILLER E. J., (1976). *Molecular Cell. Biochem.*, **13**, 165.

MILLER A., (1982). Molecular packing in collagen fibrils. *Trends biochem. Sci.*, **7**, 13-18.

MILLER S.C., BOWMAN B.M., MILLER M.A. and BAGI C.M., (1991). Calcium absorption and osseous organ-, tissue-, and envelope- specific changes following ovariectomy in rats. *Bone*, **12**, 439-446.

MILLER S.C. and WRONSKI T.J., (1993). Long-Term osteopenic Changes in Cancellous bone Structure in Ovariectomized Rats. *The Anatomical Record*, **236**, 433-441.

MCCONKEY B., FRASER G.M., BLIGH A.S. and WHITELEY H., (1963). Transparent skin and osteoporosis. *Lancet*, **1**, 693-695.

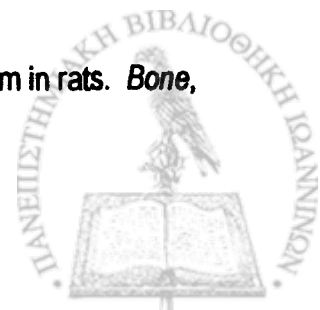
NORDIN B.E., (1997). Calcium and osteoporosis. *Nutrition*, **13**, 664-686.

O'BRIEN K.O., (1998). Combined calcium and vitamin D supplementation reduces bone loss and fracture incidence in older men and women. *Nutr. Rev.*, **56**, 148-150.

OHISHI T., TAKAHASHI M., KUSHIDA K., YAMAZAKI K., HOSHINO H., KITAZAWA A. and INOUE T., (1998). Urinary collagen crosslinks reflect further bone loss of femoral neck in osteoporotic patients undergoing vitamin D therapy. *Endocr. Res.*, **24**, 259-267.

O'LOUGHLIN P.D. and MORRIS H.A., (1998). Oestrogen deficiency impairs intestinal calcium absorption in the rat. *J. Physiol.(Lond.)*, **15**, 313-322.

OMI N. and EZAWA I., (1995). The effect of ovariectomy on bone metabolism in rats. *Bone*, **17**, 163S-168S.



OXLUND H., MOSEKILDE L. and ORTOFT G., (1996). Reduced concentration of collagen reducible crosslinks in human trabecular bone with respect to age and osteoporosis. *Bone*, **19**, 479-484.

PARRY D.A.D. and CRAIG A.S., (1978). *Biopolymers*, **17**, 843.

PIEZ, K. A., (1967). Soluble collagen and the components resulting from its denaturation. In: treatise on collagen. Rammachandran, G. N. ed., Vol. 1, Academic Press, New York, p.207.

PROCKOP D.J., BERG R.A., KIVIRIKKO K.I. and VITTO J., (1976). *Biochemistry of Collagen*. (Plenum, New York).

PROCKOP D.J. and KIVIRIKKO K.I., (1984). Heritable diseases of collagen. *N. Engl. J. Med.*, **311**, 376.

RAMACHANDRAN G.N. and KARTHA G., (1955). Structure of collagen. *Nature*, **176**, 593-595.

RAMACHANDRAN G.N. and CHANDRASEKHARAN R., (1968). Interchain hydrogen bonds via bound water molecules in collagen triple helix. *Biopolymers*, **6**, 1649-1658.

RAMACHANDRAN G.N., and RAMAKRISHNAM C., (1976). Molecular structure. In: *Biochemistry of collagen*. Ramachandran G.N., Reddi A.H., (eds), New York and London, Plenum Press, pp 45-84.

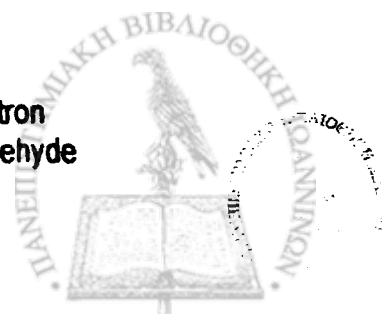
REID I.R., AMES R.W., EVANS M.C., GAMBLE G.D. and SHARPE S.J., (1993). Effect of calcium supplementation on bone loss in postmenopausal. *N. Engl. J. Med.*, **328**, 460-464.

RICK A. and CRICK F.H.C., (1955). Structure of collagen. *Nature*, **176**, 915-916.

ROBEY P.G., FEDARKO N.S., HEFFERAN T.E., BIANCO P., VETTER U.K., GRZESIK W., FRIEDENSTEIN A., VAN DER PLUIJMM G., MINTZ K.P., YOUNG M.F., KERR J.M., IBARAKI K., and HEEGARD A.M., (1993). Structure and molecular of bone matrix proteins. *Journal of Bone and Mineral Research*, **8**, 483-487.

