



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΤΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

ΙΟΥΛΙΑ ΝΤΟΒΟΛΟΥ

**ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΟΡΙΑΚΗΣ
ΔΟΜΗΣ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΘΗΝΑ 2015

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ακτινοχημείας και Βιοφασματοσκοπίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους αυτούς που ήταν κοντά μου όλο αυτό το διάστημα.

Κατ' αρχήν να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια κ. Μ. Κουή για την ανάθεση του θέματος και την Δρ. Β. Δρίτσα για την βοήθεια στο πειραματικό μέρος και τη λήψη των εικόνων SEM. Θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Μ. Κυριακίδου για την διάθεση των καρκινικών δειγμάτων. Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Ι. Αναστασοπούλου και τον κ. Θ. Θεοφανίδη για την καθημερινή και αδιάλειπτη καθοδήγησή τους, αλλά και για την προσπάθεια τους να μεταδώσουν όλες αυτές τις γνώσεις των φυσικοχημικών μεθόδων στη μελέτη των βιοϋλικών.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τους ερευνητές του Κέντρου «Δημόκριτος» Δρ. Δ. Τσιούρβα, Ω. Σιδεράτου και Φ. Κατσαρό για την φιλοξενία στο εργαστήριό τους για την λήψη των υπέρυθρων φασμάτων.

Τελευταία, άφησα την οικογένειά μου, που αποτελεί πηγή έμπνευσης και κατά τη διάρκεια αυτών των ετών μου προσέφερε απόλυτη οικονομική και ψυχολογική υποστήριξη για την ολοκλήρωση των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT.....	8
I.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	9
ΟΣΤΑ	9
1.1. Γενικά	9
1.2. Δομή	9
1.3. Κύτταρα του οστίτη ιστού	13
1.4. Οστική φάση (Bone matrix)- Οργανική-Ανόργανη	15
1.5. Κύτταρα των οστών.....	18
1.6. Παθήσεις οστών.....	21
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	32
ΥΠΕΡΥΘΡΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΕ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ FOURIER	32
2.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ	32
2.2. ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ FT-IR ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ.....	34
2.2.1. Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα	34
2.2.2. Υπέρυθρη περιοχή.....	35
2.2.3. Αρχές της υπέρυθρης φασματοσκοπίας	36
2.2.4. Φάσματα δόνησης πολυατομικών μορίων	38
2.3. ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ	40
2.3.1. Φασματοφωτόμετρα υπέρυθρου διασποράς	40
2.3.2. Φασματοφωτόμετρα υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier.	
Συμβολόμετρο Michelson.....	41
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	45
Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (SEM).....	45

3.1.	Ιστορική αναδρομή.....	45
3.2.	Αρχή λειτουργίας.....	47
II.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	50
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	50
	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	50
4.1.	Αντιδραστήρια.....	50
4.2.	Προετοιμασία δειγμάτων.....	50
4.3.	Υλικό	51
4.4.	Λήψη υπερύθρων FT-IR φασμάτων.....	51
4.5.	SEM μικροσκόπιο	53
4.6.	Πηγή Co(60).....	54
III.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	56
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	56
	ΜΕΛΕΤΗ FT-IR ΦΑΣΜΑΤΩΝ	56
5.1.	FT-IR φάσματα υγιών οστών	56
5.2.	Σύγκριση υπέρυθρων φασμάτων υγιούς και ακτινοβολημένου οστού	58
5.3.	Σύγκριση υπέρυθρων φασμάτων υγιούς και καρκινικού οστού.....	64
5.4.	Σύγκριση υπέρυθρων φασμάτων καρκινικού και ακτινοβολημένου οστού	68
	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	72
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	74

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το οστό αποτελεί ένα σύνθετο υλικό, το οποίο χαρακτηρίζεται από μία πολύπλοκη ιεραρχική δομή. Συνίσταται από τρεις φάσεις, την ανόργανη, την οργανική και την υδατική. Η σύσταση του οστού και η συγκέντρωση του διαμορφώνουν τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Μεταβολές στην συγκέντρωση των συστατικών μπορούν να οδηγήσουν σε μόνιμες ή αντιστρεπτές παθολογικές καταστάσεις.

Οι επιστήμονες σήμερα έχουν στραφεί προς την κατεύθυνση της ανεύρεσης των αιτίων, σε μοριακό επίπεδο, των συχνότερα απαντώμενων παθήσεων των οστών, αφού ακόμη και οι σύγχρονες μορφές θεραπείας συνεχίζουν να εμφανίζουν ανεπιθύμητες ενέργειες, όπως π.χ. φαρμακευτικές παρενέργειες και επιπλοκές των χειρουργικών τεχνικών.

Για την μελέτη της μοριακής δομής των οστών και των επικείμενων βλαβών χρησιμοποιήθηκε η υπέρυθη φασματοσκοπία με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared, FT-IR). Η φασματοσκοπία FT-IR χρησιμοποιείται συστηματικά τα τελευταία χρόνια στη μελέτη των ανθρώπινων ιστών, συμπεριλαμβανομένων και των οστών. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση των οστών πλεονεκτεί, καθώς μελετά ταυτόχρονα την οργανική και ανόργανη φάση, χωρίς να απαιτείται αφαλάτωση ή αποπρωτεΐνωση. Ακόμη, επιτρέπει τη μελέτη συστημάτων σε πολύ μικρή ποσότητα υλικού, ενώ περιέχει πολύτιμες πληροφορίες για τις λειτουργικές ομάδες και τους χημικούς δεσμούς των μορίων που συγκρατούν τις φάσεις των οστών.

Για την μελέτη της μακροσκοπικής αρχιτεκτονικής και την τοπολογική μεταβολή των χημικών ενώσεων χρησιμοποιήθηκε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Scanning Electron Microscope, SEM). Το SEM εκτός από πληροφορίες σχετικές με την επιφανειακή εικόνα και την αρχιτεκτονική των οστών, προσφέρει και την δυνατότητα στοιχειακής ανάλυσης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία γίνεται χρήση της υπέρυθρης φασματοσκοπίας με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared, FT-IR), σε συνδυασμό με την ανάλυση με Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Scanning Electron Microscope, SEM), για τη μελέτη της επίδρασης παθολογικών καταστάσεων στην μοριακή δομή και μορφολογία των οστών.

Για τον σκοπό αυτό, λήφθηκαν δείγματα οστών από ασθενείς που υπεβλήθησαν σε ολική αρθροπλαστική των κατ' ισχίων για την θεραπεία οστεοαρθρίτιδας και οι οποίοι δεν έφεραν άλλη μεταβολική ασθένεια και ενός ασθενούς που υποβλήθηκε σε χειρουργική αποκατάσταση παθολογικών καταγμάτων οστών με μεταστατικό καρκίνο και αρχική εστία το ήπαρ.

Για την μελέτη της μοριακής δομής των οστών και των επικείμενων βλαβών μελετήθηκαν τα υπέρυθρα φάσματα ενός υγιούς οστού, ενός υγιούς οστού το οποίο ακτινοβολήθηκε με δόση ακτινοβολίας 2Gy προερχόμενη από πηγή γ -60Co Gammachamber 4000A, και ενός καρκινικού οστού.

Από την μελέτη των υπέρυθρων φασμάτων, στην περιοχή του φάσματος από 4000-400 cm^{-1} , διαπιστώθηκε ότι υπήρχαν σημαντικές μεταβολές στις εντάσεις και τις συχνότητες των ταινιών απορρόφησης τόσο στο φάσμα του ακτινοβολημένου υγιούς οστού, όσο και στο καρκινικού οστού ως προς το υγιές. Οι μεταβολές αποδόθηκαν στις βλάβες της μοριακής δομής των οστών οι οποίες συνδέονται με μεταβολή της τεταρτοταγούς και δευτεροταγούς δομής των κολλαγονούχων πρωτεϊνών, αλλά και της δομής του υδροξυαπατίτη των οστών.

Παρατηρήθηκε επίσης ότι τα φάσματα του ακτινοβολημένου και του καρκινικού οστού είχαν αρκετές ομοιότητες στη μεταβολή των ταινιών του φάσματος σε σχέση με το φάσμα του υγιούς οστού, αποδεικνύοντας ότι οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται κατά το οξειδωτικό στρες συμβάλλουν στην ανάπτυξη της ασθένειας.

Για την επιβεβαίωση των παραπάνω αποτελεσμάτων τα δείγματα εξετάστηκαν και μέσω των εικόνων που προέκυψαν από το SEM, στις οποίες έγινε φανερή η μείωση της οστικής μάζας. Αυτό έρχεται σε συμφωνία και με βιβλιογραφικά δεδομένα, όπου αναφέρεται ότι ο καρκίνος ενισχύει την οστεοπόρωση.

Από την σειρά των πειραμάτων διαπιστώθηκε ότι η υπέρυθη φασματοσκοπία είναι μία τεχνική μη καταστρεπτική και μπορεί να δώσει πληροφορίες σχετικά με την πορεία μιας ασθένειας και την επίδρασή της στον οργανισμό.

Τέλος, το πλέον σημαντικό είναι ότι διαπιστώθηκε φασματοσκοπικά ότι η ανάπτυξη της ασθένειας, σε κάποιο από τα στάδια της, οφείλεται στον μηχανισμό ελευθέρων ριζών που παράγονται ενδογενώς στον οργανισμό.

ABSTRACT

In the present study, FT-IR spectroscopy (Fourier Transform Infrared spectroscopy) in combination with Scanning Electron Microscopy (SEM) was used in order to study the effect of pathological conditions on the molecular structure and morphology of the bones.

For this purpose, bone samples were obtained intra-operatively from head of patients undergoing osteoarthritic surgery and correction of the fractures due to cancer. The infrared spectra from irradiated and cancerous bones were compared with the corresponding spectrum of the healthy bone. The healthy was irradiated with a radiation dose of 2Gy, of γ -60Co Gammachamber 4000A.

From the study of the infrared spectrum in the region of 4000-400 cm^{-1} , it was observed that there were significant changes in both spectrums of the cancerous and the irradiated bone samples. Specifically, these changes were caused by damage on the molecular structure of the bones. This damage included changes in both the quaternary and secondary structure of the collagenous proteins, as well as in the structure of the hydroxyapatite.

It was also observed that the irradiated bone spectrum had many similarities with the cancerous bone spectrum, regarding the intensity changes of the characteristic bands of the normal bone spectrum. These changes lead to the suggestion that free radicals, which are produced during oxidative stress is a cause of the cancerous progression.

In order to confirm these results the samples were also examined through images obtained by SEM, which showed an obvious reduction of the bone mass, in agreement with literature that cancerous induces osteoporosis.

From the series of experiments that were conducted, it was established that FT-IR spectroscopy is a non-destructive method, which can provide significant information about the state of a disease and what effect it might have on the human body.

Finally, the most important conclusion that was conducted from the FT-IR spectra analysis was that the evolution of the disease, at some of its stages, was caused by the presence of the free hydroxyl radicals which are produced endogenously in the body.

Ι.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΟΣΤΑ

1.1. Γενικά

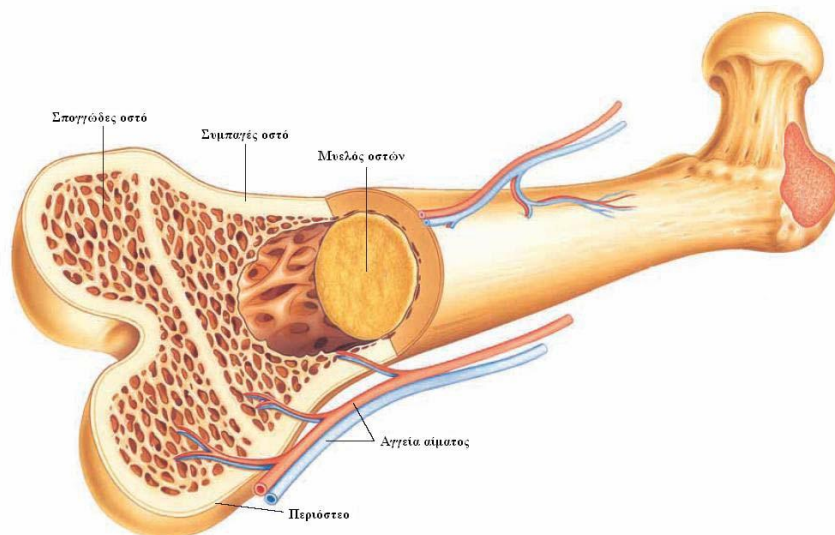
Τα οστά είναι ο στηρικτικός ιστός του ανθρώπινου σώματος και χαρακτηρίζονται από ακαμψία και ιδιαίτερα σκληρή σύσταση. Τα οστά θεωρούνται ως η μεταβολική αποθήκη των αλάτων, προστατεύουν τις ευαίσθητες ανατομικές δομές (π.χ. κρανίο), παρέχουν μηχανική στήριξη (π.χ. πλευρές) και επιτρέπουν την κίνηση ή μετακίνηση του σώματος (π.χ. μακρά οστά). Κύριο συστατικό των οστών είναι ο *οστίτης ιστός*.

1.2. Δομή

Με βάση το γενικό σχήμα τους τα οστά μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις (3) κατηγορίες: βραχέα, πλατέα και μακρά. Τα βραχέα οστά, όπως π.χ. τα ταρσιαία, τα καρπιαία και οι σπόνδυλοι, έχουν τις ίδιες περίπου διαστάσεις προς όλες τις κατευθύνσεις. Το σχήμα τους μπορεί να είναι τραπεζοειδές, κυβοειδές, κωνοειδές ή ακανόνιστο. Αυτά τα οστά έχουν σχετικά λεπτό φλοιό. Τα πλατέα και μακρά οστά έχουν τη μια διάσταση πολύ βραχύτερη ή μακρύτερη από τις άλλες δύο. Τα μεγαλύτερα πλατέα οστά σχηματίζουν την κρανιακή κοιλότητα, την ωμοπλάτη και την πτέρυγα του λαγονίου. Τα μακρά ή αυλοειδή οστά, όπως π.χ. το μηριαίο, η κνήμη, το βραχιόνιο, τα μετακάρπια, τα μετατάρσια και οι φάλαγγες των δακτύλων, έχουν στο κάθε άκρο της αυλοειδούς διάφυσης μια μετάφυση και μια επίφυση και χαρακτηρίζονται από παχύτερο φλοιό [Πετρά ,2003].

Το ώριμο οστόν αποτελείται από τον κεντρικό λιπώδη ή αιμοποιητικό μυελό που στηρίζεται και περιβάλλεται από τον οστίτη ιστό και το περιόστεο. Παρόλο που αυτά τα τρία μέρη του οστού διαφέρουν στη σύσταση, τη δομή και τη λειτουργία, δεν είναι ανεξάρτητα μεταξύ τους. Ο μυελός λειτουργεί ως πηγή οστικών κυττάρων. Τα

αιμοφόρα αγγεία του μυελού σχηματίζουν ένα σημαντικό μέρος του κυκλοφορικού συστήματος του οστού και βλάβες ή νόσοι του μυελού μπορούν να επιδράσουν (αρνητικά) στη λειτουργία του οστού και των περιοστικών κυττάρων, όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.1



Σχήμα 1.1: Μορφολογία και δομή οστών. Διακρίνεται το περίοστεο, το συμπαγές οστό, το σπογγώδες οστό, ο μυελός των οστών αλλά και τα αγγεία του αίματος τα οποία διεισδύουν στο οστό .[Καλονάκης, 2007]

1.2.1. Φλοιώδες και σπογγώδες οστούν

Σε μακροσκοπική εξέταση παρατηρούμε ότι αδρά υφίστανται δύο μορφές οστίτη ιστού: το φλοιώδες (συμπαγές) και το σπογγώδες (δοκιδωτό) οστούν. Τόσο το φλοιώδες όσο και το σπογγώδες οστούν έχουν την ίδια σύσταση της θεμέλιας ουσίας και την ίδια δομή, αλλά η μάζα του φλοιώδους οστού ανά μονάδα όγκου είναι πολύ μεγαλύτερη. Δηλαδή, το φλοιώδες οστούν έχει μεγαλύτερη πυκνότητα ή λιγότερο «πορώδες» (περίπου 10% πορώδες / porosity) από το σπογγώδες οστούν (περίπου 50%-90% πορώδες). Επειδή η αντίσταση του οστού σε συμπιεστικές δυνάμεις (compressive strength) είναι ευθέως ανάλογη με το τετράγωνο της πυκνότητας αυτού, η σταθερά ελαστικότητας (modulus of elasticity) και η απόλυτη αντίσταση σε συμπιεστικές δυνάμεις (compressive strength) του φλοιώδους οστού μπορεί να είναι μέχρι και 10 φορές μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες δυνάμεις του σπογγώδους οστού ίδιου όγκου.

Το φλοιώδες οστόν σχηματίζει περίπου το 80% του ώριμου σκελετού και περιβάλλει το μυελό και το σπογγώδες οστόν. Η δομή τόσο του φλοιώδους όσο και του σπογγώδους οστού μεταβάλλεται ως προς τα εφαρμοζόμενα φορτία, την ακινητοποίηση, τα ορμονικά ερεθίσματα και άλλους παράγοντες. Το σπογγώδες οστόν έχει περίπου 20 φορές μεγαλύτερη επιφάνεια ανά μονάδα όγκου σε σύγκριση με το φλοιώδες οστόν, και τα κύτταρά του ανευρίσκονται κυρίως μεταξύ των πεταλιών ή στην επιφάνεια των δοκίδων, όπου μπορούν να δεχτούν άμεσα την επίδραση των γειτονικών κυττάρων του μυελού των οστών. Σε αντιδιαστολή, ένα μεγαλύτερο αναλογικά ποσοστό του κυτταρικού πληθυσμού του φλοιώδους οστού περιβάλλεται εξ' ολοκλήρου από οστική θεμέλιο ουσία. Ίσως αυτό – το μεγαλύτερο ποσοστό οστικής επιφάνειας καλυπτόμενης από κύτταρα, σε συνδυασμό με την εγγύτητα των αιμοφόρων αγγείων στο μυελό των οστών – να εξηγεί εν μέρει το γεγονός ότι το σπογγώδες οστόν έχει αυξημένο ρυθμό μεταβολικής δραστηριότητας και συνεχούς ανασχηματισμού (remodelling) και εμφανίζεται να αντιδρά ταχύτερα σε μηχανικά ερεθίσματα συγκρινόμενο με το φλοιώδες οστόν [Πετρά, 2003].

1.2.2. Ινώδες και πεταλιώδες οστόν

Το σπογγώδες ή το φλοιώδες οστόν είναι δυνατό να αποτελείται από ινώδες (πρωτογενές) ή πεταλιώδες (δευτερογενές) οστόν. Το ινώδες οστόν σχηματίζει τον εμβρυονικό σκελετό, το οποίο στη συνέχεια απορροφάται κι αντικαθίσταται από ώριμο οστόν, καθώς εξελίσσεται η ανάπτυξη του σκελετού. Μικρές ποσότητες ινώδους οστού ανευρίσκονται σε τμήματα των τενόντων και συνδεσμικών προσφύσεων, τις ραφές του κρανίου και τα οστάρια του αυτιού. Ινώδες οστόν σχηματίζεται επίσης στους συζευκτικούς χόνδρους. Εκτός από τις προαναφερθείσες εξαιρέσεις, ινώδες οστόν ανευρίσκεται σπάνια στον φυσιολογικό ανθρώπινο σκελετό μετά την ηλικία των 4 ή 5 ετών. Μπορεί όμως, να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε ηλικία ως αποτέλεσμα οστικής βλάβης ή βλάβης των μαλακών μορίων, φαρμακευτικής θεραπείας που διεγείρει το σχηματισμό οστού, των μεταβολικών ή νεοπλασματικών νόσων ή φλεγμονών.