ΣΑΒΒΑΣ Α., (1957). Γενική ανατομική. Εκδόσεις Θεσσαλονίκης.

SABATINI D.D., BENSCH K. and BARNETT R.J., (1963). Cytochemistry and electron microscopy: the preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J. Cell. Biol.*, **17**, 19-58.



SCHEDL H.P., CONWAY T., HRST R.L., MILLER D.L. and BROWN C.K., (1996). Effects of dietary calcium and phosphorous on vitamin D metabolism and calcium absorption in hamster. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **211**, 281-286.

SHAH B.G., KRISHNARAO V.G. and DRAPPER H.H., (1967). The Relationship of Ca and P Nutrition during Adult Life and Osteoporosis in Aged Mice. *J. Nutrition*, **92**, 30-42.

SNEDECOR G.W. and COCHRAN W.G., (1967). *Statistical Methods*. 6<sup>th</sup> Edition. (The Iowa State University Press, U.S.A.).

STEVENSON J.C., WHITEHEAD M.I., PADWICK M., ENDACOTT J.A., SUTTON C., BANKS L.M., FREEMANTLE C., SPINKS T.J. and HESP R., (1988). Dietary intake of calcium and postmenopausal bone loss. *B.M.J.*, **297**, 15-17.

STORM D., ESLIN R., PORTER E.S., MUSGRAVE K., VERAULT D., PATTON C., KESSENICH C., MOHAN S., CHEN T., HOLICK M.F. and ROSEN C.J., (1998). Calcium supplementation prevents seasonal bone loss and changes in biochemical markers of bone turnover in elderly New England women: a randomized placebo-controlled trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **83**, 3817-3825.

STRYER LUBERT, (1990). Βιοχημεία. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.

TAN J., LI H., ZHENG Z. and LIU S., (1995). Effect of natural calcium against osteopenia in ovariectomized rats. *Hua His I Ko Ta Hsueh Hsueh Pao*, **26**, 70-73.

TOMLIN S.G. and WORTHINGTON C.R., (1956). Low-angle X-ray diffraction patterns of collagen. *Proc. Roy. Soc. Lond. A.*, **235**, 189.

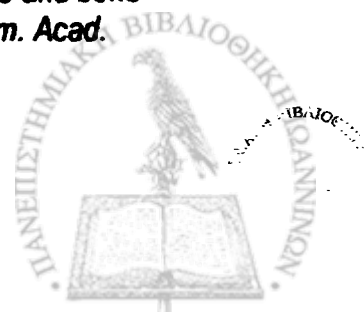
TRAUB W. and YONATH A., (1966). Polymers of tripeptides as collagen models. X-ray studies of poly (L-prolyl-glycyl-proline) and related polytripeptides. *J. Mol. Biol.*, **16**, 404-412.

TRAUB W. and PIEZ K.A., (1971). The chemistry and structure of collagen. *Advan. Protein Chem.*, **25**, 243-253.

TRYGGVASON K., (1995). Molecular properties and diseases of collagens. *Kidney International*, **49**, S24-S28.



- TZAPHLIDOU M., (1983). Το κολλαγόνο: Δομή, βιοσύνθεση και μεταβολισμός. *Ιατρική*, **44**, 203-216.
- TZAPHLIDOU M., (1991). The positive staining pattern of skin collagen in chronic haemodialysis patients. *Micron Microsc. Acta*, **22**, 17-19.
- TZAPHLIDOU M., SIAMOPOULOS K.C. and GLAROS D., (1991a). Abnormal collagen fibril structure of skin in chronic haemodialysis patients: an electron microscopic study. *Micron Microsc. Acta*, **22**, 207-212.
- TZAPHLIDOU M., LEONTIOU I., and GLAROS D., (1991b). The effect of gamma irradiation on the organization of mouse skin collagen fibrils. The positive staining pattern. *Micron Microsc. Acta*, **22**, 207-212.
- TZAPHLIDOU M., (1992). Abnormal collagen fibril structure as studied by electron microscopy. *Electron. Microsc. Rev.*, **5**, 25-35.
- YAMAZAKI I. and YAMAGUCHI H., (1989). Characteristics of an ovariectomized osteopenic rat model. *J. Bone Miner. Res.*, **4**, 13-22.
- VAN DER PLAS A., AARDEN E.M., FEIJEN J.H., DE BOER A.H., WILTINK A., ALBLAS M.J., DE LEIJ L. and NIJWEIDE P.J., (1994). Characteristics and properties of osteocytes in culture. *J. Bone Miner. Res.*, **9**, 1697-1704.
- VILLAREAL D.T., CIVITELLI R., CHINES A. and AVOLI L.V., (1991). Subclinical vitamin D deficiency in postmenopausal women with low vertebral bone mass. *J. Clin. Metab.*, **72**, 628-634.
- WEAKLEY B.S., (1972). A beginner handbook in biological electron microscopy. Churchill Livingstone. Edinburgh and London.
- WEMPT P., FIETZEK, P. P., and KUHN K., (1972). The covalent structure of collagen. The tryptic, Thermolytic and chymotryptic peptides of  $\alpha 1$ -CB3 from calf skin collagen. *Febs. Lett.*, **26**, 69-73.
- WHITMORE S.E. and LEVINE M.A., (1998). Risk factors for reduced skin thickness and bone density: possible clues regarding pathophysiology, prevention, and treatment. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **38**, 248-255.