Το ινώδες και το πεταλιώδες οστόν διαφέρουν ως προς το σχηματισμό, τη σύσταση, την οργάνωση/δομή και τις μηχανικές ιδιότητες αυτών. Το ινώδες οστόν έχει ταχύ ρυθμό εναπόθεσης και ανασχηματισμού (turnover), ενώ το πεταλιώδες οστόν είναι συνήθως λιγότερο ενεργοποιημένο (δραστήριο). Συγκρινόμενο με το πεταλιώδες οστόν, το ινώδες οστόν εμφανίζει ένα ακανόνιστο, σχεδόν τυχαίο

τρόπο διάταξης των ινιδίων κολλαγόνου και περιέχει περίπου 4 φορές περισσότερα οστεοκύτταρα ανά μονάδα όγκου. Τα οστεοκύτταρα του ινώδους οστού διαφέρουν μεταξύ τους στο μέγεθος, τον προσανατολισμό και την κατανομή, ενώ αυτά του πεταλιώδους οστού είναι σχετικά ομοιόμορφα σε μέγεθος, και ο επιμήκης άξονάς τους είναι παράλληλος με τον άξονα των υπολοίπων κυττάρων και των ινιδίων κολλαγόνου της θεμέλιας ουσίας. Η επιμετάλλωση του ινώδους οστού γίνεται επίσης ακανόνιστα: τα ανόργανα συστατικά που εναποτίθενται διαφέρουν μεταξύ τους σε μέγεθος καθώς και στη σχέση τους με τα ινίδια κολλαγόνου. Λόγω του ακανόνιστου τρόπου διάταξης των ινιδίων κολλαγόνου, τη σχετικά υψηλή περιεκτικότητα σε κύτταρα και νερό και τον ακανόνιστο τρόπο επιμετάλλωσης αυτού, το ινώδες οστόν είναι πιο εύκαμπτο, παραμορφώνεται πιο εύκολα κι είναι μηχανικά λιγότερο ανθεκτικό από το πεταλιώδες οστό. Η σχεδόν τυχαία διάταξη των ινιδίων κολλαγόνου κάνει το ινώδες οστόν να εμφανίζει παρόμοιες μηχανικές ιδιότητες ανεξάρτητα από τον τρόπο εφαρμογής των μηχανικών φορτίων – συμπεριφέρεται δηλαδή ισοτροπικά. Σε αντιδιαστολή, το πεταλιώδες οστόν συμπεριφέρεται ανισότροπα: οι μηχανικές ιδιότητες αυτού διαφέρουν ανάλογα με τον προσανατολισμό των εφαρμοζόμενων φορτίων [Πετρά, 2003].

1.2.3. Πεταλιώδες οστόν

Εμφανίζεται σε 4 μορφές: τα πετάλια των δοκίδων του σπογγώδους οστού, τα ενδότερα και περιφερικά κυκλοτερή πετάλια του φλοιώδους οστού, τα ενδιάμεσα (interstitial) πετάλια του φλοιώδους οστού και τα πετάλια των οστεώνων. Κάθε πετάλιο αποτελείται από πυκνά διατεταγμένα ινίδια κολλαγόνου με συγκεκριμένο προσανατολισμό. Τα ινίδια γειτονικών πεταλίων διατάσσονται με διαφορετικό προσανατολισμό και αναστομώνονται συχνά, όχι μόνο μέσα σε κάθε πετάλιο, αλλά και μεταξύ πεταλίων, αυξάνοντας έτσι την αντοχή του οστού [Πετρά, 2003].

1.2.4. Οστεώνες

Σχηματίζουν τον κύριο όγκο του διαφυσιακού φλοιού στον ώριμο ανθρώπινο σκελετό. Κάθε οστεώνας αποτελείται από ομόκεντρα πετάλια που περιβάλλουν ένα κεντρικό κανάλι (αβερσιανό, haversian). Οι οστεώνες διακλαδίζονται ακανόνιστα και αναστομώνονται μεταξύ τους, δίνοντας την εικόνα κυλίνδρων που διατρέχουν κατά μήκος της διάφυσης του οστού. Το κεντρικό κανάλι κάθε οστεώνα περιέχει αιμοφόρα και λεμφικά αγγεία, και ενίοτε νεύρα. Καναλίσκοι (canaliculi), που περιέχουν τις

κυτταρικές προσεκβολές των οστεοκυττάρων, εκτείνονται ακτινωτά από το κεντρικό αβερσιανό κανάλι, δίκην ακτίνων τροχού αμάξης. Αυτοί οι καναλίσκοι ενώνουν το κεντρικό κανάλι με τα οστεοκύτταρα και περνούν από οστεοκύτταρο σε οστεοκύτταρο. Διαχωριστικές γραμμές (cement lines) ορίζουν τα εξωτερικά όρια κάθε οστεώνα. Αποτελούν λεπτά στρώματα οργανικής θεμέλιας ουσίας, η σύσταση της οποίας είναι παρόμοια με του οστεοειδούς, και κάνουν εμφανείς τις περιοχές όπου η απορρόφηση του οστού έχει σταματήσει και ο σχηματισμός οστού έχει εγκατασταθεί. Οι διαχωριστικές αυτές γραμμές ουσιαστικά καλύπτουν όλη την εξωτερική επιφάνεια κάθε οστεώνα. Γενικά, οι κυτταρικές προσεκβολές των καναλίσκων και τα ινίδια κολλαγόνου των οστεώνων δεν διασχίζουν τις διαχωριστικές αυτές γραμμές, με αποτέλεσμα κάθε οστεώνας να είναι απομονωμένος σε σχέση με τους γειτονικούς του.

Ένα πολύπλοκο εσωτερικό δίκτυο καναλιών, κοιλοτήτων (lacunae) και καναλίσκων σχηματίζει ένα από τα πιο αξιοπρόσεκτα δομικά χαρακτηριστικά του ώριμου πεταλιώδους φλοιώδους οστού. Μέσα και στο πιο πυκνό τμήμα του φλοιώδους οστού, τα κεντρικά κανάλια των οστεώνων διακλαδίζονται και αναστομώνονται τόσο μεταξύ τους όσο και με τα αιμοφόρα κανάλια, γνωστά ως κανάλια του Volkmann. Μέσα στους οστεώνες, οι κοιλότητες που περιέχουν τα οστεοκύτταρα και οι καναλίσκοι που περιέχουν τις κυτταρικές αποφυάδες τους σχηματίζουν μια ακόμη μεγαλύτερη επιφάνεια. Συνολικά, η προαναφερθείσα επιφάνεια είναι περίπου 100 φορές μεγαλύτερη από το σύνολο της περιοστικής και ενδο-οστικής επιφάνειας του ώριμου φλοιώδους οστού. Αυτό το εσωτερικό οστικό δίκτυο των καναλιών και κοιλοτήτων σχηματίζει έναν εκτενή εξω-αγγειακό χώρο μέσα στον οποίο ιόντα και υγρά μπορούν να κυκλοφορούν ελεύθερα, σε άμεση γειτονία με την επιμεταλλωμένη θεμέλιο ουσία [Πετρά, 2003].

1.3. Κύτταρα του οστίτη ιστού

Εμφανίζουν κατά τύπο διαφορετική μορφολογία, λειτουργία και εντόπιση. Προέρχονται είτε από μεσεγχυματικά είτε από αιμοποιητικά αρχέγονα κύτταρα. Στα πρώτα περιλαμβάνονται τα αδιαφοροποίητα κύτταρα ή προ-οστεοβλάστες, τα bone-lining cells και τα οστεοκύτταρα. Στα δεύτερα περιλαμβάνονται τα μονοκύτταρα του μυελού των οστών ή της συστηματικής κυκλοφορίας, οι προ-οστεοκλάστες και οι οστεοκλάστες. Τα αδιαφοροποίητα μεσεγχυματικά κύτταρα, τα οποία μπορούν να

εξελιχθούν σε οστεοβλάστες (γνωστά επίσης και σαν προ-οστεοβλάστες) ανευρίσκονται στα οστικά κανάλια, το ενδόστεο, το περιόστεο και τον μυελό. Τα αγγειακά περικύτταρα αποτελούν μια άλλη πηγή προ-οστεοβλαστών. Παραμένουν στην αδιαφοροποίητη μορφή μέχρι να δεχθούν ερεθίσματα για να πολλαπλασιαστούν και να διαφοροποιηθούν σε οστεοβλάστες.

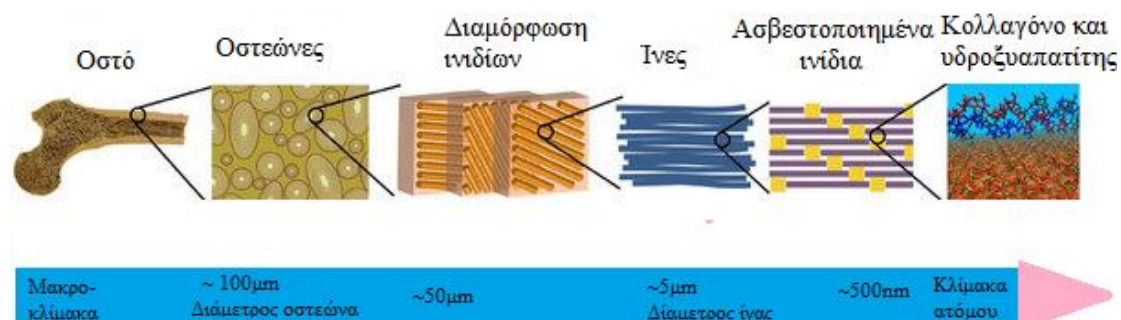
Οι οστεοβλάστες ανευρίσκονται πυκνά διατεταγμένοι μεταξύ τους στις επιφάνειες του οστού. Η πιο εμφανής λειτουργία τους είναι η σύνθεση και έκκριση της οργανικής θεμέλιας ουσίας, αλλά πιθανολογείται ότι παίζουν κάποιο ρόλο στον έλεγχο της ανταλλαγής ηλεκτρολυτών μεταξύ εξωκυττάρων και οστικών υγρών και πιθανώς επίσης ότι επηρεάζουν την διαδικασία επιμετάλλωσης της οργανικής θεμέλιας ουσίας, διαμέσου της παραγωγής των matrix vesicles. Οι ενεργοποιημένοι οστεοβλάστες μπορεί να α) παραμείνουν στην επιφάνεια του οστού, μειώνοντας τη συνθετική τους δραστηριότητα και παίρνοντας την πιο επίπεδη μορφή των bone-lining cells, β) να εγκλωβισθούν μέσα σε οργανική θεμέλιο ουσία και να εξελιχθούν σε οστεοκύτταρα, ή γ) να εξαφανισθούν από τις περιοχές οστικής σύνθεσης.

Οι οστεοκλάστες, προερχόμενοι από αιμοποιητικά αρχέγονα κύτταρα, ανευρίσκονται σπάνια στο φυσιολογικό οστόν. Ενίοτε είναι δυνατό να εντοπισθούν στην επιφάνεια του ενδοστικού, περιοστικού ή αβερσιανού οστού. Στο περιόστεο και στο σπογγώδες οστόν, δημιουργούν μια χαρακτηριστική κοιλότητα, που είναι γνωστή ως Howship lacuna. Στο πυκνό φλοιώδες οστόν, δημιουργούν τους λεγόμενους osteonal cutting cones, οι οποίοι εκτείνονται μέσα στο οστόν σχηματίζοντας κοιλότητες οστικής απορρόφησης. Το πιο χαρακτηριστικό στοιχείο των οστεοκλαστών είναι η πολύπλοκη ενδίπλωση της κυτταρικής μεμβράνης, στο σημείο που αυτή εφάπτεται στην περιοχή της απορρόφησης του οστού, γνωστή ως ruffled ή brush border. Οι οστεοκλάστες καταστρέφουν το οστόν συνδεδεμένοι με την επιφάνεια του οστού και σχηματίζοντας ένα κλειστό χώρο μεταξύ του κυττάρου και της οστικής θεμέλιας ουσίας. Αντλίες ιόντων εισέρχονται στην κυτταρική μεμβράνη, το brush border σχηματίζεται και οι αντλίες μεταφέρουν πρωτόνια στον σφραγισμένο αυτό χώρο, μειώνοντας το pH από ~7 σε ~4. Το όξινο pH διαλύει το οστικό mineral και το κύτταρο εκκρίνει όξινες πρωτεάσες, οι οποίες αποσυνθέτουν την οργανική θεμέλιο ουσία [Πετρά, 2003].

1.4. Οστική φάση (Bone matrix)- Οργανική-Ανόργανη

Συνιστά περισσότερο από το 90% του όγκου του πεταλιώδους οστού, ενώ το υπόλοιπο αποτελείται από κύτταρα, κυτταρικές προεκβολές και αιμοφόρα αγγεία. Ο οστίτης ιστός έχει μεγάλη σταθερότητα και μπορεί να παραμείνει ουσιαστικά αναλλοίωτος και να διατηρήσει την αντοχή του για αιώνες μετά τον θάνατο του ανθρώπου. Η ανόργανη οστική φάση αποτελεί το ~65% του υγρού βάρους του οστού και του δίνει αντοχή σε δυνάμεις συμπίεσης. Η οργανική οστική φάση αποτελεί το ~20% του υγρού βάρους του οστού και συμβάλλει στην ικανότητα του ιστού να αντέχει σε δυνάμεις τάσης. Το υπόλοιπο 10% του υγρού βάρους του ιστού αποτελείται από νερό.

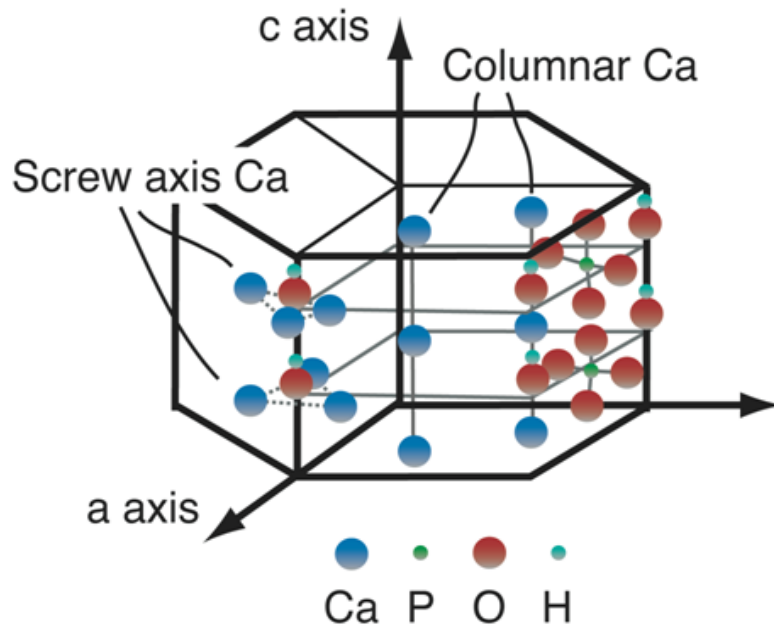
Στο Σχήμα 1.2 παρουσιάζεται η δομή του οστού από τη μακροκλίμακα του σκελετού στη νανοκλίμακα του κολλαγόνου και του υδροξυαπατίτη.



Σχήμα 1.2: Δομή του οστού ξεκινώντας από μακροσκοπικό επίπεδο και φθάνοντας στα βασικά δομικά του συστατικά [Nair et al., 2012].

1.4.1. Ανόργανη οστική φάση – Βιολογικός απατίτης

Η ανόργανη οστική φάση (bone mineral) δεν είναι αμιγής υδροξυαπατίτης, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, αλλά βιολογικός απατίτης, με μειωμένη περιεκτικότητα σε ασβέστιο και υδροξύλια, που περιέχει σημαντικές ποσότητες ανθρακικών και φωσφορικών (και όξινων φωσφορικών) ομάδων (Σχήμα 1.3). Μαγνήσιο, κάλιο, φθόριο και κιτρικό (citrate) ανευρίσκονται επίσης συχνά.



Σχήμα 1.3: Δομή κρύσταλλου του υδροξυαπατίτη [Uddin et al., 2010].

Οι κρύσταλλοι του οστικού βιολογικού απατίτη, συγκρινόμενοι με τους κρυστάλλους του απατίτη που ανευρίσκεται στα δόντια και στους γεωλογικούς απατίτες, είναι σχετικά μικροί (200-400 Å σε μέγιστη διάμετρο). Αυτό το μικρό μέγεθος των οστικών κρυστάλλων διευκολύνει την ενσωμάτωση και απορρόφηση των εξωγενών ιόντων καθώς και την αποσύνθεση της ανόργανης οστικής φάσης στο όξινο περιβάλλον που δημιουργούν οι οστεοκλάστες κατά τη διάρκεια του οστικού ανασχηματισμού (remodelling). Το μικρό μέγεθος των οστικών κρυστάλλων παρέχει τέλος δομική σταθερότητα/αντοχή στο σύμπλεγμα ανόργανη οστική μάζα-κολλαγόνο.

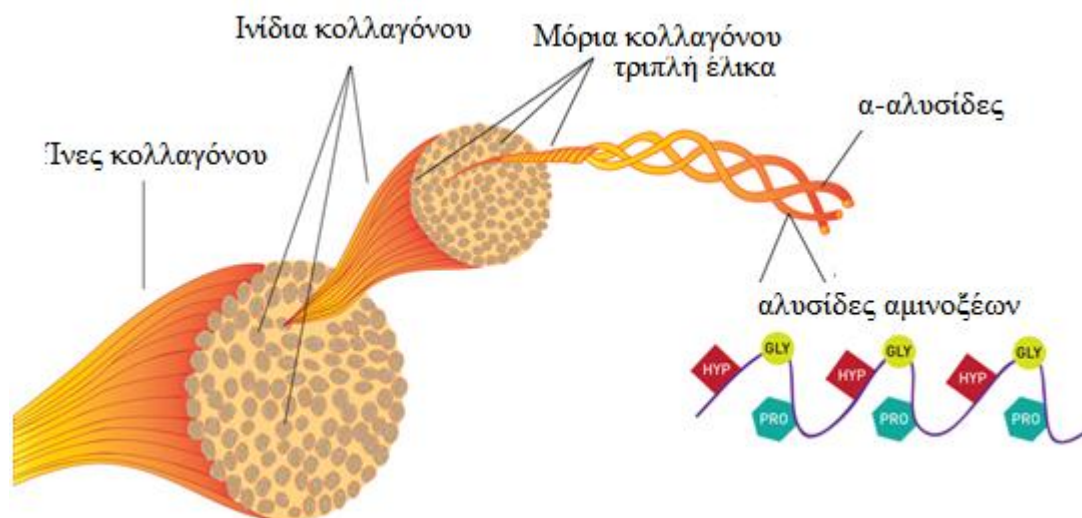
1.4.2. Οργανική οστική μάζα – Κολλαγόνο τύπου I

Το δεύτερο κυριότερο συστατικό του οστού είναι το κολλαγόνο, το οποίο επικρατεί σε αρχιτεκτονική τύπου I, ενώ συνυπάρχουν μικρές ποσότητες κολλαγόνου τύπου V και XII. Το κολλαγόνο συνιστά περίπου το ~90% της οργανικής φάσης. Το υπόλοιπο 10% συνίσταται σε μη-κολλαγονούχες γλυκοπρωτεΐνες και πρωτεογλυκάνες ειδικές για το οστόν. Το κολλαγόνο παρέχει στο οστόν ελαστικότητα και ευκαμψία και κατευθύνει την οργάνωση της θεμέλιας ουσίας. Τα ινίδια κολλαγόνου οργανώνονται κυκλωτερώς στο οστεωνικό οστόν. Διατάσσονται σπειροειδώς στα οστικά πετάλια και εμφανίζουν τον ίδιο προσανατολισμό μέσα στο

ίδιο πετάλιο, αλλά διαφορετικό προσανατολισμό από πετάλιο σε πετάλιο. Σε ιστούς που έχουν επιμεταλλωθεί φυσιολογικά, οι επιμήκεις άξονες των κρυστάλλων απατίτη διατάσσονται πάντα παράλληλα προς τον άξονα των ινιδίων κολλαγόνου. Μέσω αυτού του προσανατολισμού οι κρύσταλλοι συμβάλλουν στην ισχύ και αντοχή του οστού. Το νερό συνιστά το 5-10% του βάρους του ιστού. Η ενυδάτωση του ιστού είναι απαραίτητη τόσο για την θρέψη και για τη λειτουργία των κυττάρων όσο και για τις εμβιομηχανικές ιδιότητες του συμπλέγματος ανόργανη οστική μάζα – κολλαγόνου. Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ νερού και κολλαγόνου συμβάλλουν στη σταθερότητα των ινιδίων κολλαγόνου και έχει προταθεί η υπόθεση ότι πιθανώς να συμβαίνει αφυδάτωση του οστικού κολλαγόνου (δηλαδή αντικατάσταση του νερού από την ανόργανη οστική φάση) κατά την διαδικασία επιμετάλλωσης. Παρόλα αυτά, η μεταβολή της περιεκτικότητας του νερού κατά την επιμετάλλωση δεν είναι ικανή για να εξηγήσει τον όγκο που καταλαμβάνει η οστική ανόργανη μάζα.

Οι μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες του οστού είναι η οστεοκαλσίνη, η οστεονεκτίνη, η οστεοποντίνη και διάφορες άλλες πρωτεΐνες, που συνδέονται με μόρια υδατανθράκων. Η οστεοκαλσίνη αποτελεί περίπου το 2% της πρωτεΐνης του σπονδυλωτού οστού. Η οστεονεκτίνη (βρίσκεται στα αιμοπετάλια) έχει ισχυρή συγγένεια τόσο με τον υδροξυαπατίτη όσο και με το κολλαγόνο. Γενικότερα, η ακριβής λειτουργία αυτών των πρωτεϊνών δεν είναι γνωστή. Πάντως, μερικές συνδέονται με ασβέστιο και άλλα ιόντα μετάλλων και έτσι ίσως παίζουν ρόλο στην εφάλατωση των οστών [Πετρά, 2003, Martin, 1998].

Το κολλαγόνο αποτελείται από τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες που σχηματίζουν τριπλή α-έλικα. Καθεμία από τις αλυσίδες αποτελείται από 1000 περίπου αμινοξέα. Μια επαναλαμβανόμενη ακολουθία τριών αμινοξέων, της γλυκίνης (Gly), της προλίνης (Pro) και της υδροξυπρολίνης (Hyp), διαμορφώνει αυτήν την ισχυρή δομή του κολλαγόνου. Έτσι, το ένα τρίτο των αμινοξέων του είναι γλυκίνη, 10% προλίνη και 10% υδροξυπρολίνη (Σχήμα 1.4).



Σχήμα 1.4: Δομή ινιδίων κολλαγόνου.

Η υδροξυπρολίνη, που είναι σημαντική για τη σταθερότητα του κολλαγόνου, δημιουργείται με τροποποίηση της κανονικής προλίνης, αφού έχει σχηματισθεί η αλυσίδα του κολλαγόνου. Η αντίδραση απαιτεί την παρουσία βιταμίνης C, για να γίνει δυνατή η προσθήκη του οξυγόνου. Η δευτεροταγής δομή του κολλαγόνου έχει διαμόρφωση α-έλικας και φαίνεται να κατέχει το σημαντικότερο λόγο στην ανάπτυξη του οστού. Οι τρεις αλυσίδες που σχηματίζουν τριπλή α-έλικα, συγκρατούνται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου [Κολοβού, 2008].

1.5. Κύτταρα των οστών

1.5.1. Αναδιαμόρφωση του οστού

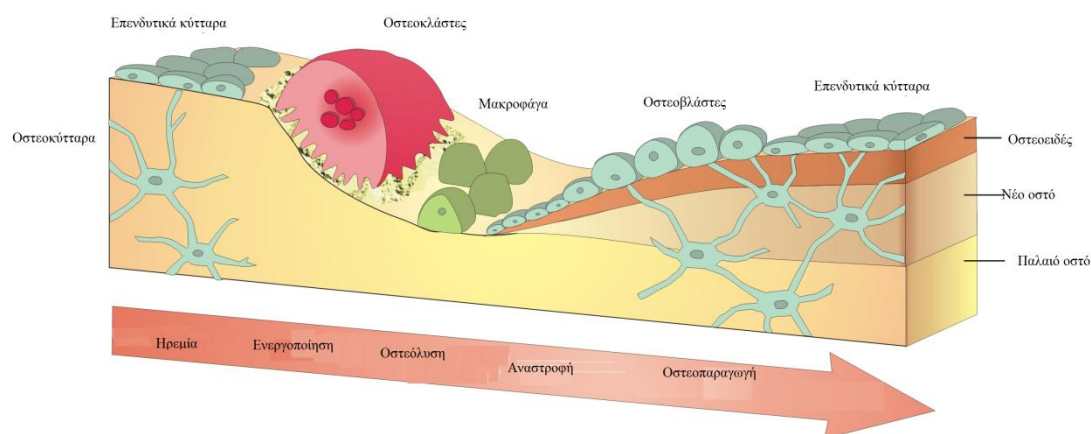
Η σταθερότητα των οστών σε όλη τη διάρκεια της ζωής μας αποδίδεται στην ανανέωση των οστών. Το παλαιό οστόν απομακρύνεται (απορρόφηση), ενώ συγχρόνως δημιουργείται (σχηματισμός) το νέο οστόν. Κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας και στην αρχή της ενηλικίωσης, το οστόν γίνεται μεγαλύτερο, βαρύτερο και πυκνότερο και ο σχηματισμός των οστών είναι τότε σημαντικότερος από την απορρόφησή τους.

Η μάζα των οστών αυξάνει μέχρι την ηλικία των 20-25 όπου αποκτά την μέγιστη τιμή της, και ορίζει την Μέγιστη Μάζα Οστών ή μέγιστη οστική πυκνότητα και δύναμη. Όσο μεγαλύτερη είναι η μέγιστη μάζα των οστών, τόσο χαμηλότερος είναι ο κίνδυνος της οστεοπόρωσης. Η οστική μάζα παραμένει σταθερή για μερικά έτη (για τις γυναίκες, μέχρι 45 ετών περίπου), οπότε υπάρχει μια τέλεια ισορροπία

μεταξύ του σχηματισμού και της απορρόφησης των οστών. Μετά από μια ορισμένη ηλικία, η οστική μάζα αρχίζει να μειώνεται. Για τις γυναίκες, αυτή η απώλεια οστών αρχίζει μερικά έτη πριν από την εμμηνόπαυση και γίνεται όλο και περισσότερο σημαντική μέχρι το θάνατο [Πετρά, 2003, Martin, 1998, Robey & Boskey, 1996].

1.5.2. Κύκλος της οστικής αναμόρφωσης

Δύο κύριοι τύποι κυττάρων είναι αρμόδιοι για την ανανέωση των οστών: οι οστεοβλάστες, που συμμετέχουν στο σχηματισμό των οστών και οι οστεοκλάστες, που συμμετέχουν στην απορρόφηση τους. Παρόλο που η τρισδιάστατη γεωμετρία των οστεώνων διαφέρει στο φλοιώδες και σπογγώδες οστόν, οι μονάδες οστικής αναμόρφωσης σε κάθε τύπο οστού συμπεριφέρονται βασικά με τον ίδιο τρόπο. Η λειτουργία τους μπορεί να αναλυθεί σε τέσσερις διαφορετικές φάσεις: ενεργοποίηση, απορρόφηση, αναστροφή και σχηματισμός του νέου οστού (Σχήμα 1.5) [Πετρά, 2003].



Σχήμα 1.5: Η οστική ανακατασκευή είναι μια δυναμική διαδικασία, η οποία ρυθμίζει την ισορροπία της απορρόφησης του παλαιού οστού από τους οστεοκλάστες και της απόθεσης του νέου οστού, που παράγεται από τους οστεοβλάστες, σε μία σύνθετη και πολυπαραγοντική εξεργασία εναλλαγής. (<http://www.york.ac.uk/res/bonefromblood/background/boneremodelling.html>)

I. Ενεργοποίηση

Το στάδιο της ενεργοποίησης περιλαμβάνει την κινητοποίηση των μονοπύρηνων πρόδρομων μορφών των οστεοκλαστών, τη διείσδυση των

επιφανειακών οστεοκυττάρων και τον σχηματισμό ενεργών οστεοκλαστών που βρίσκονται σε επαφή με επιμεταλλωμένη θεμέλιο ουσία [Πετρά, 2003, Martin, 1998, Robey & Boskey, 1996].

II. Απορρόφηση

Στην απορρόφηση των οστεώνων συμμετέχουν οι οστεοκλάστες από τα κανάλια Haversian, οι οποίοι διαβρώνουν τα πεταλώδη μέρη οδηγώντας έτσι στο σχηματισμό κοιλοτήτων απορρόφησης. Αυτές μπορούν να συνδεθούν με κοιλότητες απορρόφησης από παρακείμενους οστεώνες [Πετρά, 2003, Martin, 1998, Robey & Boskey, 1996].

III. Αναστροφή

Η φάση αυτή σηματοδοτεί τη μετάβαση από τη φάση της οστικής αποδόμησης στη φάση σχηματισμού νέου οστού. Οι περιοχές απορρόφησης εγκαταλείπονται από τους οστεοκλάστες και καταλαμβάνονται από ομάδες μονοπύρηνων κυττάρων. Κατά τη φάση της αναστροφής συμβαίνει και σύζευξη της οστικής απορρόφησης και οστικής σύνθεσης [Πετρά, 2003, Martin, 1998, Robey & Boskey, 1996].

IV. Σχηματισμός νέου οστού

Οι οστεοβλάστες και οι πρόδρομες μορφές τους συγκεντρώνονται στην κατάλληλη εντόπιση, την κατάλληλη στιγμή και σε ικανό αριθμό για να ξαναγεμίσουν την κοιλότητα απορρόφησης. Ο σχηματισμός του οστού ξεκινά με την εναπόθεση από τους οστεοβλάστες οστεοειδούς ή οργανικής θεμέλιας ουσίας, που συνίσταται κυρίως σε κολλαγόνο τύπου I και διάφορα άλλα συστατικά (πρωτεογλυκάνες, υδατάνθρακες και μη-κολλαγονούχες πρωτεΐνες: οστεοκαλσίνη και οστεονεκτίνη). Στη συνέχεια, γίνεται η επιμετάλλωση της οργανικής θεμέλιας ουσίας, μετά την έναρξη της οποίας, το ανόργανο μέρος της οστικής φάσης αυξάνεται ταχύτητα κατά τη διάρκεια των πρώτων ημερών στο 75% της τελικής περιεκτικότητας σε ανόργανα συστατικά.

Ο σχηματισμός και η απορρόφηση των οστών επηρεάζονται από πολλούς παράγοντες. Το μεγαλύτερο ποσοστό ασβεστίου που αποθηκεύεται στο σώμα βρίσκεται στον οστίτη ιστό και μπορεί να απελευθερωθεί στο αίμα σύμφωνα με τις φυσιολογικές απαιτήσεις ή μπορεί εναλλακτικά να χρησιμοποιηθεί για να παράγει το νέο οστόν. Τα επίπεδα ασβεστίου στο εξωκυττάριο υγρό του σώματος είναι πολύ

καλά ρυθμισμένα. Τρεις ορμόνες, συγκεκριμένα, συμμετέχουν στην ομοιόσταση του ασβεστίου και είναι οι παρακάτω:

- **Παραθυροειδής ορμόνη (PTH)**
- **Καλσιτονίνη**
- **Βιταμίνη D₃**

Η PTH αυξάνει τα επίπεδα ασβεστίου στο αίμα προκαλώντας την δράση των οστεοκλαστών και την απορρόφηση των οστών. Ωστόσο εάν η έκκριση PTH είναι πολύ υψηλή, τότε υπάρχει μια επιτάχυνση στην αναδιοργάνωση των οστών. Η καλσιτονίνη έχει αντίθετη επίδραση προς την PTH και έτσι μειώνει τα επίπεδα ασβεστίου στο αίμα, ενθαρρύνει όμως το σχηματισμό οστίτη ιστού και μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην κλινική θεραπεία της οστεοπόρωσης. Οι ενεργοί μεταβολίτες της Βιταμίνης D₃ υποβοηθούν την απορρόφηση του διατροφικού ασβεστίου μέσω του λεπτού εντέρου. Η έλλειψη Βιταμίνης D₃ μπορεί να οδηγήσει σε λάθος ασβεστοποίηση του οστίτη ιστού, ενώ περίσσεια της συνεπάγεται απώλεια οστού [Πετρά, 2003, Martin, 1998, Robey & Boskey, 1996].

1.6. Παθήσεις οστών

Ο σκελετός αποτελείται από πάνω από 200 οστά, τα οποία απαρτίζουν το κύριο στηρικτικό ιστό του ανθρώπινου σώματος. Τα οστά είναι μία στερεή μορφή του συνδετικού ιστού και είναι υπεύθυνα για τη στήριξη και την προστασία του ανθρώπινου σώματος. Ο ρόλος τους είναι σημαντικός γιατί παρέχουν τη μηχανική υποστήριξη, την κινητικότητα και την προστασία των υπολοίπων οργάνων του οργανισμού. Η διατήρηση των βιολογικών και μηχανικών ιδιοτήτων του σκελετού επιτυγχάνεται με τη συνέργεια πολλών ρυθμιστικών παραγόντων.

Παρά την μηχανική του σταθερότητα, το οστό βρίσκεται σε μια διαρκή δυναμική κατάσταση, μεταβάλλοντας τόσο την εσωτερική του δομή όσο και το σχήμα του, ανταποκρινόμενο στις συνεχείς μεταβολές των φορτίων και των απαιτήσεων του μεταβολισμού των μετάλλων. Όλες αυτές οι ανακατανομές της σύνθεσης και της δομής των οστών γίνονται με τη δράση ειδικών κυττάρων, που υπόκεινται σε ορμονικούς αλλά και τοπικούς μηχανισμούς ρύθμισης.

Συστηματικές διαταραχές στο σκελετό που οφείλονται στην απορρύθμιση αυτών των μηχανισμών, μπορούν να οδηγήσουν σε διάφορες παθήσεις και ασθένειες στα οστά.

Οι οστικές παθήσεις διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες:

- Νεοπλασματικές (*N*)
- Μη νεοπλασματικές (*μη N*)

Παρακάτω, αναφέρονται διάφορες οστικές παθήσεις, οι οποίες και χαρακτηρίζονται ως Νεοπλασματικές ή μη Νεοπλασματικές.

1.5.1. Νεοπλασματικές οστικές παθήσεις

1. Ανευρυσματικές οστικές κύστες (N)

Στην περίπτωση αυτή δεν πρόκειται για πραγματικό νεόπλασμα, αλλά πιθανόν να είναι καλοήθης αντιδραστική αγγειακή βλάβη. Ένα ποσοστό απαντάται σε συνδυασμό με άλλους καλοήθεις ή κακοήθεις όγκους. Συνήθως εντοπίζονται στους σπονδύλους και στα μακρά οστά. Η χειρουργική αφαίρεση είναι η θεραπεία εκλογής. Οι τοπικές υποτροπές φαίνεται ότι μπορούν να ελαττωθούν με μετεγχειρητικές δόσεις της τάξεως των 2000-3000 cGy σε 2 έως 3 εβδομάδες. Η ακτινοθεραπεία εφαρμόζεται ως ριζική αγωγή επί εντοπίσεων στους σπονδύλους ή στα οστά της λεκάνης, επί ανεγχείρητων βλαβών και επί υποτροπών. Χορηγούνται 3000-4000 cGy σε 3-4 εβδομάδες [Κολοβού, 2008, Κυριακίδου, 2014].

2. Ηωσινόφιλο κοκκίωμα (N)

Ο όρος ηωσινόφιλο κοκκίωμα προτάθηκε από τους Lichtenstein και Jaffe το 1940 για να περιγράψουν έναν όγκο που διαβρώνει το οστόν και περιέχει μεγάλο αριθμό ηωσινόφιλων κυττάρων. Είναι δυνατόν να εμφανιστεί σε οποιοδήποτε όργανο ή σύστημα, αλλά εμφανίζεται συνηθέστερα στο δικτυοενδοθηλιακό σύστημα (οστά, λεμφαδένες, σπλήνας και ήπαρ).

Είναι σπάνιος όγκος αφού αποτελεί περίπου το 1% των βιοψιών που γίνονται σε πρωτοπαθείς όγκους των οστών.

Όσον αφορά στην εντόπιση περίπου το 70% των βλαβών αφορούν οστά όπως κρανίο, γνάθος (παρατηρείται απώλεια οδόντων), λεκάνη, πλευρές, σπόνδυλοι, ενώ το 30% περίπου των βλαβών εντοπίζονται σε μακρά οστά. Σπάνια είναι η εντόπιση στο ιερό οστού και στα οστά χεριών και ποδών (περίπου 1%).

Τέλος, εμφανίζεται συνηθέστερα σε ασθενείς ηλικίας 1-15 και προσβάλλει περισσότερο αγόρια παρά κορίτσια [Πουλημένος, 2012].

3. Λέμφωμα (N)

Το λέμφωμα είναι ένας τύπος καρκίνου που μπορεί να αναπτυχθεί όταν προκύψει σφάλμα στον τρόπο παραγωγής ενός λεμφοκυττάρου. Αναπτύσσεται σε πολλά μέρη του σώματος, συμπεριλαμβανομένων των λεμφαδένων, του σπλήνα, του *μυελού των οστών*, του αίματος ή άλλων οργάνων.

Το λέμφωμα είναι ο 5^{ος} πιο συχνός καρκίνος και η 7^η αιτία θανάτου στην Ευρώπη. Ορισμένες μορφές της νόσου θεραπεύονται πλήρως, ενώ άλλες ελέγχονται επαρκώς, ώστε η ποιότητα ζωής των ασθενών να μην επηρεάζεται αρνητικά [Πουλημένος, 2012].

4. Νευροβλάστωμα (N)

Ως νευροβλάστωμα χαρακτηρίζεται ένα κακοήθες νεόπλασμα, το οποίο μπορεί να αναπτυχθεί σε οποιοδήποτε μέρος του νευρικού συστήματος.

Ο λόγος για τον οποίο αναφέρεται η συγκεκριμένη ασθένεια είναι διότι το νεόπλασμα δίνει πρώιμα μεταστάσεις στα οστά, μεταξύ άλλων (ήπαρ, πνεύμονες, λεμφαδένες) [Πουλημένος, 2012].

5. Οστεοειδές οστέωμα (N)

Το οστεοειδές οστέωμα είναι ένας σχετικά συνηθισμένος επώδυνος καλοήθης όγκος των οστών. Το κύριο σύμπτωμα είναι ο πόνος που γίνεται χειρότερος στη διάρκεια της νύκτας. Το δεύτερο συχνότερο σύμπτωμα είναι το οίδημα, που είναι δυνατόν να αναδείξει κυρίως ένα ανώδυνο οστεοειδές οστέωμα στα δάκτυλα ή τον καρπό. Εάν υπάρχει κοντά σε άρθρωση είναι δυνατόν να προκαλέσει περιορισμό στη κίνηση σ' αυτήν.

Συνηθέστερα, εμφανίζεται σε ηλικίες μεταξύ 20 και 30 και σπάνια σε ηλικίες άνω των 40 [Πουλημένος, 2012].

6. Οστεοσάρκωμα (N)

Είναι η συχνότερη μορφή καρκίνου των οστών. Εντοπίζεται στα οστά γύρω από το γόνατο, στο μηρό, στην κνήμη, στο βραχίονα και σε άλλα οστά του σώματος. Στους ηλικιωμένους μπορεί να παρουσιαστεί σε συσχέτισμό με την ασθένεια του Paget.

Συνήθως προσβάλλει παιδιά, έφηβους και νεαρούς ενήλικες, στις ηλικίες από 10 έως 25 ετών [Πουλημένος, 2012].

7. Σάρκωμα του Ewing (N)

Είναι ένα σπάνιο κακόηθες πρωτοπαθές νεόπλασμα των οστών, το οποίο προέρχεται από τον ερυθρό μυελό. Εμφανίζεται κυρίως σε άτομα κάτω των 30 ετών και ιδίως σε παιδιά μεταξύ 5-15 ετών. Εντοπίζεται συνήθως σε οστά πλούσια σε μυελό, όπως στο μηριαίο, στην κνήμη, στο βραχιόνιο, στα οστά της λεκάνης και στις πλευρές. Είναι λίαν ακτινοευαίσθητος όγκος. Έχουν εφαρμοστεί διάφορες ακτινοθεραπευτικές τεχνικές στοχεύοντας στην μείωση των απότερων ακτινικών επιπλοκών. Εφαρμόζεται ακτινοθεραπεία με 2x120 cGy ημερησίως, φθάνοντας συνολικά τα 5000-6000 cGy, ανάλογα με τη χημειοθεραπευτική ανταπόκριση. Χορηγείται υψηλότερη δόση επί παρουσίας υπολειμματικής νόσου. Με τα σχήματα αυτά φαίνεται να επιτυγχάνεται υψηλός τοπικός έλεγχος, με λιγότερα παθολογικά κατάγματα και καλύτερη λειτουργικότητα του μέλους [Κολοβού, 2008, Κυριακίδου, 2014].