WOODARD H.Q. and WHITE D.R., (1986). The composition of body tissues. *The British Journal of Radiology*, 59, 1209-1219.

WRONSKI T.J., LOWRY P.L., WALSH C.C. and IGNASZEWSKI L.A., (1985). Skeletal alterations in ovariectomized rats. *Calcif. Tissue Int.*, 37, 324-328.

WRONSKI T.J., WALSH C.C. and IGNASZEWSKI L.A., (1986). Histologic evidence for osteopenia and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Bone*, 7, 119-123.

WRONSKI T.J., DANN L.M., SCOTT K.S. and CINTRON M., (1989). Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. *Calcif Tissue Int.*, 45, 360-366.





## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

Λογισμικό πρόγραμμα για τη μέτρηση της διαμέτρου των ινιδίων του κολλαγόνου.

```

PROGRAM DOSMAC;
  USES CRT, DOS, GRAPH;
  CONST
    FNTEL='PIXEL.TXT';
  VAR
    UTFIN, UTFOUT           : FILE;
    TXTT                    : TEXT;
    HEADER                  : ARRAY[1..1078] OF BYTE;
    ACODE                   : ARRAY[1..640] OF BYTE;
    PICT                    : ARRAY[1..8000,1..3] OF WORD;
    CAD                     : ARRAY[1..1000,1..3] OF WORD;
    ARPIX                   : ARRAY[1..500] OF WORD;
    NUMCOL, DISTPIX, EPISYN : WORD;
    PR1, PR2, AN1, AN2, LEV : WORD;
    SIZE, MSIN, I, K, L, F, X, Y, GD : INTEGER;
    S, GRPA, GRPT, STP, LI, LK : INTEGER;
    GR, ST, G1, S1, MET, AF1, AF2 : INTEGER;
    MHKOS, SYNOLO, ARKYT, OLA : WORD;
    NOKYT, XPIX, YPIX, PIX    : WORD;
    SEPIXEL                  : LONGINT;
    APOP, EVSP              : INTEGER;
    SEMM, XCM, YCM, ARRA, ARRT : REAL;
    MTE, MTD, DIAM, APO, EVS : REAL;
    GraphDriver, GraphMode  : INTEGER;
    GRAMMH, FNIN            : STRING;
    KEY                     : CHAR;

  PROCEDURE OTHONH;
  BEGIN
    ASSIGN (UTFIN, FNIN);
    RESET (UTFIN, 1);
    MSIN:=1078;
    BLOCKREAD (UTFIN, HEADER, MSIN, SIZE);
    FOR I:=1 TO GR DO
      BEGIN
        BLOCKREAD (UTFIN, ACODE, ST, SIZE);
        FOR K:=1 TO ST DO
          BEGIN
            IF ACODE[K]<>0 THEN
              BEGIN
                PUTPIXEL (K, I, 255);
              END ELSE
              BEGIN
                PUTPIXEL (K, I, 0);
              END;
          END;
        END;
      END;
  END;

```



```

    END;
  END;
  CLOSE (UTFIN);
END;

```

```

PROCEDURE ARXH;
BEGIN
  FOR I:=1 TO GR DO
  BEGIN
    PUTPIXEL(1,I,255);
    PUTPIXEL(2,I,255);
    PUTPIXEL(ST-1,I,255);
    PUTPIXEL(ST,I,255);
  END;
  FOR I:=1 TO ST DO
  BEGIN
    PUTPIXEL(I,1,255);
    PUTPIXEL(I,2,255);
    PUTPIXEL(I,GR-1,255);
    PUTPIXEL(I,GR,255);
  END;
END;