8. Χονδροσάρκωμα (N)

Τα χονδροσαρκώματα προέρχονται από τα χόνδρινα στοιχεία του οστού, διακρίνονται στα πρωτοπαθή και στα δευτεροπαθή. Τα δευτεροπαθή χονδροσαρκώματα προέρχονται από προϋπάρχουσες βλάβες των οστών, οι συχνότερες εκ των οποίων είναι τα εγchonδρώματα και τα οστεοchonδρώματα, κυρίως δε όταν είναι οικογενή και πολλαπλά. Το μεγαλύτερο ποσοστό των χονδροσαρκωμάτων εντοπίζονται στα οστά της λεκάνης και το άνω τμήμα του μηριαίου και του βραχιονίου οστού. Η θεραπεία εκλογής είναι η πλήρης χειρουργική αφαίρεση με διατήρηση του μέλους, όποτε αυτό είναι εφικτό. Οι όγκοι αυτοί είναι αρκετά ακτινοανθεκτικοί σε ορισμένες περιπτώσεις με πολύ κακό ιστολογικό τύπο (π.χ. μεσεγχυματικός τύπος) ή με εντοπίσεις στον κεντρικό σκελετό. Η

μετεγχειρητική ακτινοθεραπεία (5000 cGy σε 5 εβδομάδες) έδωσε καλά αποτελέσματα, ακόμη και σε περιπτώσεις ανεγχείρητων όγκων [Κυριακίδου, 2014, Κολοβού, 2008].

9. Πολλαπλούν μυέλωμα (N)

Πρόκειται για το συχνότερο πρωτοπαθές νεόπλασμα των οστών, προέρχεται από τον μυελό και ειδικότερα από τα πλασμοκύτταρα, όταν κυριαρχούν τα δυσκρασικά. Κυρίως εντοπίζονται στον κεντρικό σκελετό και στο εγγύς τμήμα των άκρων. Η πρόγνωση ποικίλει, με επιβίωση περισσότερο των 5 ετών στο 20% των περιπτώσεων. Η ακτινοθεραπεία εφαρμόζεται στις ακόλουθες περιπτώσεις. Στην ανακούφιση των οστικών αλγών, στη μη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία και στην αποφυγή των παθολογικών καταγμάτων, τα οποία μπορούν να προκαλέσουν συμπίεση του νωτιαίου μυελού ή των νευρικών ριζών σε οστά που δέχονται το βάρος του σώματος. Η δόση είναι συνήθως η τυπική δόση μεταστατικής οστικής νόσου (10x300 cGy =3000 cGy ή 5x400 cGy=2000 cGy), αν και στο πολλαπλούν μυέλωμα χαμηλότερες δόσεις της τάξεως των 1500 cGy έως 2000 cGy με 200 cGy έως 250 cGy/συνεδρία φαίνεται να επιφέρουν ικανοποιητικά αποτελέσματα [Κολοβού, 2008, Κυριακίδου, 2014].

10. Ινοσάρκωμα (N)

Πρόκειται για τον σπανιότερο κακοήθη όγκο των πρωτοπαθών σαρκωμάτων του συνδετικού ιστού. Το ινοσάρκωμα των οστών θεωρείται ότι είναι σπάνια νεοπλασία. Κυρίως εντοπίζεται στα μακρά οστά, ειδικά στις μεταφύσεις του μηριαίου και της κνήμης. Θεραπευτικά αντιμετωπίζεται με ριζική χειρουργική αφαίρεση. Η ακτινοθεραπεία έχει θέση, επί ανεγχείρητων όγκων, επί υπολειμματικής νόσου μετεγχειρητικός και για ανακουφιστικούς λόγους [Κολοβού, 2008, Κυριακίδου, 2014].

11. Γιγαντοκυτταρικός όγκος (N)

Ο γιγαντοκυτταρικός όγκος προέρχεται από τους οστεοκλάστες, είναι ο πέμπτος ή ο έκτος συχνότερος πρωτοπαθής όγκος των οστών. Πρόκειται για ένα καλοήγη όγκο, ο οποίος σε ένα μικρό ποσοστό είναι κακοήθης και μεταστατικός. Κυρίως εντοπίζεται στις επιφύσεις των μακρών οστών. Σε αυτές τις περιπτώσεις με τη χειρουργική αφαίρεση μπορεί να θεραπευτεί το 90% των καλοηθών όγκων.

Εκτεταμένες αλλοιώσεις ή μαζικές υποτροπές ενδέχεται να απαιτήσουν ακόμα και τον ακρωτηριασμό του μέλους. Η ακτινοθεραπεία μπορεί να εφαρμοστεί είτε μετεγχειρητικώς επί υπολειμματικής νόσου με δόση 3500-4500 cGy σε 3,5-4,5 εβδομάδες, είτε ως ριζική αγωγή σε ανεγχείρητους όγκους με δόση 4500-5500 cGy σε 4,5-5,5 εβδομάδες. Η εφαρμογή της ακτινοθεραπείας στους καλοήθεις όγκους θεωρείται πιθανόν, ότι μπορεί να προκαλέσει κακοήθη εξαλλαγή, αν και το θέμα παραμένει ακόμη αμφιλεγόμενο [Κολοβού, 2008, Κυριακίδου, 2014].

12. Οστικές μεταστάσεις (N)

Τα δευτεροπαθή νεοπλάσματα είναι οι συχνότεροι κακοήθεις όγκοι των οστών. Οι πλέον συχνοί όγκοι στους ενήλικες, οι οποίοι εφίσταται στα οστά, είναι ο καρκίνος του προστάτου, των βρόγχων, του μαστού, των νεφρών και του θυρεοειδούς αδένος. Κυρίως εντοπίζονται εκεί όπου υπάρχει άφθονος ερυθρός μυελός. Ειδικότερα στον κεντρικό σκελετό, όπως στους σπονδύλους και στα οστά της πυέλου, στο εγγύς τμήμα των μηριαίων, στα οστά του κρανίου, στις πλευρές και στο εγγύς τμήμα των βραχιονίων. Η ακτινοθεραπεία αποτελεί τη βασική μέθοδο στην αντιμετώπιση των επώδυνων μεταστάσεων. Υπάρχουν διάφορα ανακουφιστικά σχήματα με παρόμοια βιολογική δραστηριότητα και αποτελεσματικότητα στην ύφεση του άλγους: 4000 cGy σε 20 συνεδρίες, 3000 cGy σε 10 συνεδρίες, 2000 cGy σε 4 έως 5 συνεδρίες και 800 cGy χορηγούμενα εφάπαξ [Κολοβού, 2008, Κυριακίδου, 2014].

1.5.2. Μη νεοπλασματικές οστικές παθήσεις

1. Αρθρίτιδες (μη N)

Η αρθρίτιδα είναι μία αρρώστια που προσβάλλει αρχικά τις αρθρώσεις και στη συνέχεια μπορεί να προσβάλλει και τα κύρια όργανα του σώματος. Χαρακτηριστικό της αρθρίτιδας είναι η φλεγμονή που δημιουργείται γύρω από το σημείο ένωσης των οστών, δηλαδή στο χόνδρο. Κάθε άρθρωση έχει μία μεμβράνη, η οποία διευκολύνει την κίνηση και η οποία διατηρεί ένα ειδικό υγρό, το αρθρικό υγρό.

Το πρόβλημα που προκαλεί η ασθένεια είναι η μείωση του αρθρικού υγρού με τελικό αποτέλεσμα να χάνει ο χόνδρος την ελαστικότητά του, να τρίβονται τα οστά μεταξύ τους προκαλώντας έτσι φλεγμονή και πόνο.

Η αρθρίτιδα εμφανίζεται συνήθως σε ηλικίες άνω των 50 και προσβάλλει περισσότερο τις γυναίκες [Πουλημένος, 2012].

2. Νόσος Gaucher (μη N)

Η νόσος Gaucher είναι μια κληρονομική ασθένεια και οφείλεται σε δύο μεταλλαγμένα γονίδια. Για να εκδηλώσει κάποιος τη νόσο πρέπει να έχει κληρονομήσει δύο μεταλλαγμένα γονίδια, ένα από κάθε γονέα (υπολειπόμενος χαρακτήρας).

Οι περισσότεροι ασθενείς με νόσο Gaucher παρουσιάζουν οστική συμμετοχή που εξελίσσεται με την πάροδο του χρόνου και μπορεί να δημιουργήσει πολλά προβλήματα.

Η συσσώρευση των κυττάρων Γκοσέ στο μυελό των οστών μπορεί, με πολλούς τρόπους, να προκαλέσει οστική βλάβη. Ενδεικτικά, αναφέρονται η καταστροφή του οστίτη ιστού, η μείωση της οστικής μάζας που οδηγεί σε οστεοπενία, καθώς και η δημιουργία μη φυσιολογικών, σκληρυντικών περιοχών που οδηγού σε οστεοσκλήρυνση [Πουλημένος, 2012].

3. Νόσος Legg-Calve-Perthes (μη N)

Η **άσηπτη νέκρωση της μηριαίας κεφαλής** ή νόσος Legg - Calve - Perthes πήρε το όνομά της από τους τρεις ερευνητές. Συχνότερα την ονομάζουμε νόσο Perthes. Πρόκειται για νέκρωση, καθίζηση και επιπέδωση της κεφαλής του μηριαίου στα παιδιά.

Η νόσος Perthes αυτοϊάται. Ο οργανισμός έχει την τάση να ανακατασκευάζει τη βλάβη και τείνει να δώσει στην κεφαλή το φυσιολογικό σχήμα ή τουλάχιστον ένα σχήμα που να την διατηρεί εντός της κοτύλης. Όσο πιο μικρό το παιδί τόσο πιο πολύ μπορεί να γίνει ανακατασκευή.

Προσβάλλει περίπου 1 στα 10.000 παιδιά, τα αγόρια 4 φορές περισσότερο από τα κορίτσια, με συνηθέστερη ηλικία 4-10 έτη [Πουλημένος, 2012].

4. Νόσος Paget (μη N)

Η νόσος Paget, ή παραμορφωτική οστεΐτιδα, χαρακτηρίζεται από πάχυνση και αύξηση του μεγέθους των οστών, των οποίων διαταράσσεται και η εσωτερική αρχιτεκτονική. Είναι μία χρόνια οστική ανωμαλία της οποίας το αποτέλεσμα είναι

οστά παραμορφωμένα και μεγαλύτερα του φυσιολογικού, καθώς το οστό σχηματίζεται με μεγαλύτερο ρυθμό από ότι αποδομείται.

Η νόσος χαρακτηρίζεται από υπέρμετρη αύξηση της οστικής αποδόμησης αλλά και του οστικού σχηματισμού. Η μεγάλη αυτή αύξηση της οστικής ανακατασκευής οδηγεί στην παραγωγή παθολογικού οστού, μειωμένης αντοχής και αρχιτεκτονικά ανώμαλου, με κύρια κλινικά συμπτώματα όπως πόνος, αρθρίτιδα, παραμόρφωση και κατάγματα.

Η νόσος μπορεί να οφείλεται είτε σε λοίμωξη από ιό, είτε σε κληρονομικά αίτια. Και τα δύο φύλα προσβάλλονται με την ίδια συχνότητα και συνηθέστερα σε ηλικίες άνω των 40 [Καλονάκης, 2007, Πουλημένος, 2012].

5. Οστεομυελίτιδα (μη N)

Η οστεομυελίτιδα είναι μία λοίμωξη των οστών που αρκετά συχνά ταλαιπωρεί τους ασθενείς. Προσβάλλει περίπου 2:10.000 άτομα και εάν αφηθεί χωρίς θεραπεία μπορεί να οδηγήσει σε νέκρωση και καταστροφή του οστού.

Μπορεί να προκληθεί από μία ποικιλία μικροοργανισμών: βακτήρια με πιο συνήθη το Σταφυλόκοκκο και το Στρεπτόκοκκο, μυκοβακτηρίδια και μύκητες.

Η οστεομυελίτιδα, στο 70-80% των περιπτώσεων, αφορά το μηριαίο οστόν και την κνήμη [Πουλημένος, 2012].

6. Σύνδρομο Reiter/Αντιδραστική αρθρίτιδα (μη N)

Το σύνδρομο Reiter χαρακτηρίζεται από την κλασική τριάδα συμπτωμάτων “αρθρίτιδα, επιπεφυκίτιδα και ουρηθρίτιδα/τραχηλίτιδα” και είναι κοινό παράδειγμα αντιδραστικής αρθρίτιδας. Η ονομασία αυτή δεν χρησιμοποιείται πλέον στην ιατρική ορολογία και έχει αντικατασταθεί από τον όρο αντιδραστική αρθρίτιδα.

Ως αντιδραστική αρθρίτιδα χαρακτηρίζεται η οξεία φλεγμονή των αρθρώσεων, η οποία ακολουθεί λοιμώξεις αναπτυσσόμενες σε οποιαδήποτε περιοχή του σώματος [Πουλημένος, 2012].

7. Μεταβολικά νοσήματα των οστών (μη N)

Με τον όρο μεταβολικά νοσήματα εννοούμε διαταραχές σε σημαντικές βιοχημικές εξεργασίες του οργανισμού. Τα μεταβολικά νοσήματα εμφανίζονται αρχικά στο σπογγώδες οστό.

Το σπογγώδες οστό είναι εμφανώς πιο πορώδες από το φλοιώδες οστό. Έτσι, αν και αποτελεί το ένα τέταρτο της συνολικής μάζας του σκελετού, εξασφαλίζει τα 2/3 της συνολικής οστικής επιφάνειας. Αν προστεθεί και το γεγονός ότι καλύπτεται από τον μυελό των οστών, είναι εύκολο να αντιληφθεί κανείς γιατί τα αποτελέσματα των μεταβολικών νοσημάτων εμφανίζονται αρχικά στο σπογγώδες οστό.

Τα σημαντικότερα μεταβολικά νοσήματα που εμφανίζονται στα οστά είναι:

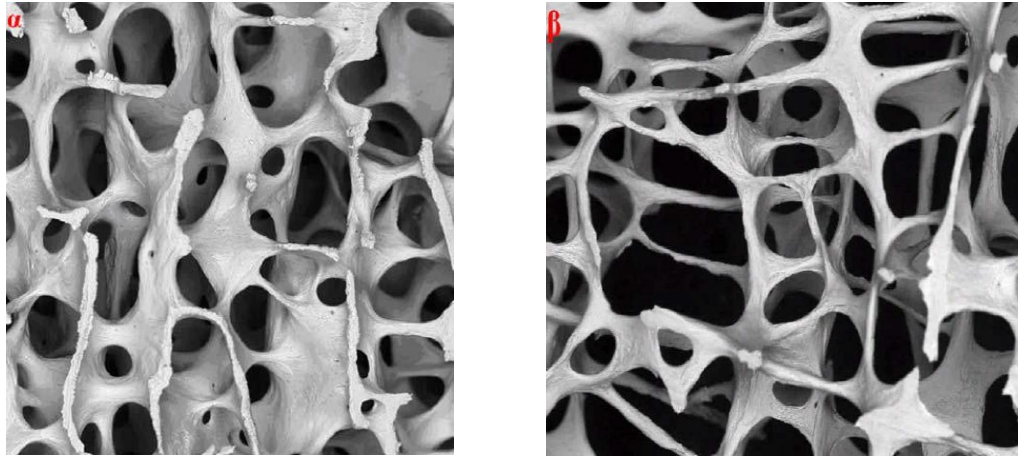
- οστεοπόρωση
- οστεομαλακία
- ραχίτιδα
- μυοσκελετικές διαταραχές από ενδοκρινοπάθειες, διαβήτη, αμυλοείδωση, αιμοχρωμάτωση, υπέρ/υποθυρεοειδισμός, υπό/υπερπαραθυρεοειδισμός, χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, αιμοδιάλυση κλπ [Πουλημένος, 2012].

Ενδεικτικά, παρακάτω αναλύονται κάποια από τα μεταβολικά νοσήματα των οστών.

α. Οστεοπόρωση

Μια από τις πιο διαδεδομένες νόσους των οστών είναι η οστεοπόρωση. Ο πρώτος ορισμός της οστεοπόρωσης δόθηκε από τον Albright το 1948, όπου την χαρακτηρίζει ως μία κατάσταση στην οποία υπάρχει “πολύ λίγο οστό μέσα στο οστό” [Παντέρη, 2005].

Η οστεοπόρωση αποτελεί μια διαταραχή που αφορά την ποσότητα της οστέινης ουσίας και την κατανομή της στο σκελετό. Η ποσοτική αυτή διαταραχή προκύπτει από αυξημένη οστική απώλεια ή από ελαττωμένη εναπόθεση οστέινης ουσίας φυσιολογικής σύστασης (Εικόνα 1.1). Μπορεί να οφείλεται σε δυσλειτουργία της σύζευξης μεταξύ οστεοβλαστικής και οστεοκλαστικής δραστηριότητας. Είναι ασθένεια κυρίως των γυναικών και μάλιστα προχωρημένης ηλικίας.



Εικόνα 1.1. Απεικόνιση τμήματος σπογγώδους οστού α) φυσιολογικού, β) οστεοπορωτικού [Καλονάκης, 2007].

Η οστεοπόρωση μπορεί να προκληθεί από οποιονδήποτε παράγοντα, τοπικό ή συστηματικό, ο οποίος επηρεάζει τη διαφοροποίηση και το μεταβολισμό των οστικών κυττάρων. Οι τοπικοί παράγοντες παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της οστεοπόρωσης, είτε επειδή δρουν απευθείας, είτε ως μεσολαβητές μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η δράση των συστηματικών ορμονών (οιστρογόνων).

Έτσι, η οστεοπόρωση σε κυτταρικό επίπεδο, είναι αποτέλεσμα της τροποποίησης κάποιων τοπικών παραγόντων που ελέγχουν την αλληλεπίδραση μεταξύ κυττάρων και θεμέλιας ουσίας κατά την οστική ανακατασκευή και έχουν ως κοινή εκδήλωση την ευθραυστότητα του σκελετού.

Η ασθένεια της οστεοπόρωσης δεν είναι εμφανής γιατί είναι ανώδυνη, έως τη στιγμή που εκδηλώνεται με αιφνιδιαστικά κατάγματα [Καλονάκης, 2007].

Άλλοι παράγοντες εμφάνισης της νόσου είναι: *ο αλκοολισμός, το κάπνισμα, οι κακές διατροφικές συνήθειες, η κληρονομικότητα, δίαιτα χαμηλή σε ασβέστιο, η έντονη αθλητική δραστηριότητα, η έλλειψη σωματικής άσκησης, οι ορμονικές ανωμαλίες.*

β. Οστεομαλακία

Η οστεομαλακία είναι η νόσος εκείνη των οστών η οποία χαρακτηρίζεται από ανεπαρκή ασβεστοποίηση των οστών με συνέπεια τη μαλάκυσή τους. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε έλλειψη ασβεστίου, εκσεσημασμένη υποφωσφαταιμία ή έλλειμμα στο μεταβολισμό της βιταμίνης D, που μπορεί να οφείλεται στη διατροφή, στην ανεπαρκή έκθεση στον ήλιο, κ.ά. Σε αυτές τις περιπτώσεις επιβραδύνεται ο οστικός μεταβολισμός [Καλονάκης, 2007].

γ. Ατελής οστεογένεση

Η ατελής οστεογένεση είναι μια από τις συχνά κληρονομούμενες διαταραχές ανάπτυξης, με συχνότητα εμφάνισης 1:20.000. Πρόκειται για διαταραχή του συνδετικού ιστού και σε αυτήν εμφανίζεται έλλειμμα στη σύνθεση κολλαγόνου τύπου I, που επηρεάζει οστά, δόντια, συνδέσμους, σκληρό χιτώνα οφθαλμών και δέρμα [Καλονάκης, 2007].

δ. Οστεοπέτρωση

Η οστεοπέτρωση αποτελεί σπάνια κληρονομική νόσο του σκελετού, που χαρακτηρίζεται από διαταραχή στη λειτουργία των οστεοκλαστών. Η οστεοκλαστική δυσλειτουργία οδηγεί σε γενικευμένη οστεοσκλήρυνση, που έχει ως αποτέλεσμα δυσλειτουργία του μυελού και του ανοσοποιητικού συστήματος, κατάγματα και νευρολογικές διαταραχές.