```

```

PROCEDURE PROFIXH;
BEGIN
  FOR I:=1 TO GR DO
  BEGIN
    FOR K:=4 TO ST DO
    BEGIN
      IF (GETPIXEL(K-4,I)<>0) AND (GETPIXEL(K,I)<>0) THEN
      BEGIN
        PUTPIXEL(K-3,I,255);
        PUTPIXEL(K-2,I,255);
        PUTPIXEL(K-1,I,255);
      END;
    END;
  END;
END;

```

```

PROCEDURE PROFIXV;
BEGIN
  FOR I:=1 TO ST DO
  BEGIN
    FOR K:=4 TO GR DO
    BEGIN
      IF (GETPIXEL(I,K-4)<>0) AND (GETPIXEL(I,K)<>0) THEN
      BEGIN
        PUTPIXEL(I,K-3,255);
        PUTPIXEL(I,K-2,255);
        PUTPIXEL(I,K-1,255);
      END;
    END;
  END;
END;

```

```

PROCEDURE FIXHR;
BEGIN
  SETCOLOR(255);
  FOR I:=2 TO (GR-1) DO
  BEGIN
    FOR K:=2 TO (ST-1) DO

```



```

BEGIN
  IF (GETPIXEL(K,I)<>0) AND (GETPIXEL(K+1,I)=0) THEN
  BEGIN
    S:=1;
    REPEAT
      S:=S+1;
      GRPA:=I-S;
      IF GRPA<0 THEN GRPA:=0;
      GRPT:=I+S;
      IF GRPT>GR THEN GRPT:=GR;
      STP:=K+S;
      IF STP>ST THEN STP:=ST;
      FOR S1:=(K+1) TO STP DO
      BEGIN
        FOR G1:=GRPA TO GRPT DO
        BEGIN
          PIX:=GETPIXEL(S1,G1);
          IF PIX<>0 THEN
          BEGIN
            LI:=G1;
            LK:=S1;
            G1:=GRPT;
            S1:=STP;
          END;
        END;
      END;
    UNTIL (PIX<>0) OR (STP=ST);
    LINE(K,I,LK,LI);
  END;
END;
END;
END;

```

```

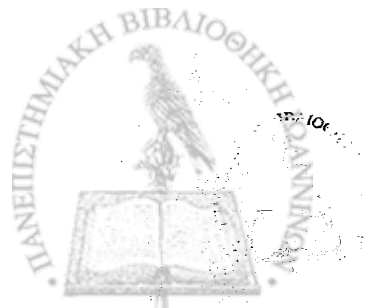
PROCEDURE FIXHL;

```

```

BEGIN
  SETCOLOR(255);
  FOR I:=2 TO (GR-1) DO
  BEGIN
    FOR K:=(ST-1) DOWNT0 2 DO
    BEGIN
      IF (GETPIXEL(K,I)<>0) AND (GETPIXEL(K-1,I)=0) THEN
      BEGIN
        S:=1;
        REPEAT
          S:=S+1;
          GRPA:=I-S;
          IF GRPA<0 THEN GRPA:=0;
          GRPT:=I+S;
          IF GRPT>GR THEN GRPT:=GR;
          STP:=K-S;
          IF STP<1 THEN STP:=1;
          FOR S1:=(K-1) DOWNT0 STP DO
          BEGIN
            FOR G1:=GRPA TO GRPT DO
            BEGIN
              PIX:=GETPIXEL(S1,G1);
              IF PIX<>0 THEN
              BEGIN
                LI:=G1;
                LK:=S1;
                G1:=GRPT;

```



```

        S1:=STP;
        END;
        END;
        END;
        UNTIL (PIX<>0) OR (STP=ST);
        LINE(K,I,LK,LI);
        END;
        END;
        END;
        END;

```

```

PROCEDURE FIXVD;
BEGIN
    SETCOLOR(255);
    FOR I:=2 TO (ST-1) DO
    BEGIN
        FOR K:=2 TO (GR-1) DO
        BEGIN
            IF (GETPIXEL(I,K)<>0) AND (GETPIXEL(I,K+1)=0) THEN
            BEGIN
                S:=1;
                REPEAT
                    S:=S+1;
                    GRPA:=I-S;
                    IF GRPA<0 THEN GRPA:=0;
                    GRPT:=I+S;
                    IF GRPT>ST THEN GRPT:=ST;
                    STP:=K+S;
                    IF STP>GR THEN STP:=GR;
                    FOR S1:=(K+1) TO STP DO
                    BEGIN
                        FOR G1:=GRPA TO GRPT DO
                        BEGIN
                            PIX:=GETPIXEL(G1,S1);
                            IF PIX<>0 THEN
                                BEGIN
                                    LI:=G1;
                                    LK:=S1;
                                    G1:=GRPT;
                                    S1:=STP;
                                END;
                            END;
                        END;
                    END;
                UNTIL (PIX<>0) OR (STP=GR);
                LINE(I,K,LI,LK);
            END;
        END;
    END;
END;