Η συχνότητα της αυτοσωματικής επικρατούσας μορφής της νόσου αυτής ανέρχεται σε 1:100.000. Τα οστά παρουσιάζουν πυκνή ασβεστοποίηση, αλλά είναι ελαφρώς εύθραυστα. Η πρωτοπαθής διαταραχή φαίνεται ότι οφείλεται σε έλλειψη οστικής απορροφήσεως και κατάλληλου ανασχηματισμού της εσωτερικής δομής των οστών [Καλονάκης, 2007].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΠΕΡΥΘΡΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΕ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ FOURIER

2.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Η υπέρυθρη ακτινοβολία (Infrared–IR) ανακαλύφθηκε από τον Sir William Herschel στα 1800. Ερευνούσε την ενέργεια που συνδέεται με τα διάφορα μήκη κύματος του φωτός στην ορατή περιοχή του φάσματος. Το ηλιακό φως εστιαζόταν σε ένα πρίσμα, για να παραχθεί το ευρέως γνωστό ορατό φάσμα. Στη συνέχεια, ένα θερμόμετρο μετακινούνταν αργά κατά μήκος του ορατού φάσματος από το ιώδες έως το ερυθρό φως και καταγράφονταν η θερμοκρασία που έδειχνε καθώς διέσχιζε το φάσμα. Καθώς ο Herschel μετρούσε τις διαφορετικές θερμοκρασίες του φάσματος, παρατήρησε ότι όλα τα χρώματα είχαν θερμοκρασίες υψηλότερες από ένα θερμόμετρο-μάρτυρα και ότι οι θερμοκρασίες αυξάνονταν όταν μετακινούσε το θερμόμετρο από το ιώδες προς το ερυθρό φως του φάσματος. Αφού κατέγραψε το γεγονός, αποφάσισε να μετρήσει τη θερμοκρασία ακριβώς χαμηλότερα από την ερυθρή περιοχή του φάσματος, σε μια περιοχή όπου δεν φαινόταν να υπάρχει ηλιακό φως και ανακάλυψε ότι αυτή η περιοχή είχε την υψηλότερη θερμοκρασία από όλες τις προηγούμενες. Την περιοχή αυτή την ονόμασε “calorific rays” και βρήκε ότι αυτές μπορούσαν να ανακλαστούν (reflected), να διαθλαστούν (refracted), να απορροφηθούν (absorbed) και να μεταδοθούν (transmitted) διαμέσου των υλικών, όπως ακριβώς και το ορατό φως. Από αυτά τα ευρήματα, ο Herschel ορθά συμπέρανε ότι θα πρέπει να υπάρχει και φως μη ορατό από το ανθρώπινο μάτι, πέρα (χαμηλότερα) από την ερυθρή περιοχή του ορατού φάσματος. Αυτές οι “calorific rays” αργότερα μετονομάστηκαν σε υπέρυθρο φως.

Τα πειράματα με το υπέρυθρο φως συνεχίστηκαν και οδήγησαν στην κατασκευή του πρώτου φασματοφωτόμετρου υπέρυθρου το 1835. Έτσι, η υπέρυθρη

φασματοσκοπία διαδόθηκε και καθιερώθηκε ως σημαντικό εργαλείο στο χημικό χαρακτηρισμό ενώσεων κατά τις δεκαετίες μεταξύ 1850 και 1900, μέσω των πρωτοποριακών εργασιών των Coblentz και Angstrom. Οι εφαρμογές της νέας τεχνικής στο χώρο της βιολογίας αρχικά ήταν περιορισμένες. Οι Elliot και Ambrose, το 1950, έδειξαν ότι η διαμόρφωση των πρωτεϊνών είναι δυνατόν να μελετηθεί με υπέρυθη φασματοσκοπία.

Περίπου στην ίδια εποχή οι Blout, Mellors και Woernley, ξεκινούσαν να αναλύσουν ανθρώπινους και ζωικούς ιστούς για να διερευνήσουν αν θα μπορούσαν να ταυτοποιήσουν διακριτά “δακτυλικά αποτυπώματα” για κάθε είδος ιστού. Η εφαρμογή όμως της υπέρυθρης φασματοσκοπίας σε βιολογικά δείγματα δεν ήταν ευρεία λόγω τεχνικών προβλημάτων.

Στο ίδιο χρονικό διάστημα, κατασκευάστηκε ένα καινούριο μηχάνημα, το οποίο στη συνέχεια θα έφερνε επανάσταση στις βιολογικές εφαρμογές της υπέρυθρης φασματοσκοπίας. Η ομάδα του Thompson (1949) έδειξε ότι ήταν δυνατό να γίνει σύζευξη ενός μικροσκοπίου αντανάκλασης (reflecting microscope) με το φασματοσκόπιο υπέρυθρου και να ληφθούν φάσματα μικρών σωματιδίων (κρυστάλλων και ινιδίων). Το πλεονέκτημα της νέας τεχνικής σε βιολογικές εφαρμογές ήταν προφανές: καθιστούσε δυνατή τη μελέτη των ιστών με πολύ υψηλή τοπολογική ανάλυση.

Όμως, η πραγματική επανάσταση στην υπέρυθη φασματοσκοπία ήταν η ανακάλυψη υψηλής απόδοσης φασματοφωτόμετρου υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier στην καρδιά του οποίου βρίσκεται το συμβολόμετρο. Το 1887 ο Πολωνικής καταγωγής φυσικός Albert A. Michelson εργαζόταν σε μια σειρά από πειράματα που σκοπό είχαν να μετρήσουν την ταχύτητα του φωτός με μεγάλη ακρίβεια. Εργάστηκε με ένα σύστημα από κάτοπτρα και ημι-διαφανή κάτοπτρα (semitransparent mirrors or beam splitters/διαχωριστές δέσμης), για να πετύχει τη σύγκλιση των αποκλινουσών ακτινών φωτός που προέρχονταν από την ίδια πηγή.

Τα οπτικά στοιχεία ήταν διατεταγμένα κατά τρόπο ώστε οι κατευθύνσεις και οι αποστάσεις των ακτινών φωτός να βρίσκονται πολύ κοντά ευθυγραμμισμένες η καθεμιά με τις γειτονικές της, με αποτέλεσμα οι δέσμες να αλληλεπιδρούν η μια με την άλλη. Εργάστηκε μαζί με τον Edward W. Morley στη διερεύνηση της ύπαρξης του “αιθέρα”, ενός υποθετικού μέσου/υλικού διαμέσου του οποίου πιστευόταν την εποχή εκείνη ότι διαδίδεται το φως. Παρόλο που τα αποτελέσματα των πειραμάτων ήταν αρνητικά, ο Michelson κατάφερε να μετρήσει την ταχύτητα του φωτός με

εξαιρετική ακρίβεια. Του απονεμήθηκε το βραβείο Nobel το 1907 για την δουλειά του πάνω στις μετρήσεις της ταχύτητας του φωτός με συμβολόμετρο (ιντερφερόμετρο).

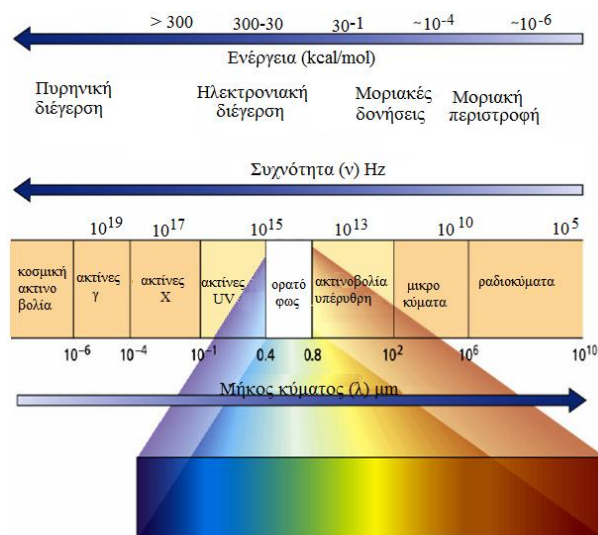
Η συμβολομετρία όμως δεν επρόκειτο να επιφέρει κάποια αλλαγή στην υπέρυθη φασματοσκοπία παρά μόνο μετά την εφεύρεση του laser και των υπολογιστών υψηλής τεχνολογίας. Η προσθήκη του HeNe laser στο συμβολόμετρο Michelson παρείχε μια ακριβή μέθοδο καταγραφής της μετατόπισης του κινούμενου κατόπτρου στο συμβολόμετρο και οι υπολογιστές υψηλής τεχνολογίας επέτρεψαν τη μετατροπή του σύνθετου και πολύπλοκου συμβολογραφήματος που προέκυπτε από τη χρήση πολυχρωματικής πηγής σε φασματοσκοπική πληροφορία [Θεοφανίδης, Αναστασοπούλου, 1997].

2.2. ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ FT-IR ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ

2.2.1. Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα

Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα ονομάζεται η ευρεία σειρά των ακτινοβολιών οι οποίες εκτείνονται από κοσμικές ακτίνες με μήκη κύματος από 10^{-9} nm μέχρι τα ραδιοκύματα με αντίστοιχα μήκη κύματος μεγαλύτερα των 1000 km. Ανάμεσα σε αυτά τα όρια συναντώνται οι ακτίνες γ , οι ακτίνες X, το άπω, μέσο και εγγύς υπεριώδες, το ορατό, το υπέρυθρο φως και τα μικροκύματα. Η φύση αυτών των ακτινοβολιών είναι ίδια και κινούνται με την ταχύτητα του φωτός. Η διαφορά συνίσταται στα μήκη κύματος ή την ενέργεια των παραγόμενων ακτινοβολιών και στα αποτελέσματα που προκαλούν στην ύλη, στην οποία προσπίπτουν.

Οι συχνότητες των ηλεκτρομαγνητικών ακτινοβολιών περιλαμβάνουν τα ραδιοφωνικά κύματα με συχνότητα $\nu=10^5$ Hz μέχρι τις ακτίνες γ των ραδιενεργών ουσιών, που η συχνότητά τους φτάνει τα 10^{20} Hz. Οι συχνότητες αυτές γίνονται άμεσα ή έμμεσα αντιληπτές από τον άνθρωπο. Στο Σχήμα 2.1 δίνονται τα όρια των συχνοτήτων της κοσμικής ακτινοβολίας.



Σχήμα 2.1: Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα.

Οι ενέργειες στην περιοχή των ραδιοκυμάτων προκαλούν διέγερση των περιστροφικών κινήσεων των μορίων, του πυρηνικού spin (πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό, NMR) και του spin του ηλεκτρονίου (ηλεκτρονικό συντονισμό spin, ESR). Στην υπέρυθρη περιοχή του φάσματος έχουμε διέγερση των ταλαντώσεων των ατόμων και μορίων, ενώ στην ορατή και υπεριώδη περιοχή διεγείρονται οι ηλεκτρονικές μεταπτώσεις. Τέλος, στην περιοχή των ακτίνων X και γ προκαλούνται σπάσεις των δεσμών των μορίων [Θεοφανίδης, Αναστασοπούλου, 1997, Theophanides, 2015].

2.2.2. Υπέρυθρη περιοχή

Η υπέρυθρη περιοχή του φάσματος βρίσκεται μεταξύ της ορατής περιοχής και της περιοχής των μικροκυμάτων, δηλαδή μεταξύ 0,8 έως 300 μm και διακρίνεται σε τρεις περιοχές:

- α) το IR (0,8 μm έως 2,5 μm)
- β) το μέσο IR (2,5 μm έως 50 μm)
- γ) το άπω IR (50 μm έως 1000 μm)

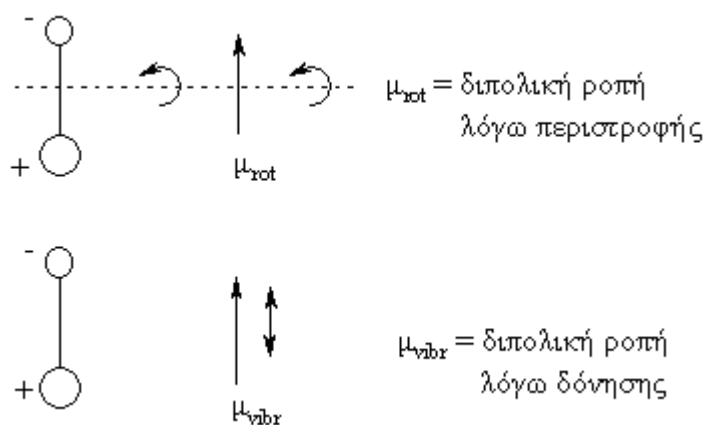
Για τα φασματόμετρα υπέρυθρου χρησιμοποιείται συνήθως το μέσο IR, δηλαδή η περιοχή μήκους κύματος από 2,5 μέχρι 50 μm, η οποία αντιστοιχεί στους

κυματαριθμούς 4000 μέχρι 200 cm^{-1} . Στην περιοχή αυτή παρατηρούνται οι βασικές μεταβολές στη δόνηση των μορίων λόγω απορρόφησης ακτινοβολίας (φασματοσκοπία δονήσεων, vibrational spectroscopy), ενώ στο άπω IR παρατηρούνται μεταβολές στην περιστροφή τους [Θεοφανίδης, Αναστασοπούλου, 1997, Theophanides, 2012 a, b].

2.2.3. Αρχές της υπέρυθρης φασματοσκοπίας

Η φασματοσκοπία υπέρυθρου βασίζεται στην απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας από τα μόρια μιας ένωσης, τα οποία διεγείρονται σε υψηλότερες στάθμες δόνησης ή περιστροφής. Ενεργά υπέρυθρες ενώσεις (IR-active) είναι μόνο αυτές στις οποίες οι δονήσεις και οι περιστροφές των ατόμων τους έχουν μία διαρκή διπολική ροπή, όπως στα μόρια που αποτελούνται από δύο ετεροάτομα, π.χ. στα μόρια CO, HCl, NO ή στα μόρια στα οποία η διπολική ροπή αλλάζει κατά τη διάρκεια της δονητικής και περιστροφικής διαδικασίας.

Η περιοδική αλλαγή της διπολικής ροπής λόγω περιστροφής ή δόνησης επιτυγχάνεται μόνο με ορισμένες συχνότητες. Απορρόφηση συμβαίνει όταν η προσπίπτουσα ακτινοβολία έχει την ίδια συχνότητα με την συχνότητα του διπόλου.



Σχήμα 2.2: Μεταβολή της διπολικής ροπής ενός διατομικού μορίου λόγω περιστροφής (μ_{rot}) και δόνησης (μ_{vibr}) [Θεοφανίδης, Αναστασοπούλου, 1997].

Αν ένα διατομικό μόριο, όπως το H_2 , Cl_2 , N_2 δεν έχει διπολική ροπή, δεν διεγείρεται η περιστροφή και η δόνησή του με απορρόφηση ακτινοβολίας, οπότε

είναι αδρανές στην υπέρυθη φασματοσκοπία (IR-inactive). Έτσι, για να δώσει ένα μόριο υπέρυθρο φάσμα πρέπει να μην είναι συμμετρικό.

Γενικά, το φάσμα απορρόφησης υπέρυθρου αποτελεί μια θεμελιώδη ιδιότητα κάθε μορίου και χρησιμεύει κυρίως στην ποιοτική ανάλυση, για τη διαλεύκανση της δομής μιας ένωσης, δηλαδή για τη φύση των ατόμων που βρίσκονται στο μόριο και τη διάταξή τους στο χώρο, δίνοντας το δακτυλικό αποτύπωμα (fingerprint) μιας ουσίας.

Από την άλλη πλευρά, επειδή το ποσό της απορροφούμενης ενέργειας είναι συνάρτηση του αριθμού των υπαρχόντων μορίων, προκύπτουν από το IR φάσμα πληροφορίες και ως προς την συγκέντρωση ενός συστατικού σε ένα δείγμα, συγκρίνοντας το βάθος μιας χαρακτηριστικής ταινίας απορρόφησης προς το βάθος της ίδια ταινίας ενός φάσματος που περιέχει γνωστή συγκέντρωση του προς ανάλυση συστατικού. [Θεοφανίδης, Αναστασοπούλου, 1997].

Στη φασματοσκοπία ένα υλικό ακτινοβολείται με φως και μετράται η ποσότητα που απορροφήθηκε συναρτήσει της ενέργειας του φωτός. Η διαπερατότητα T εκφράζει την απορροφημένη ποσότητα φωτός και ισούται με το λόγο της έντασης της εξερχόμενης από το υλικό ακτινοβολίας (I) προς την ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας (I_0):

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (2)$$

Κυρίως χρησιμοποιείται η επί τοις εκατό διαπερατότητα (%T). Αρκετά συχνά χρησιμοποιείται η απορρόφηση ή απορροφητικότητα, A , η οποία ορίζεται ως ο δεκαδικός λογάριθμος του λόγου I_0/I :

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) = \log_{10} \left(\frac{1}{T} \right) \quad (3)$$

Η απορροφητικότητα ονομάζεται και οπτική πυκνότητα. Ο λόγος για τον οποίο χρησιμοποιείται η απορροφητικότητα είναι επειδή το μέγεθος αυτό είναι ανάλογο προς τη συγκέντρωση του προς μελέτη δείγματος και μπορεί να εφαρμοσθεί ο νόμος των Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (4)$$

όπου:

ε = συντελεστής γραμμομοριακής απορροφητικότητας ($M^{-1}cm^{-1}$)

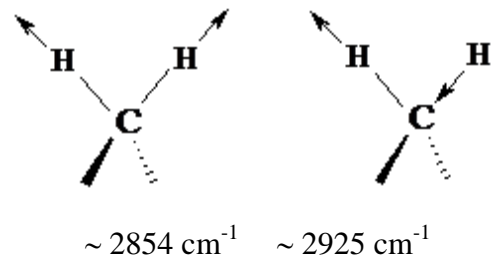
l = μήκος διαδρομής (cm) της φωτεινής ακτίνας, που συμπίπτει με το μήκος της κυψελίδας που περιέχει το δείγμα.

c = συγκέντρωση του δείγματος.

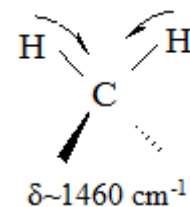
2.2.4. Φάσματα δόνησης πολυατομικών μορίων

Ο αριθμός των ταινιών που δίνει ένα μόριο υπολογίζεται με βάση τους βαθμούς ελευθερίας των ατόμων. Σε ένα μόριο N ατόμων οι βαθμοί ελευθερίας είναι $3N$ εκ των οποίων οι 6 είναι δονήσεις εξωτερικές, μεταφοράς και περιστροφής, και δεν λαμβάνονται υπόψη, άρα αφαιρούνται από τους $3N$. Αυτό επιτρέπει $3N-6$ βαθμούς ελευθερίας, τις εσωτερικές δονήσεις. Για τα γραμμικά μόρια ο αριθμός των ταινιών υπολογίζεται με τη σχέση $3N-5$, διότι υπάρχουν μόνο 2 περιστροφές στα γραμμικά μόρια. Στην πράξη ο αριθμός μειώνεται σημαντικά και λαμβάνονται υπόψη μόνον οι χαρακτηριστικές δονήσεις των ομάδων των μορίων. Η περιγραφή των τρόπων δόνησης των πολυατομικών μορίων μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους. Συνήθως, χρησιμοποιείται εκείνη η περιγραφή κατά την οποία η απορρόφηση της ενέργειας επιτρέπει την διέγερση στην πρώτη ανώτερη ενεργειακή κατάσταση δόνησης. Οι δονήσεις αυτές του μορίου ονομάζονται κανονικές δονήσεις (normal vibrations ή normal modes). Οι τρόποι δόνησης ενός μορίου χαρακτηρίζονται ως εξής [Θεοφανίδης & Αναστασοπούλου, 1997]:

Δονήσεις τάσης (stretching vibrations). Στην περίπτωση αυτή δύο άτομα πάλλονται με τρόπο ώστε να μεταβάλλεται η μεταξύ τους απόσταση ($\leftarrow\text{C-H}\rightarrow$). Η ενέργεια τάσης είναι η μεγαλύτερη των δονήσεων.



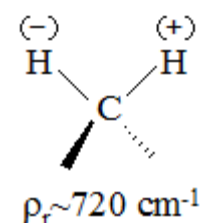
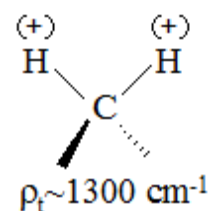
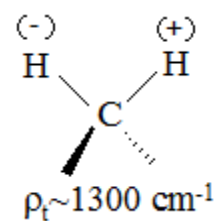
Δονήσεις κάμψης ή ψαλλίδισης (bending ή scissoring vibrations). Στην περίπτωση αυτή η γωνία την οποία σχηματίζουν δύο δεσμοί μεταβάλλεται συνεχώς.



Δονήσεις συστροφής (twisting vibrations). Εμφανίζονται όταν η ομάδα των ατόμων $\text{-CH}_2\text{-}$ δονείται εντός του επιπέδου H-C-H (in-plane).

Δονήσεις σείσης (wagging vibrations). Παρατηρούνται όταν τα άτομα που είναι συνδεδεμένα μέσω τρίτου μορίου, παλινδρομούν εκτός επιπέδου σε φάση.