```

```

PROCEDURE FIXVU;
BEGIN
    SETCOLOR(255);
    FOR I:=1 TO (ST-1) DO
    BEGIN
        FOR K:=(GR-1) DOWNTO 2 DO
        BEGIN
            IF (GETPIXEL(I,K)<>0) AND (GETPIXEL(I,K-1)=0) THEN
            BEGIN
                S:=1;
                REPEAT

```



```

S:=S+1;
GRPA:=I-S;
IF GRPA<0 THEN GRPA:=0;
GRPT:=I+S;
IF GRPT>ST THEN GRPT:=ST;
STP:=K-S;
IF STP<1 THEN STP:=1;
FOR S1:=(K-1) DOWNTO STP DO
BEGIN
  FOR G1:=GRPA TO GRPT DO
  BEGIN
    PIX:=GETPIXEL(G1,S1);
    IF PIX<>0 THEN
    BEGIN
      LI:=G1;
      LK:=S1;
      G1:=GRPT;
      S1:=STP;
    END;
  END;
UNTIL (PIX<>0) OR (STP=GR);
LINE(I,K,LI,LK);
END;
END;
END;
END;

PROCEDURE READPIXEL;
BEGIN
  L:=0;
  FOR I:=1 TO GR DO
  BEGIN
    FOR K:=2 TO ST DO
    BEGIN
      IF (GETPIXEL(K,I)=0) AND (GETPIXEL(K-1,I)>0) THEN
      BEGIN
        L:=L+1;
        F:=F+1;
        PICT[L,1]:=K;
        PICT[L,3]:=I;
      END;
      IF (GETPIXEL(K,I)>0) AND (GETPIXEL(K-1,I)=0) THEN
      BEGIN
        PICT[L,2]:=K-1;
      END;
    END;
  END;
END;

PROCEDURE PERIMETROS;
BEGIN
  X:=PICT[1,1];
  Y:=PICT[1,2];
  GD:=PICT[1,3];
  K:=0;
  FOR I:=1 TO L DO
  BEGIN
    AF1:=ABS(PICT[I,1]-X);
    AF2:=ABS(PICT[I,2]-Y);
    FOR PR1:=1 TO 2 DO

```



```

BEGIN
  FOR PR2:=4 TO 10 DO
  BEGIN
    IF PR1=1 THEN
    BEGIN
      AN1:=4;
      AN2:=PR2;
    END ELSE
    BEGIN
      AN1:=PR2;
      AN2:=4;
    END;
    IF (AF1<=AN1) AND (AF2<=AN2) AND ((PICT[I,3]-GD)<=1) THEN
    BEGIN
      X:=PICT[I,1];
      Y:=PICT[I,2];
      GD:=PICT[I,3];
      K:=K+1;
      CAD[K,1]:=PICT[I,1];
      CAD[K,2]:=PICT[I,2];
      CAD[K,3]:=PICT[I,3];
      PICT[I,1]:=0;
      MHKOS:=K;
      PR1:=2;
      PR2:=10;
    END;
  END;
END;
K:=0;
FOR I:=1 TO L DO
BEGIN
  IF PICT[I,1]<>0 THEN
  BEGIN
    K:=K+1;
    PICT[K,1]:=PICT[I,1];
    PICT[K,2]:=PICT[I,2];
    PICT[K,3]:=PICT[I,3];
  END;
END;
L:=K;
END;

PROCEDURE VIEW(CHROMA:WORD);
BEGIN
  FOR I:=1 TO MHKOS DO
  BEGIN
    SETCOLOR(CHROMA);
    LINE(CAD[I,1],CAD[I,3],CAD[I,2],CAD[I,3]);
  END;
END;

PROCEDURE SEIRA;
BEGIN
  SYNOLO:=0;
  FOR I:=1 TO MHKOS DO
  BEGIN
    SYNOLO:=SYNOLO+(CAD[I,2]-CAD[I,1]+1);
  END;
  IF (SYNOLO>APOP) AND (SYNOLO<EVSP) THEN
  BEGIN

```



```

    ARKYT:=ARKYT+1;
    ARPIX[ARKYT]:=SYNOLO;
    VIEW(255);
END ELSE
BEGIN
    NOKYT:=NOKYT+1;
    VIEW(13);
END;
END;

BEGIN
    CLRSCR;
    WRITE('FILE (PATH\NAME.BMP)=');
    READLN(FNIN);
    WRITELN;
    WRITELN;
    WRITE('WIDTH (pixels)=');
    READLN(ST);
    WRITE('HEIGHT (pixels)=');
    READLN(GR);
    WRITELN;
    WRITE('WIDTH (cm)=');
    READLN(XCM);
    WRITE('HEIGHT (cm)=');
    READLN(YCM);
    WRITELN;
    WRITE('APO (mm2)=');
    READLN(APO);
    WRITE('MEXRI (mm2)=');
    READLN(EVS);
    WRITELN;
    LEV:=1;
    WRITE('LEVEL (<1>/2)=');
    READLN(LEV);
    GRAPHDRIVER:=9;
    GRAPHMODE:=2;
    InitGraph(GRAPHDRIVER,GRAPHMODE,''); { activate graphics }

    ARKYT:=0;
    NOKYT:=0;
    SEPIXEL:=LONGINT(GR)*ST;
    SEMM:=XCM*YCM;
    APO:=APO/100;
    EVS:=EVS/100;
    APOP:=TRUNC(SEPIXEL*APO/SEMM);
    EVSP:=TRUNC(SEPIXEL*EVS/SEMM);
    EPISYN:=50;

    OTHONH;
    ARXH;
    IF LEV<>2 THEN
    BEGIN
        FIXHR;
        FIXVD;
    END ELSE
    BEGIN
        FIXHR;
        FIXHL;
        FIXVD;
        FIXVU;
    END;

```



PROFIXH;  
PROFIXV;

READPIXEL;  
CLEARDEVICE;  
REPEAT  
  PERIMETROS;  
  SEIRA;  
UNTIL L<=1;  
KEY:=READKEY;  
CLOSEGRAPH;

ASSIGN(TXTT,FNTEL);  
REWRITE(TXTT);  
WRITELN(TXTT,'EPILOGH=',ARKYT);  
WRITELN(TXTT,' ');  
MTE:=0;  
MTD:=0;  
FOR I:=1 TO ARKYT DO  
  BEGIN  
    ARRA:=ARPIX[I]/SEPIXEL;  
    ARRT:=SEMM\*ARRA\*100;  
    DIAM:=2\*SQRT(ARRT/PI);  
    WRITELN(TXTT,ARRT:8:2,' mm2',DIAM:8:2,' mm');  
    MTE:=MTE+ARRT;  
    MTD:=MTD+DIAM  
  END;  
MTE:=MTE/ARKYT;  
MTD:=MTD/ARKYT;  
WRITELN(TXTT,' ');  
WRITELN(TXTT,'MESH TIMH EMBADOY=',MTE:8:2,' mm2');  
WRITELN(TXTT,' ');  
WRITELN(TXTT,'MESH TIMH DIAMETROY=',MTD:8:2,' mm');  
CLOSE(TXTT);  
END.

□





## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

Λογισμικό πρόγραμμα για τη μέτρηση της περιοδικότητας D των ινιδίων του κολλαγόνου.

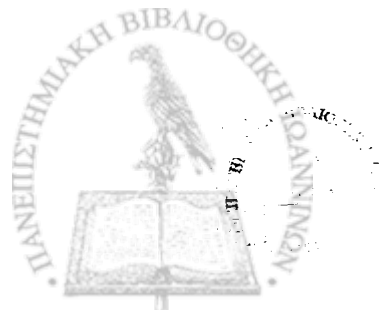
```

PROGRAM PERIOD;
USES DOS, CRT, UTL, GRAPH, PRINTER;
TYPE
  FILEREC=RECORD
    FNAME: STRING;
    PZOOM: REAL;
  END;
VAR
  GraphDriver, GraphMode : INTEGER;
  FN                       : TEXT;
  I, K, J, L, T           : INTEGER;
  CGR, CST, NUMEGR       : WORD;
  NUMBER, COLNUM, ASCNUM : WORD;
  MESOANIX, ORIO, APOST  : WORD;
  ST, GR, DPI, MHKOS     : WORD;
  NUMPER, METRO, EKATO   : WORD;
  BHMA, ANAKYKL, APOTYK  : WORD;
  DIAST                  : WORD;
  SS, SX, SX2, ELAX, SY, SY2: REAL;
  APOSTASH, TELAPOTYK   : REAL;
  NANO, ZOOM             : REAL;
  BASI, FST, LTST, DIAF  : ARRAY[1..2000] OF REAL;
  ORI                   : ARRAY[1..20] OF WORD;
  GRAMMH, COMMENT       : STRING;
  FNIN, FNOUT           : STRING;
  FNPZMETAB             : FILEREC;
  FNPZ                  : FILE OF FILEREC;
  TXTT, ARXEIO          : TEXT;
  KEY: CHAR;
  CHE: STRING[7];
  CWI: STRING[6];
  CDP: STRING[4];

FUNCTION EXCEL (NEX: REAL; F1, F2: WORD): STRING;
VAR
  NUMERO: STRING;
BEGIN
  STR (NEX: F1: F2, NUMERO);
  DELETE (NUMERO, (F1-F2), 1);
  INSERT (' ', NUMERO, (F1-F2));
  EXCEL := NUMERO;
END;

PROCEDURE READINFORM;
BEGIN
  ASSIGN (FNPZ, 'INFORM.DAT');
  RESET (FNPZ);
  SEEK (FNPZ, 1);
  READ (FNPZ, FNPZMETAB);
  CLOSE (FNPZ);
END;