Δονήσεις αιώρησης (rocking vibrations). Εμφανίζονται όταν η ομάδα των ατόμων $\text{-CH}_2\text{-}$ δονείται εκτός του επιπέδου H-C-H (o-o-plane).

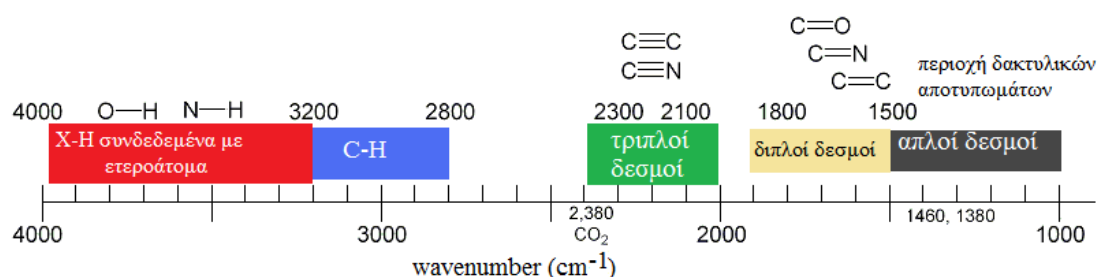


Σύμφωνα με τον συμβολισμό, το (+) σημαίνει κίνηση πάνω από το επίπεδο της σελίδας ενώ το (-) σημαίνει κίνηση έξω από αυτό (out-of-plane).

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι όσο αυξάνει ο αριθμός των ατόμων ενός μορίου αυξάνει και ο αριθμός των δονήσεων, με αποτέλεσμα η φυσική ερμηνεία κάθε ταινίας του φάσματος να καθίσταται πολύπλοκη. Στην πράξη δεν απαιτείται η ερμηνεία όλων των δονήσεων. Διαπιστώθηκε ότι η δόνηση των δεσμών ενός ζεύγους ατόμων απορροφά σε παραπλήσια πάντα περιοχή και ότι η συχνότητα απορρόφησης πολλές φορές είναι ανεξάρτητη από το υπόλοιπο μόριο [Αναστασοπούλου, Θεοφανίδης, 2010].

Το φάσμα απορρόφησης υπερόθρου αποτελεί θεμελιώδη ιδιότητα κάθε μορίου και χρησιμεύει κυρίως στην ποιοτική ανάλυση και για την απόδοση της μοριακής δομής μιας ένωσης, δηλαδή για τη φύση των ατόμων που βρίσκονται στο μόριο και τη διάταξή τους στο χώρο, δίνοντας ουσιαστικά το δακτυλικό αποτύπωμα της δεδομένης ένωσης. Επειδή το IR φάσμα λειτουργεί σαν το “δακτυλικό αποτύπωμα” της δεδομένης ένωσης, γι αυτό και η περιοχή του φάσματος μεταξύ 1500 cm^{-1} και 400 cm^{-1} ονομάζεται περιοχή “δακτυλικού αποτυπώματος”. Επιπλέον, κατά την ερμηνεία ενός φάσματος λαμβάνονται πάντα υπόψη συγκεκριμένες ταινίες,

στις οποίες αναμένεται να απορροφούν οι χαρακτηριστικές ομάδες που απαρτίζουν το μόριο της ένωσης και οι οποίες δεν διαφέρουν σε θέση σημαντικά από ένωση σε ένωση. Έτσι, το υπέρυθρο φάσμα υποδιαιρείται, για λόγους ευκολίας, σε επιμέρους περιοχές ανάλογα με τις χαρακτηριστικές ομάδες του μορίου. Στο Σχήμα 2.3 δίνονται οι συχνότητες στις οποίες εμφανίζονται στο IR φάσμα οι χαρακτηριστικές ομάδες οργανικών ενώσεων ή βιολογικών μορίων.



Σχήμα 2.3: Διαχωρισμός του IR φάσματος σε επί μέρους περιοχές, όπου εμφανίζονται οι ταινίες των χαρακτηριστικών ομάδων οργανικών ενώσεων

Επειδή το ποσό της απορροφούμενης ενέργειας είναι συνάρτηση του αριθμού των υπαρχόντων μορίων (συγκέντρωση), είναι προφανές ότι το IR φάσμα παρέχει πληροφορίες για την συγκέντρωση ενός συστατικού στο δείγμα, συγκρίνοντας την ένταση μιας χαρακτηριστικής ταινίας απορρόφησης προς την ένταση της ίδιας ταινίας ενός φάσματος που περιέχει γνωστή συγκέντρωση του προς ανάλυση συστατικού. Επίσης, η σχετική μεταβολή των εντάσεων των χαρακτηριστικών ταινιών δίνει πληροφορίες και για το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται το εξεταζόμενο μόριο [Αναστασοπούλου & Θεοφανίδης, 2010, Theophanides, 2012 a, b].

2.3. ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ

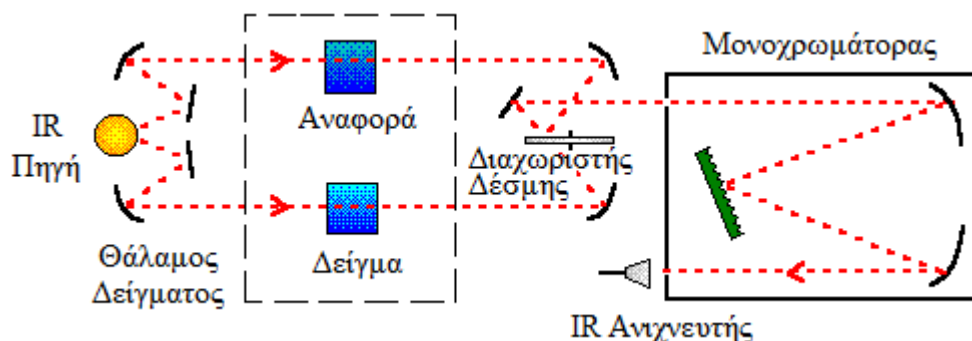
Τα φασματοφωτόμετρα υπέρυθρης ακτινοβολίας χωρίζονται σε δύο κατηγορίες :

- i. Στα φασματοφωτόμετρα διασποράς (dispersive spectrometers)
- ii. Στα φασματοφωτόμετρα με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR, Fourier Transform Infrared Spectrometers)

2.3.1. Φασματοφωτόμετρα υπέρυθρου διασποράς

Τα φασματοφωτόμετρα του τύπου αυτού τείνουν να εξαφανισθούν από το εμπόριο. Τα φασματοφωτόμετρα διασποράς ή κλασικά αποτελούνται από την πηγή της υπέρυθρης ακτινοβολίας, το χώρο του δείγματος και το μονοχρωμάτορα που αναλύει την ακτινοβολία στα μήκη κύματος από τα οποία αποτελείται και τον ανιχνευτή ακτινοβολίας.

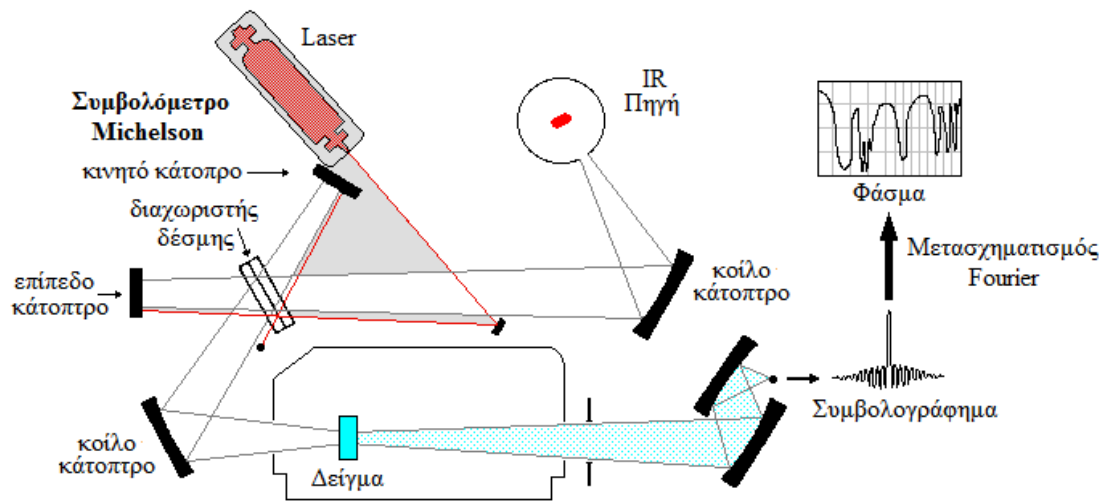
Στο Σχήμα 2.4 δίνεται σχηματικά η αρχή λειτουργίας του φασματοφωτομέτρου διασποράς. Η παραγόμενη από την πηγή ακτινοβολία με σύστημα επιπέδων κατόπτρων, που βρίσκονται σε μικρή απόσταση μεταξύ τους, διαχωρίζεται σε δύο δέσμες εκ των οποίων η μία διέρχεται μέσω του συστήματος αναφοράς (τυφλό), η δε άλλη διέρχεται από το δείγμα. Ένα σύστημα παλλομένων κατόπτρων ή διακόπτου (chopper) επιτρέπει την περιοδική διέλευση της δέσμης μέσω του δείγματος και της αναφοράς για να προσπέσει τελικά στο μονοχρωμάτορα. Τέλος, η δέσμη διέρχεται από έναν πολλαπλασιαστή και καταλήγει στο καταγραφικό ως κύμανση.



Σχήμα 2.4: Σχηματική παράσταση φασματοφωτομέτρου διασποράς

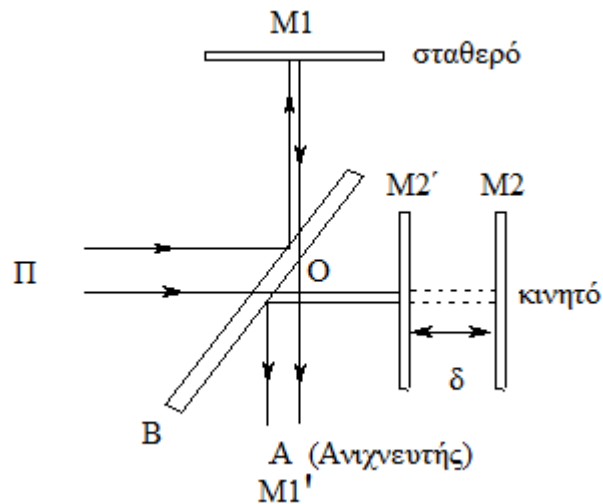
2.3.2. Φασματοφωτόμετρα υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier. Συμβολόμετρο Michelson

Η διάταξη ενός φασματοφωτομέτρου Fourier δίνεται στο Σχήμα 2.5, όπου διακρίνονται η πηγή της υπέρυθρης ακτινοβολίας, το συμβολόμετρο, ο χώρος του δείγματος και ο ανιχνευτής υπέρυθρου. Η πηγή laser χρησιμοποιείται για τη δημιουργία εσωτερικής αναφοράς, της μέτρησης των κυματαριθμών και τη ρύθμιση της διάρκειας των παλμών.



Σχήμα 2.5: FT – IR φασματοφωτόμετρο Michelson

Η χρήση ενός συμβολόμετρου αντί ενός μονοχρώματου δίνει σημαντικά πλεονεκτήματα στην καταγραφή του IR φάσματος. Το βασικό τμήμα ενός φασματοφωτόμετρου Fourier αποτελεί το συμβολόμετρο Michelson (Σχήμα 2.6). Όπως φαίνεται, το συμβολόμετρο αποτελείται από δύο κάτοπτρα M1 και M2, από τα οποία το ένα παραμένει σταθερό (Fixed Mirror), ενώ το άλλο είτε κινείται με σταθερή ταχύτητα, είτε σταματά περιοδικά και για μικρά χρονικά διαστήματα (Moving Mirror). Τα επίπεδα των δύο κάτοπτρων είναι κάθετα μεταξύ τους. Ανάμεσα στο σταθερό και στο κινούμενο κάτοπτρο υπάρχει ένας διαχωριστής δέσμης 50/50 (beam splitter). Ο διαχωριστής δέσμης είναι ένα ημιδιαφανές κάτοπτρο, το οποίο αποτελείται από υλικό που δεν απορροφά στην υπέρυθη περιοχή, με ανακλαστικότητα και διαπερατότητα 50% αντίστοιχα. Η μια δέσμη προσπίπτει στο σταθερό κάτοπτρο, ενώ η άλλη στο κινητό και στην συνέχεια αφού αντανακλαστούν επιστρέφουν στον διαχωριστή δέσμης όπου συμβάλλουν. Μετά την συμβολή ένα τμήμα της ακτινοβολίας οδηγείται στο χώρο του δείγματος, ενώ το υπόλοιπο τμήμα επιστρέφει στην πηγή ακτινοβολίας. Το αποτέλεσμα είναι ότι περίπου το μισό κάθε δέσμης καταλήγει στον ανιχνευτή, παρ' όλο που διέσχισαν διαφορετικές διαδρομές [Currell, 2007, Griffiths, 1972]. Η διαφορά (δ) της διαδρομής των δύο φωτεινών δεσμών είναι $2(OM_1 - OM_2)$.



Σχήμα 2.6: Σχηματική παράσταση συμβολόμετρου Michelson. Π = πηγή, $M1$ = κάτοπτρο μίξης, $M1'$ = είδωλο του $M1$ όπως φαίνεται από τη θέση A , $M2$ = κινητό κάτοπτρο, B = διαιρέτης δέσμης (chopper) και A = αναλυτής [Θεοφανίδης, Αναστασοπούλου, 1997]

Όταν το κινούμενο κάτοπτρο κινείται βηματικά και η διαφορά διαδρομής δ είναι μηδέν ή ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος της φωτεινής ακτίνας ($\delta = n\lambda$, όπου $n=0,1,2,3,\dots$), τότε παρατηρείται ενίσχυση της ακτινοβολίας. Αν όμως η διαφορά διαδρομής είναι $\delta = (n+1/2)\lambda$, όπου $n=0,1,2,3,\dots$, τότε παρατηρείται απόσβεση και η ακτινοβολία επιστρέφει στην πηγή. Στην περίπτωση που το κινητό κάτοπτρο κινείται με σταθερή ταχύτητα, το σήμα στον ανιχνευτή μεταβάλλεται ημιτονοειδώς. Στην περίπτωση αυτή η ένταση του σήματος ως συνάρτηση της καθυστέρησης $I'(\delta)$ δίνεται από την παρακάτω σχέση:

$$I'(\delta) = 0,5I_0(1 + \cos 2\pi n\delta) \quad (5)$$

από όπου φαίνεται ότι η ένταση $I'(\delta)$ αποτελεί το γινόμενο ενός σταθερού παράγοντα $0,5I_0$ και ενός μεταβλητού $(1 + \cos 2\pi n\delta)$, ο οποίος ονομάζεται συμβολογράφημα (interferogram).

Σήμερα, η χρήση του αδάμαντα για την κατασκευή των φακών μειώνει σημαντικά την διάμετρο της φωτεινής δέσμης που προσπίπτει στο δείγμα και επομένως επιτρέπει να λαμβάνουμε φάσματα σε μικρότερες διαστάσεις δείγματος. Η τεχνολογία των φασματοφωτομέτρων υπεράυθρου με δέσμη προερχόμενη από επιταχυντές σύγχροτρον συνδυασμένες με μικροσκόπιο (micro synchrotron FT-IR) επιτρέπουν την ανάλυση των δειγμάτων τοπολογικά. Η ένταση και η λαμπρότητα της προσπίπτουσας δέσμης ακτινοβολίας αυξάνει σημαντικά τον λόγο σήματος προς

θόρυβο, με αποτέλεσμα την λεπτομερή ανάλυση για πολύ μικρές ποσότητες δείγματος [Πισσαρίδη,2012].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (SEM)

3.1. Ιστορική αναδρομή

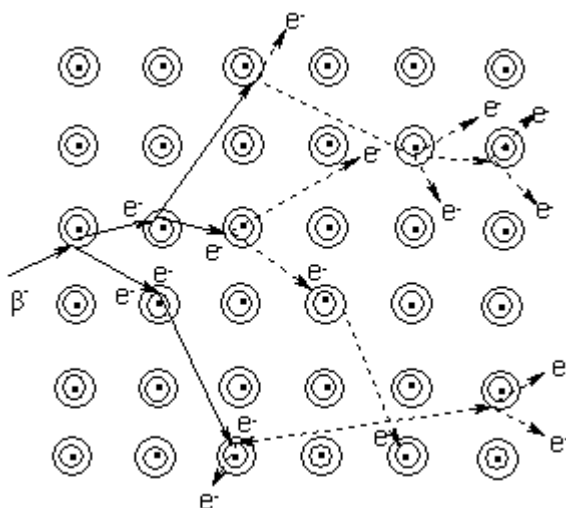
Το πρώτο όργανο το οποίο λειτούργησε σύμφωνα με τη βασική αρχή λειτουργίας του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης κατασκευάστηκε από τον Knoll (1935), ο οποίος εργαζόταν στη Γερμανία μαζί με ειδικούς στον τομέα της ηλεκτρονικής οπτικής. Όμως, το πρώτο πραγματικά SEM κατασκευάστηκε από τον von Ardenne (1938) με μικροδιαφοροποιήσεις, το οποίο δεν χρησιμοποιήθηκε, επειδή σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους ηλεκτρονικού μικροσκοπίου υστερούσε σε αρκετά σημεία. Μερικά μειονεκτήματα αναφέρονται στον χρόνο καταγραφής, τη ρύθμιση του οργάνου και την τελική ανάλυση της εικόνας.

Με την συνεχιζόμενη έρευνα οι Zworykin, Hillier, Snyder (1942) πέτυχαν να υπερσκελήσουν πολλά προβλήματα του προηγούμενου SEM. Το πρώτο SEM χρησιμοποιήθηκε για την εξέταση της επιφάνειας ενός στερεού δείγματος και περιγράφηκε από τον Zworykin. Η ανάλυση που επιτεύχθηκε ήταν της τάξεως των 50nm, χωρίς όμως εντυπωσιακά αποτελέσματα.

Στα τέλη της δεκαετίας του 1940 ο C. W. Oatley, από το Πανεπιστήμιο του Cambridge, ενδιαφέρθηκε για την διεξαγωγή ερευνών στον τομέα της ηλεκτρονικής οπτικής και αποφάσισε να ανακατασκευάσει το SEM. Ο Ken Sander, φοιτητής του Oatley, ξεκίνησε να εργάζεται σε μια στήλη μικροσκοπίου μεταφοράς ηλεκτρονίου χρησιμοποιώντας ηλεκτροστατικούς φακούς. Λίγο αργότερα το έργο του Sander συνέχισε ο Dennis McMullan (1948), όπου μαζί με τον Oatley κατασκεύασαν το πρώτο τους SEM. Έως το 1952 με την συσκευή αυτή είχαν επιτύχει ανάλυση εικόνας της τάξεως των 50 nm.

Ο Ken Smith (1952) επεμβαίνοντας στο SEM που πρότεινε ο Dennis McMullan, βελτίωσε περισσότερο το οπτικό σύστημα βελτιστοποιώντας παράλληλα την αποτελεσματικότητα της δευτερογενούς συλλογής ηλεκτρονίων, επιτυγχάνοντας, για πρώτη φορά, λήψη σταθερής εικόνας με χαμηλή ενέργεια της ολικής δευτερογενούς εκπομπής. Ο O.C.Wells (1953), υπό την εποπτεία του Oatley, κατασκεύασε συσκευή SEM, χρησιμοποιώντας επίσης ηλεκτροστατικούς φακούς. Η πρωτοτυπία της συσκευής αυτής SEM αφορά την χρήση εκνεφωτή ηλεκτρονίων στη βάση της στήλης, διαμόρφωση η οποία συνέβαλε σημαντικά στην πειραματική διεργασία.

Αργότερα, ο Everhart (1959) βελτίωσε τον ανιχνευτή δευτερογενών ηλεκτρονίων (Secondary Electrons, SE) χρησιμοποιώντας σπινθηριστή για την μετατροπή των ηλεκτρονίων σε φωτόνια, τα οποία μετά εκπέμπονταν από λεπτό αγωγό κατευθείαν στον φωτοπολλαπλασιαστή. Στο Σχήμα 3.1 φαίνεται σχηματικά ο τρόπος αλληλεπίδρασης των ηλεκτρονίων του εκνεφωτή με τα ηλεκτρόνια του δείγματος. Συνεχίζοντας ο Thornley (1957) αντικατέστησε τον ηλεκτρονικό πολλαπλασιαστή με έναν νέο συνδυασμό σπινθηριστή/φωτοπολλαπλασιαστή επιτυγχάνοντας την αύξηση του σήματος με αποτέλεσμα την μείωση του θορύβου.