```



```

PROCEDURE WRITEINFORM;
BEGIN
  ASSIGN(FNPZ, 'INFORM.DAT');
  RESET(FNPZ);
  SEEK(FNPZ, 1);
  WRITE(FNPZ, FNPZMETAB);
  CLOSE(FNPZ);
END;

PROCEDURE WRITETXTFILE;
BEGIN
  ASSIGN(ARXEIO, FNOUT);
  APPEND(ARXEIO);

  WRITELN(ARXEIO, EXCEL(APOSTASH, 8, 3), CHR(9), EXCEL(SS, 8, 3), CHR(9), EXCEL(
  NANO, 8, 3), CHR(9), EXCEL(TELAPOTYX, 7, 3));
  CLOSE(ARXEIO);
END;

PROCEDURE PROANAL;
BEGIN
  BHMA:=0;
  ORIO:=MESOANIX;
  APOSTASH:=0;
  FOR L := 1 TO ANAKYKL DO
  BEGIN
    BHMA:=BHMA+METRO;
    ELAX := 1000;
    FOR J := ORIO - DIAST TO ORIO + DIAST DO
    BEGIN
      FOR K := 1 TO J DO
      BEGIN
        FST[K] := BASI[K + BHMA];
      END;
      FOR K := 1 TO J DO
      BEGIN
        LTST[K] := BASI[K + BHMA + J];
      END;

      SX := 0;
      SX2 := 0;
      FOR K := 1 TO J DO
      BEGIN
        DIAF[K] := LTST[K] - FST[K];
        SX2 := SX2 + SQR(DIAF[K]);
      END;
      SS := SQRT(SX2)/J;
      IF SS < ELAX THEN
      BEGIN
        ELAX := SS;
        APOST := J;
      END;
    END;
    APOSTASH:=APOSTASH+APOST;
    WRITE(APOST: 4);
  END;
  ORIO:=ROUND(APOSTASH/ANAKYKL);
  WRITELN;
  WRITELN('APPROXIMATE d=', ORIO: 4);
  WRITELN;

```



END;

PROCEDURE ANALYSH;

BEGIN

BHMA:=0;

METRO:=1;

ANAKYKL:=ORIO;

NUMPER:=0;

APOSTASH:=0;

SY:=0;

SY2:=0;

FOR L := 1 TO ANAKYKL DO

BEGIN

BHMA:=BHMA+METRO;

ELAX := 1000;

FOR J := ORIO - 5 TO ORIO + 5 DO

BEGIN

FOR K := 1 TO J DO

BEGIN

FST[K] := BASI[K + BHMA];

END;

FOR K := 1 TO J DO

BEGIN

LTST[K] := BASI[K + BHMA + J];

END;

SX := 0;

SX2 := 0;

FOR K := 1 TO J DO

BEGIN

DIAP[K] := LTST[K] - FST[K];

SX2 := SX2 + SQR(DIAP[K]);

END;

SS := SQR(SX2)/J;

IF SS < ELAX THEN

BEGIN

ELAX := SS;

APOST := J;

END;

END;

IF (APOST>ORIO-5) AND (APOST<ORIO+5) THEN

BEGIN

APOSTASH:=APOSTASH+APOST;

NUMPER:=NUMPER+1;

SY:=SY+APOST;

SY2:=SY2+SQR(APOST);

END ELSE

BEGIN

APOTYX:=APOTYX+1;

END;

WRITE (APOST: 4);

END;

END;

PROCEDURE OTHONH;

BEGIN

CGR:=1;

CST:=1;

ASSIGN (TXTT, FNIN);

RESET (TXTT);