Σχήμα 3.1: Παραγωγή δευτερογενών ηλεκτρονίων κατά την πρόσπτωση πρωτογενών στην ύλη [Αναστασοπούλου, 2003]

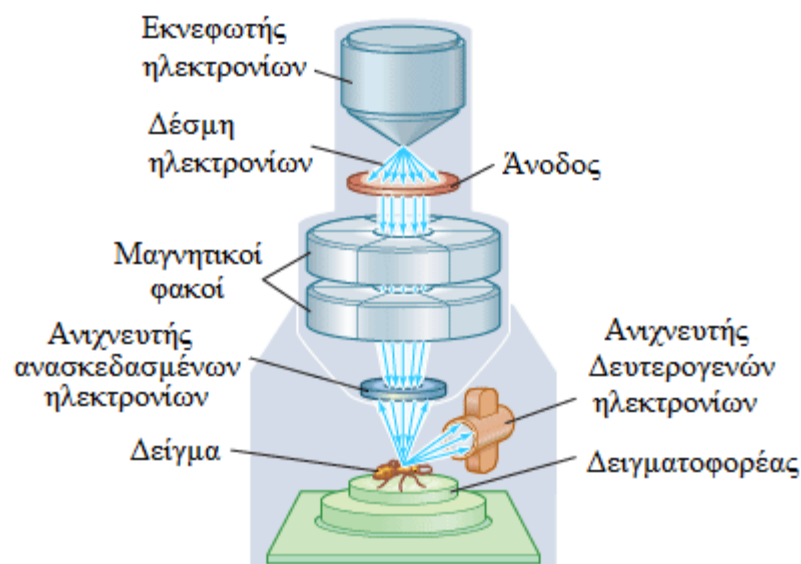
Στις φιλοδοξίες του Oatley ήταν η παραγωγή και πώληση ενός απλού χαμηλού κόστους SEM. Για την επίτευξη της ιδέας αυτής ο Peter Spreadbury, ο πέμπτος κατά σειρά συνεργάτης (1956), κατασκεύασε ένα απλό SEM χρησιμοποιώντας μια λυχνία καθοδικών ακτίνων (Cathode Ray Tube-CRT) ως πηγή εκπομπής. Έτσι, ξεκίνησε μια

νέα εποχή από τον Gary Stewart (1958), ο οποίος προσάρμοσε έναν εκνεφωτή ιόντων στον θάλαμο του δείγματος του SEM, το οποίο επέτρεψε τον βομβαρδισμό του δείγματος με ιόντα. Το έργο πάνω στην ιοντική δέσμη διευρύνθηκε αργότερα από τον Alec Broers (1961), ο οποίος βελτίωσε την δέσμη ιόντων, που αποτελούν το οπτικό σύστημα του οργάνου και προσέθεσε ένα μαγνητικό αντικειμενικό φακό για την βελτίωση της ανάλυσης της εικόνας. Άλλη μια καινοτομία επετεύχθη από τον Haroon Ahmed (1959), ο οποίος τροποποίησε το SEM του Wells για να επιτραπεί η εξέταση των θερμικών εκπομπών σε θερμοκρασίες που ξεπερνούν τους 1000K. Το πρώτο SEM στο οποίο επετεύχθη ανάλυση 10 nm φτιάχτηκε από τον Fabian Pease (1960) [<http://www2.eng.cam.ac.uk/~bcb/history.htm>].

3.2. Αρχή λειτουργίας

Το SEM αποτελεί μια παραλλαγή του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και παρέχει ένα πολύτιμο συνδυασμό εικόνας υψηλής ανάλυσης, στοιχειακής ανάλυσης και πρόσφατα κρυσταλλογραφικής ανάλυσης της δομής του δείγματος. Μπορεί να δώσει ανάλυση δειγμάτων 10 nm ή λιγότερο, να χρησιμοποιηθεί σε σκληρές επιφάνειες, προσφέρει ποιοτική και ημιποσοτική ανάλυση στοιχείων, εντοπίζει κρυστάλλους και προσδιορίζει το σύστημα κρυστάλλωσης δειγμάτων της τάξης μεγέθους 1nm.

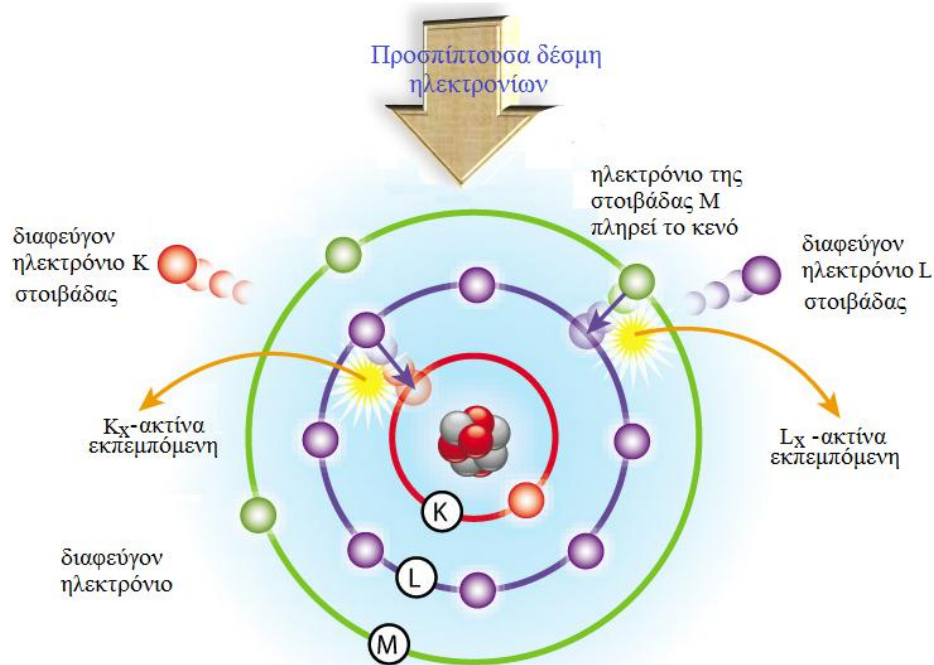
Τα ηλεκτρόνια που παράγονται από τον εκνεφωτή του μικροσκοπίου (Σχήμα 3.2) επιταχύνονται με εφαρμογή διαφοράς δυναμικού και σχηματίζουν δέσμη ηλεκτρονίων, η οποία εστιάζεται από σύστημα ισχυρών ηλεκτρομαγνητικών φακών πάνω στο δείγμα. Η αλληλεπίδραση των ηλεκτρονίων οδηγεί στην απομάκρυνση των ηλεκτρονίων των ατόμων του δείγματος, τα οποία συγκεντρώνονται στον ανιχνευτή, παρέχοντας την χημική σύσταση και τοπογραφία του δείγματος.



Σχήμα 3.2: Αρχή λειτουργίας SEM

Τα άτομα, λόγω της απομάκρυνσης των ηλεκτρονίων, βρίσκονται σε διεγερμένη ενεργειακά κατάσταση και ηλεκτρόνια υψηλότερης ενεργειακής στάθμης καταλαμβάνουν την κενή στοιβάδα. Η μετάπτωση αυτή συνοδεύεται με εκπομπή ακτινών X (φωτονίων) ενέργειας ίσης με ενεργειακή διαφορά των δύο σταθμών. Στο Σχήμα 3.3 δίνεται παραστατικά η παραγωγή ακτινών X από τις στιβάδες K και L. Η μονοχρωματική ενέργεια των εκπεμπόμενων ακτινών X καθορίζει το στοιχείο από όπου εκπέμπεται, επιτρέποντας έτσι την χημική ταυτοποίηση αυτού (EDAX). Τα ηλεκτρόνια που απομακρύνονται από τα άτομα του δείγματος λόγω της σύγκρουσης με τα ηλεκτρόνια της προσπίπτουσας δέσμης παρέχουν επιπλέον πληροφορίες σχετικά με την τοπολογική κατάσταση του δείγματος.

Τα ηλεκτρόνια δεσμεύονται από ανιχνευτή και επειδή έχουν σχετικά χαμηλή κινητική ενέργεια, ένα μεγάλο ποσοστό αυτών καταλήγει στον ανιχνευτή και καταμετρούνται. Επειδή ο αριθμός των ηλεκτρονίων εξαρτάται από τη γεωμετρία της επιφάνειας στο σημείο που προσπίπτει η δέσμη, η ανίχνευσή τους προσφέρει σαφείς εικόνες της επιφανειακής δομής του δείγματος [Πισσαρίδη, 2012].



Σχήμα 3.3: Σχηματική παράσταση παραγωγής ακτίνων X, χαρακτηριστική του κάθε ατόμου.

Αυτή η παραλλαγή του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου έχει αρκετά πλεονεκτήματα. Το δείγμα μπορεί να είναι παχύ, αφού η δέσμη δεν χρειάζεται να περάσει δια μέσου αυτού. Επίσης η παραγωγή των ανακρουόμενων ηλεκτρονίων εξαρτάται από τη γωνία πρόσπτωσης της δέσμης στην επιφάνεια. Συνεπώς οι μικρογραφίες του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης έχουν πολύ καλύτερη τρισδιάστατη εμφάνιση από τις συνήθειες. Η διακριτική ικανότητα στα σημερινά SEM είναι της τάξης μερικών nm, πολύ μεγαλύτερη από εκείνη των καλύτερων οπτικών μικροσκοπίων [Πισσαρίδη, 2012].

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

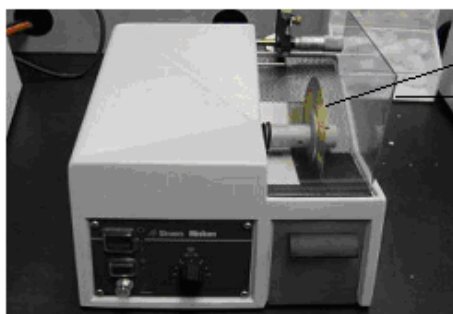
4.1. Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν, όπως ακετόνη, εξάνιο και υπεροξειδίο του υδρογόνου ήταν της εταιρείας Aldrich.

4.2. Προετοιμασία δειγμάτων

Τμήμα του κάθε οστού συντηρήθηκε αρχικά σε -4°C και στη συνέχεια ξεπλύθηκε σε διαδοχικά διαλύματα 30% υπεροξειδίου υδρογόνου (για 8 ώρες) και ακετόνης (για 30 λεπτά), για να ελαχιστοποιηθεί η συμβολή των οργανικών συστατικών (δηλαδή πιο συγκεκριμένα των χρωμοφόρων του αίματος και του λιπώδους ιστού) στο τελικό φάσμα. Τα δείγματα στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε φούρνο κενού σε θερμοκρασία 30°C για 1 ώρα.

Στη συνέχεια, με μικροτόμο Struers Minitom, ο οποίος έφερε δίσκο από αδάμαντα, πάχους 300 μm (Εικόνα 4.1), αποκτήθηκαν τομές πάχους 5 μm .



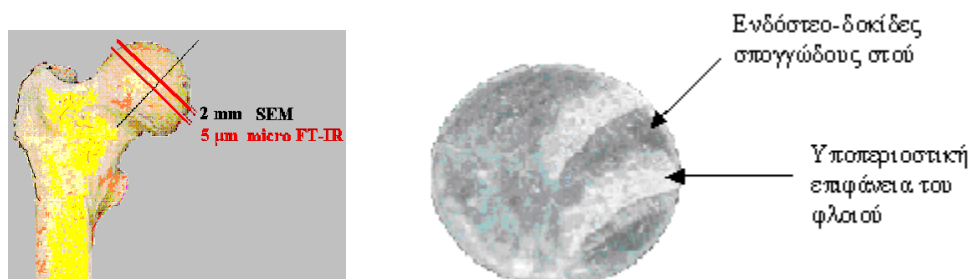
τροχός από αδάμαντα

προστατευτικό
πέτασμα

Εικόνα 4.1: Μικροτόμος Struers Minitom

Το πάχος αυτό επέτρεπε την διέλευση της υπέρυθρης ακτινοβολίας, έτσι ώστε να διαπερνά το υπέρυθρο φως. Το μεγαλύτερο πάχος δεν επέτρεπε την διέλευση της ακτινοβολίας, επειδή το ανόργανο τμήμα του οστού δεν απομακρύνεται από τα δείγματα, όπως απαιτείται στην ιστολογική εξέταση.

Στις Εικόνες 4.2 και 4.3 δίνονται τα τμήματα του οστού και η τομή τους.



Εικόνα 4.2. Κεφαλή μηριαίου οστού. **Εικόνα 4.3.** Τομή δείγματος, όπως Η τομή για την σύγχροτον μικρο- λαμβάνεται μετά την κοπή με μικροτόμο υπέρυθρη φασματοσκοπία είχε πάχος 5 μm και για την SEM 2 μm.

Πρέπει να τονισθεί ότι στην περίπτωση του οστού το οποίο προήλθε από ασθενή με μεταστατικό καρκίνο, η όλη επεξεργασία ήταν η ίδια με την διαφορά ότι, επειδή το δείγμα ήταν πάρα πολύ μικρό, δεν χρειάστηκε να γίνει μικροτομή.

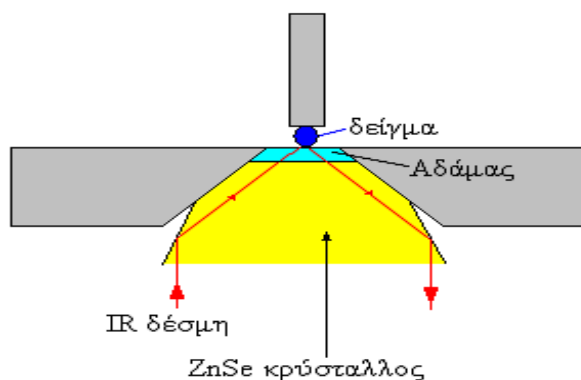
4.3. Υλικό

Ελήφθησαν δείγματα από ασθενείς, οι οποίοι υπεβλήθησαν σε ολική αρθροπλαστική των κατ' ισχίων αρθρώσεων για την θεραπεία οστεοαρθρίτιδας και ενός ασθενούς που υποβλήθηκε σε χειρουργική αποκατάσταση παθολογικών καταγμάτων οστών με μεταστατικό καρκίνο, με αρχική εστία το ήπαρ.

4.4. Λήψη υπέρυθρων FT-IR φασμάτων

Τα δείγματα μελετήθηκαν με φασματοφωτόμετρο Nicolet 6700, όπου το κάθε φάσμα προέκυψε από 120 φάσματα (scans) και resolution 4 cm^{-1} . Το όργανο έφερε

εξάρτημα τεχνικής Αποσβένουσας Ολικής Ανάκλασης (Attenuated Total Reflectance, ATR). Το πλεονέκτημα του εξαρτήματος αυτού είναι ότι το δείγμα δεν υφίσταται καμία επεξεργασία, δηλαδή βαφή ή αφαλάτωση. Όπως δείχνει το Σχήμα 4.1, η δέσμη της υπέρυθρης ακτινοβολίας, μέσω ενός κρυστάλλου αδάμαντα, προσπίπτοντας στο δείγμα το οποίο τοποθετείται σε κρύσταλλο Zn-Se (ψευδαργύρου-σεληνίου), υπό γωνία συνήθως 45° , υφίσταται πολλαπλές εσωτερικές ανακλάσεις, αυξάνοντας με τον τρόπο αυτό τον λόγο του σήματος προς τον θόρυβο (μέτρηση ελεγχόμενη από την ανάκλαση) και επομένως την ευαισθησία [Mamarelis 2011, Dritsa 2012]. Με τον τρόπο αυτό, η συγκέντρωση του δείγματος πολλαπλασιάζεται, επιτρέποντας την μέτρηση πολύ μικρής ποσότητας δείγματος μερικών μm, μέχρι ακόμη μοναδιαίου κυττάρου [Theophanides, 2012 a, b]. Ο κρύσταλλος από αδάμαντα αυξάνει την λαμπρότητα του φασματοφωτομέτρου (λόγος σήματος προς θόρυβο) μειώνοντας ακόμη περισσότερο τις απαιτούμενες προς ανάλυση διαστάσεις του δείγματος. Τέλος, η υπέρυθρη ακτινοβολία εξερχόμενη από το δείγμα διέρχεται από τον ανιχνευτή για να δώσει το υπέρυθρο φάσμα.



Σχήμα 4.1: Σχηματική παράσταση της διαδρομής της δέσμης στην ATR ανάλυση.

Για την FT-IR ανάλυση δεν απαιτείται, όπως προαναφέρθηκε, αφαλάτωση και χρωστική αιμοξυλίνη. Με τον τρόπο αυτό, το δείγμα διατηρεί την φυσιολογική παθολογική του κατάσταση. Η φασματοσκοπική ανάλυση βασίζεται μόνο στις δονήσεις των χαρακτηριστικών ομάδων των κύριων βιολογικών μορίων [Theophanides, 2015].

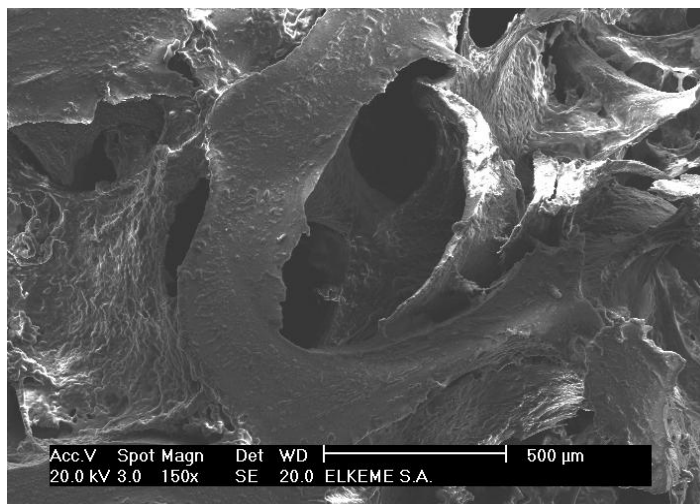
4.5. SEM μικροσκόπιο

Η μελέτη της μορφολογίας των οστών έγινε με Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) της εταιρείας Fei Co, The Netherlands (Εικόνα 4.4).



Εικόνα 4.4. Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Fei Co, The Netherlands)

Στην Εικόνα 4.5 παρουσιάζεται η τομή τμήματος κεφαλής μηριαίου υγιούς οστού, όπως αυτή λήφθηκε με το οπτικό μικροσκόπιο Nikon Eclipse ME 600 και μεγέθυνση x150. Το πάχος του οστού ήταν 5 μm .