GRAMMH:='';



```

WHILE GRAMMH <> 'imagerurkey' DO
BEGIN
  READLN(TXTT, GRAMMH);
  IF GRAMMH = '%%EndComments' THEN
  BEGIN
    READLN(TXTT, COMMENT);
    READLN(TXTT, CWI, ST);
    READLN(TXTT, CHE, GR);
    READLN(TXTT, COMMENT);
    READLN(TXTT, CDP, DPI);
  END;
END;
METRO:=TRUNC((ST/4)/10);
ANAKYKL:=10;
MESOANIX:=ROUND(ST/4);
DIAS:=ROUND((ST/4)*25/100);
WRITELN('STHLES =', ST:4);
WRITELN('GRAMMES=', GR:4);
WRITELN;
WRITELN('DPI=', DPI:4);
WRITELN;
WRITELN;

NUMEGR := 0;
FOR I:=1 TO ST+1 DO
BEGIN
  BASI[I]:=0;
END;
WHILE GRAMMH <> 'grestore' DO
BEGIN
  READLN(TXTT, GRAMMH);
  IF GRAMMH <> 'grestore' THEN
  BEGIN
    MHKOS := LENGTH(GRAMMH);
    K:=0;
    FOR I := 1 TO TRUNC(MHKOS/2) DO
    BEGIN
      K:=K+1;
      ASCNUM := ORD(GRAMMH[K]);
      IF ASCNUM < 58 THEN
      BEGIN
        NUMBER := ASCNUM - 48;
      END ELSE
      BEGIN
        NUMBER := ASCNUM - 55;
      END;
      COLNUM := NUMBER * 16;
      K:=K+1;
      ASCNUM := ORD(GRAMMH[K]);
      IF ASCNUM < 58 THEN
      BEGIN
        NUMBER := ASCNUM - 48;
      END ELSE
      BEGIN
        NUMBER := ASCNUM - 55;
      END;
      COLNUM := COLNUM + NUMBER;
      NUMEGR:=NUMEGR+1;
      BASI[CST]:=BASI[CST]+COLNUM;
      CST:=CST+1;
      IF (NUMEGR MOD ST)=0 THEN

```



```

        BEGIN
            CGR:=CGR+1;
            CST:=1;
        END;
    END;
END;
CLOSE (TKTT);
FOR I:=1 TO ST DO
    BEGIN
        BASI[I]:=BASI[I]/GR;
    END;
END;

BEGIN
    CLRSCR;
    READINFORM;
    WRITE ('PATH\FILENAME OF DATA= ');
    WRITELN (FNPZMETAB.FNAME);
    WRITELN;
    WRITE ('ZOOM OF PICTURE = ');
    WRITELN (FNPZMETAB.PZOOM:10:2);
    WRITELN;
    WRITELN;
    WRITELN ('Press [Esc] to Edit filename, zoom of picture !!');
    KEY:=READKEY;
    IF KEY=#27 THEN
        BEGIN
            WRITELN;
            WRITE ('PATH\FILENAME OF DATA= ');
            READLN (FNPZMETAB.FNAME);
            WRITELN;
            WRITE ('ZOOM OF PICTURE = ');
            READLN (FNPZMETAB.PZOOM);
            WRITEINFORM;
            FNOUT:=FNPZMETAB.FNAME+'.TXT';
            WRITELN;
            ASSIGN (ARXEIO, FNOUT);
            REWRITE (ARXEIO);
            CLOSE (ARXEIO);
        END;
        FNOUT:=FNPZMETAB.FNAME+'.TXT';
        ZOOM:=FNPZMETAB.PZOOM;
        CLRSCR;
        WRITE ('PATH\FILENAME OF PICTURE= ');
        READLN (FNIN);
        WRITELN;
        FNIN:=FNIN+'.EPS';
        APOTYX:=0;
        APOSTASH:=0;
        NUMPER:=0;
        OTHONH;
        PROANAL;
        ANALYSH;
        APOSTASH:=APOSTASH/NUMPER;
        NANO:=((APOSTASH*2.54)/DPI)*10000000/(ZOOM);
        TELAPOTYX:=APOTYX/ANAKYKL*100;
        SS := SQRT((SY2 - (SQR(SY) / NUMPER)) / (NUMPER - 1));
        WRITELN;
        WRITELN;
        WRITELN ('POSOSTO APOTYXIVN = ', TELAPOTYX:7:3, ' %');

```



```
WRITELN;  
WRITELN('S.D. EPITYXIVN = ',SS:8:3);  
WRITELN;  
WRITELN('APOSTASH = ',APOSTASH:8:3,' Pixels');  
WRITELN('APOSTASH = ',NANO:8:3,' nm');  
WRITETXTFILE;  
  
WRITELN(1st, FNIN, CHR(9), EXCEL(APOSTASH, 8, 3), CHR(9), EXCEL(SS, 8, 3), CHR(  
9), EXCEL(NANO, 8, 3), CHR(9), EXCEL(TELAPOTYX, 7, 3));  
KEY:=-READKEY;  
END.□
```