Εικόνα 4.5. Τομή εγκιβωτισμένου δείγματος από οπτικό μικροσκόπιο Nikon Eclipse ME 600, κάμερα Nikon Net Camera DN 150x

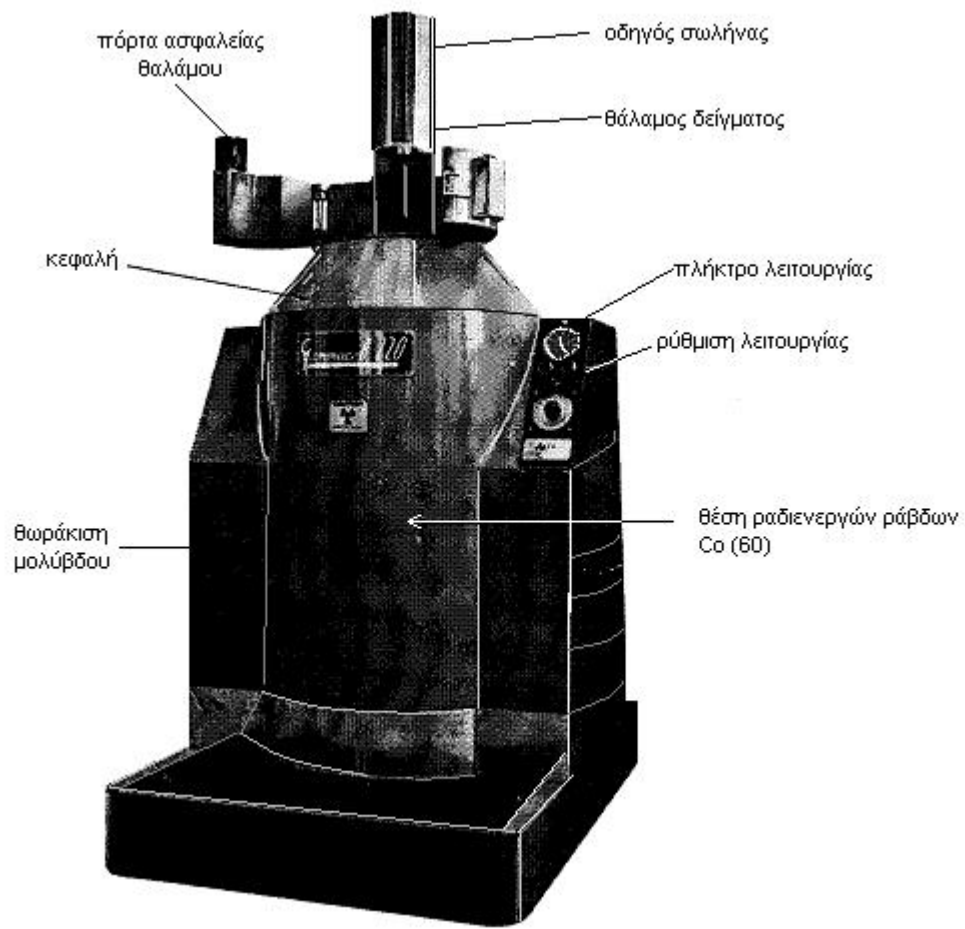
Παρατηρείται η ύπαρξη οπών, οι οποίες πιθανά να είναι παλαιοί οστεώνες. Στις οπές δεν παρουσιάζεται μια αξονική συνέχεια, αλλά μια ανάπτυξη τυχαίας και διαφορετικής συνέχειας κατά επίπεδα.

4.6. Πηγή Co(60)

Για την ακτινοβόληση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε πηγή γ - ^{60}Co Gammachamber 4000A (Εικόνα 4.6). Τα δείγματα προκειμένου να ακτινοβοληθούν τοποθετήθηκαν σε ειδικό θάλαμο παραγωγής ακτίνων γ προερχόμενες από Co(60). Στο εσωτερικό της διάταξης βρίσκονται 24 ραδιενεργοί ράβδοι κοβαλτίου, κυκλικά τοποθετημένες. Ειδικός οδηγός μεταφέρει τα δείγματα εντός και εκτός της θέσεως ακτινοβόλησης.

Οι πηγές της κατηγορίας αυτής είναι συμπαγείς με κατάλληλες διαστάσεις και σχεδιάζονται έτσι ώστε η ενέργεια να απορροφάται ομοιογενώς από το δείγμα. Η ομοιογένεια επιτυγχάνεται με την κυκλική τοποθέτηση των ράβδων κοβαλτίου. Οι πιο γνωστές πηγές τέτοιας μορφής κατασκευάζονται στον Καναδά, από την Ατομική Επιτροπή Ενέργειας.

Η δοσιμετρία της πηγής έγινε με δοσίμετρο Fricke. Κατά την ακτινοβόληση, οι παραγόμενες ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου οξειδώνουν τον δισθενή σίδηρο σε τρισθενή. Το pH του διαλύματος ήταν περίπου 1 και επιτεύχθηκε με προσθήκη θεικού οξέος. Τα ιόντα του θεικού οξέος είναι αδρανή ως προς την ακτινοβολία, ώστε να μην επηρεάζεται το αποτέλεσμα της μέτρησης.



Εικόνα 4.6: Πηγή ακτινοβολίας γ - ^{60}Co Gammachamber 4000A. Το δείγμα τοποθετείται στον θάλαμο και ο οδηγός το μεταφέρει στο εσωτερικό της συσκευής, όπου είναι τοποθετημένο το ραδιενεργό υλικό.

Επειδή η ακτινοβόληση γίνεται παρουσία οξυγόνου, τα άτομα οξυγόνου μετατρέπονται σε ρίζες υδροϋπεροξυλίου, οι οποίες ανάγονται από τα ηλεκτρόνια του περιβάλλοντος και τελικά οδηγούν σε μια σειρά από αλυσιδωτές αντιδράσεις.

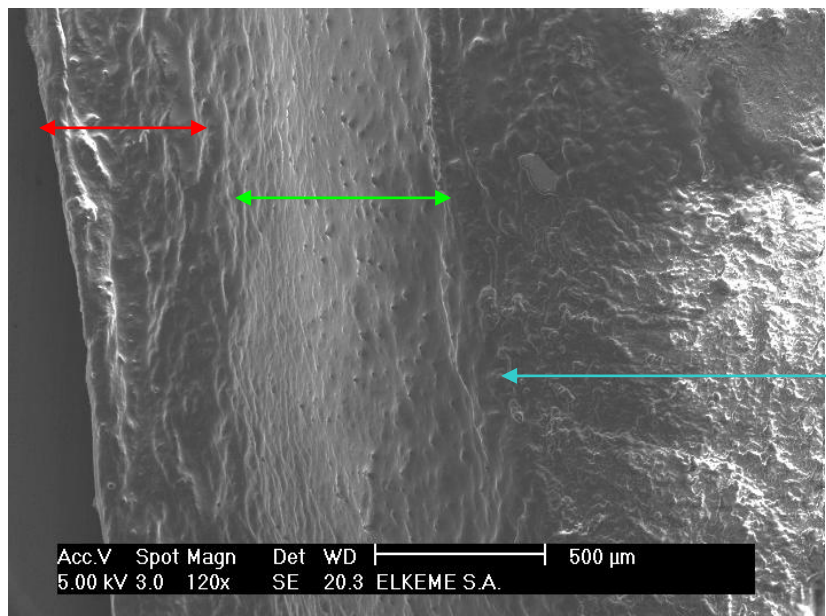
III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΜΕΛΕΤΗ FT-IR ΦΑΣΜΑΤΩΝ

5.1. FT-IR φάσματα υγιών οστών

Το εξωτερικό τμήμα της τομής του οστικού δείγματος απεικονίζεται στην Εικόνα 5.1. Παρατηρείται η εναλλαγή στη δομή του οστού, καθώς το φλοιώδες οστό το διαδέχεται το σπογγώδες. Με το κόκκινο βέλος συμβολίζεται η περιοχή του χόνδρου, με το πράσινο βέλος η περιοχή του οργανικού μέρους, δηλαδή το φλοιώδες οστό, και η περιοχή που αντιστοιχεί στο γαλάζιο βέλος, αποτελεί την περιοχή του σπογγώδους οστού.

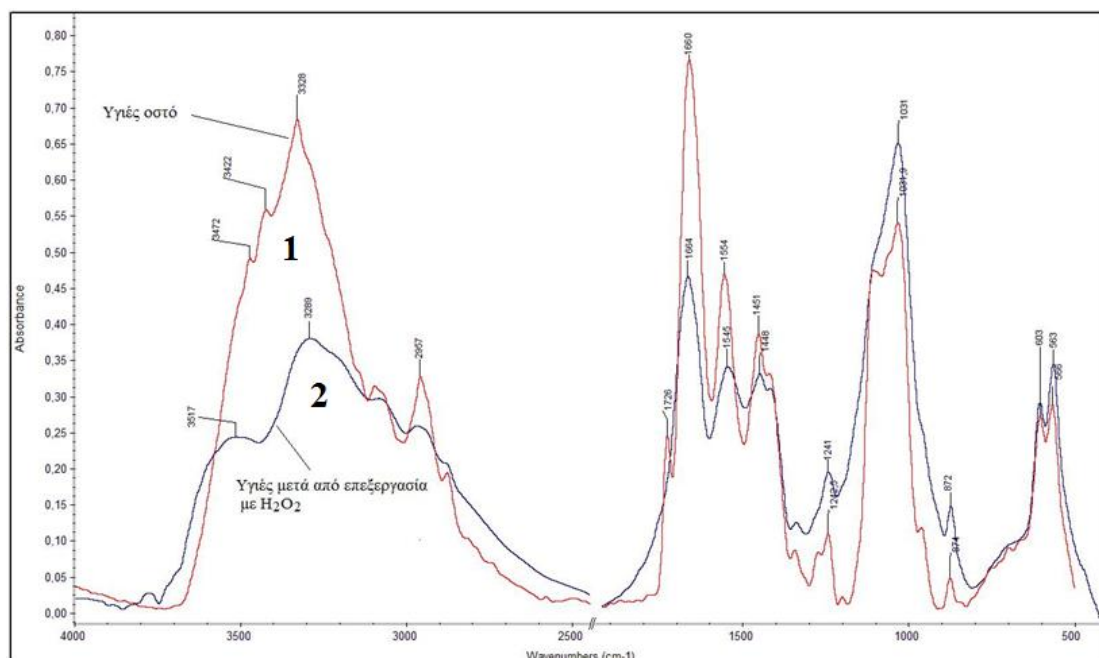


Εικόνα 5.1. SEM απεικόνιση του εξωτερικού τμήματος της επιφάνειας του οστικού δείγματος. Τα βέλη δείχνουν τις διαχωριστικές ζώνες. Κόκκινο ο χόνδρος, Πράσινο το φλοιώδες οστό και γαλάζιο το σπογγώδες οστό.

Για την πλήρη κατανόηση της δομής των οστών κρίθηκε απαραίτητο να μελετηθούν πρώτα τα υγιή οστά και μετά να συγκρίνουμε τα υπέρυθρα φάσματα των υγιών οστών με τα αντίστοιχα φάσματα άλλων ασθενειών.

Στο Σχήμα 5.1,1 δίνονται τα υπέρυθρα φάσματα οστού το οποίο προέρχεται από κεφαλή ισχίου, το οποίο πιστοποιήθηκε ότι δεν έχει άλλη οστική και μεταβολική νόσο. Στο Σχήμα 5.1,2 το φάσμα προέρχεται από το ίδιο οστό μετά από επεξεργασία με υπεροξείδιο του υδρογόνου και ακετόνη στην περιοχή του φάσματος 4000–400 cm^{-1} .

Από την σύγκριση των φασμάτων γίνονται αισθητές οι διαφορές μεταξύ των δύο φασμάτων. Στην περιοχή του φάσματος από 3600–2700 cm^{-1} εμφανίζονται κυρίως οι ταινίες που οφείλονται στην παρουσία κρυσταλλικού νερού, των ομάδων OH του υδροξυαπατίτη και οι συμμετρικές και αντισυμμετρικές δονήσεις τάσης των ομάδων νCH_2 και νCH_3 του οργανικού τμήματος του οστού, δηλαδή των πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες του οστού συνήθως είναι το κολλαγόνο I και μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες.



Σχήμα 5.1: FT-IR φάσματα στην περιοχή του φάσματος 4000–400 cm^{-1} : 1. Υγιούς οστού προερχόμενο από κεφαλή ισχίου χωρίς οστική και μεταβολική νόσο και 2. Του ίδιου οστού μετά από επεξεργασία με υπεροξείδιο του υδρογόνου και ακετόνη.

Τα φάσματα στο διάστημα από 2700–1800 cm^{-1} δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον γιατί στην περιοχή αυτή δεν εμφανίζονται χαρακτηριστικές ταινίες των

ομάδων του οστού, ώστε οι αντίστοιχες κορυφές να παρέχουν ιδιαίτερες πληροφορίες. Στην περιοχή του φάσματος από 1800–400 cm^{-1} , όπως φαίνεται, το φάσμα είναι περισσότερο πολύπλοκο. Η ισχυρή έντασης ταινία στα 1743 cm^{-1} , αφορά την δόνηση τάσης της ομάδας $\nu\text{C}=\text{O}$ των μη ιοντισμένων καρβοξυλομάδων ($-\text{COOH}$) και της ομάδας CONH του αμιδίου I της πρωτεΐνης. Η ομάδα που εμφανίζεται στα 1650 cm^{-1} αποδίδεται στην δόνηση κάμψης των Amide I των πρωτεϊνών όταν επικρατεί η διαμόρφωση της α -έλικας. Στην δόνηση αυτή συμμετέχει κυρίως η δNH του πεπτιδικού δεσμού. Η κορυφή στα 1545 cm^{-1} αποδίδεται στην δόνηση των ομάδων Amide II και οφείλεται κατά 60% στη δόνηση κάμψης εντός του επιπέδου (*in-plane*) της ομάδας $-\text{NH}$ και κατά 40% στη δόνηση τάσης της ομάδας $-\text{CN}$. Η παρουσία της ταινίας αυτής ενισχύει την άποψη ότι στο κολλαγόνο επικρατεί η διαμόρφωση α -έλικας, ενώ τα amide II έχουν διαμόρφωση β -αναδίπλωσης (β -turn). Από τη σύγκριση των φασμάτων φαίνεται ότι τα οστά δίδουν σημαντικά διαφορετικά υπέρυθρα φάσματα κυρίως ως προς τις εντάσεις των ταινιών.

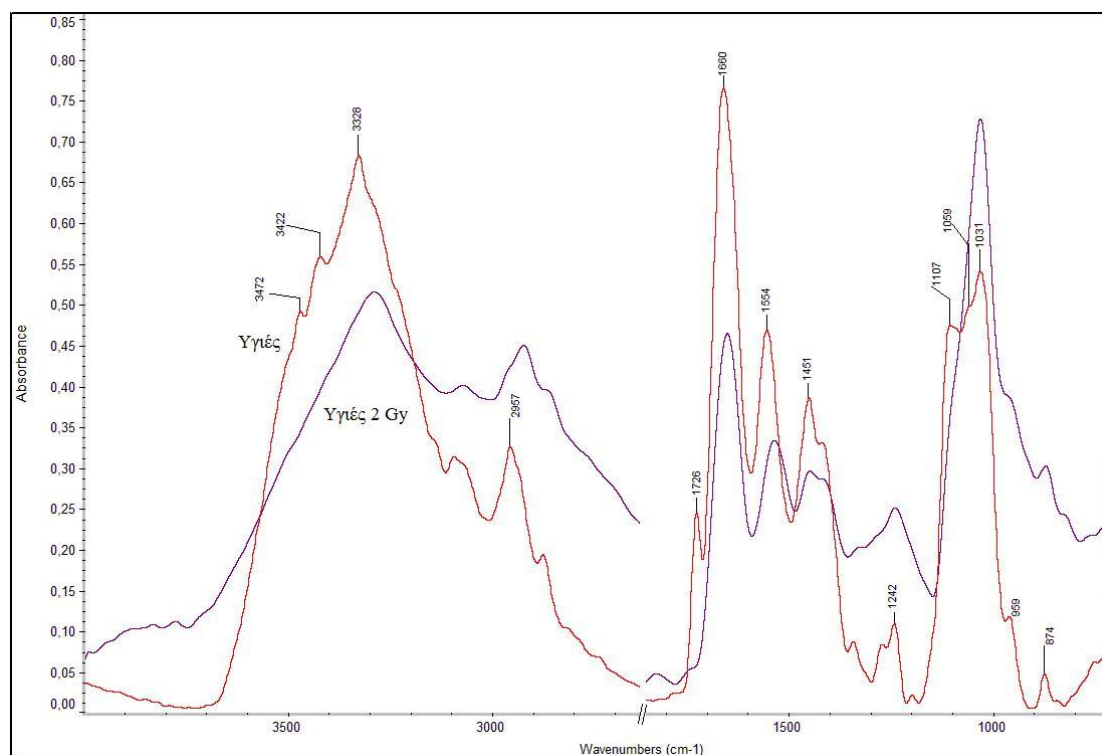
Οι κορυφές στα 1455 cm^{-1} αποδίδονται στην απορρόφηση των ανθρακικών ιόντων του CaCO_3 τύπου AB. Προχωρώντας προς μικρότερους κυματαριθμούς η κορυφή που παρατηρείται στα 1232 cm^{-1} αντιστοιχεί στις δονήσεις που οφείλονται στις ομάδες $-\text{OH}$ των μορίων του υδροξυαπατίτη. Οι δονήσεις απορρόφησης των χαρακτηριστικών φωσφορικών ομάδων του υδροξυαπατίτη εμφανίζονται στην περιοχή 1200–500 cm^{-1} . Διαπιστώνεται ότι οι δονήσεις τάσης της ομάδας $\nu_3\text{PO}_4^{3-}$ του στοιχειομετρικού HA εμφανίζονται στα 1118 cm^{-1} , 1098 cm^{-1} , 1025 cm^{-1} και 966 cm^{-1} . Η κορυφή στα 875 cm^{-1} οφείλεται στην δόνηση τάσης των ανθρακικών ιόντων $\nu_2\text{CO}_3^{2-}$, όπου επικρατεί ο υδροξυαπατίτης τύπου B [Πετρά, 2002].

Συμπερασματικά, οι διαφορές οι οποίες παρατηρούνται μεταξύ των φασμάτων του υγιούς οστού πριν και μετά την επεξεργασία με το υπεροξείδιο του υδρογόνου και την ακετόνη οφείλονται στην απομάκρυνση των συστατικών του οστού, τα οποία δεν συμμετέχουν στην δομή του.

5.2. Σύγκριση υπέρυθρων φασμάτων υγιούς και ακτινοβλημένου οστού

Προκειμένου να κατανοήσουμε το αποτέλεσμα της επίδρασης των ιοντιζουσών ακτινοβολιών στη μοριακή δομή των οστών κατά την ακτινοθεραπεία, ακτινοβλήθηκαν *in vitro* οστά, τα οποία ελήφθησαν από τον ίδιο ασθενή. Το οστό

λήφθηκε από κεφαλή ισχίου για αρθροπλαστική και δεν παρουσίαζε οστική ή μεταβολική νόσο, σύμφωνα με τα ιστοπαθολογικά δεδομένα με χρώση κατά Goldner ευρήματα Trichrome. Στο Σχήμα 5.2 δίνονται τα FT-IR φάσματα του οστού πριν και μετά την ακτινοβόληση με δόση ακτινοβολίας 2 Gy στην περιοχή $4000\text{--}700\text{ cm}^{-1}$.

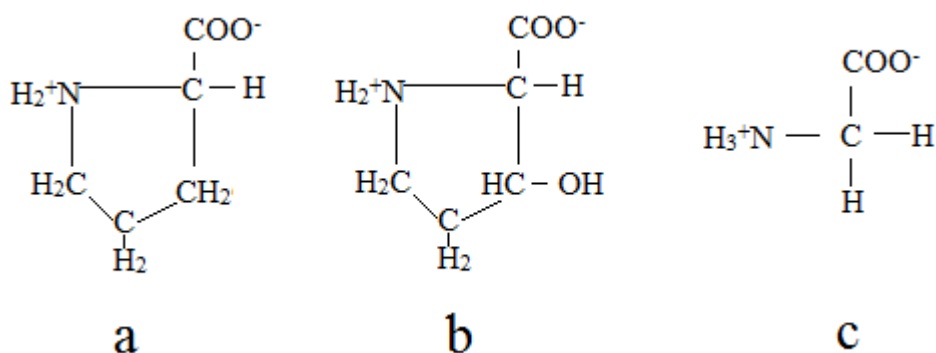


Σχήμα 5.2: FT-IR φάσματα στην περιοχή του φάσματος $4000\text{--}700\text{ cm}^{-1}$: 1. Υγιούς οστού προερχόμενο από κεφαλή ισχίου χωρίς οστική και μεταβολική νόσο και 2. Ακτινοβολημένου υγιούς οστού *in situ* με δόση ακτινοβολίας 2Gy.

Σημαντικές διαφορές μεταξύ του υγιούς και του ακτινοβολημένου οστού διακρίνονται σε όλο το εύρος του φάσματος. Η ταινία στα 3517 cm^{-1} περίπου (Σχήμα 5.2) αποδίδεται στην δόνηση τάσης των ομάδων νOH του νερού και του υδροξυαπατίτη. Η ταινία αυτή προϋπήρχε στο αρχικό φάσμα, αλλά λόγω της παρουσίας της οργανικής φάσης είχε μικρότερη σχετική συγκέντρωση. Στο ακτινοβολημένο οστό, η συγκεκριμένη ταινία είναι μειωμένη και πιο ευρεία επειδή επικρατούν οι ταινίες των αμινομάδων. Παρά τη θέρμανση του δείγματος υπό κενό, τα μόρια του νερού δεν απομακρύνθηκαν εξαιτίας των ισχυρών δεσμών υδρογόνου, οι οποίοι επικρατούν στον κρύσταλλο του υδροξυαπατίτη. Το εύρος οφείλεται στην αύξηση των ομάδων υδροξυλίου στο σύστημα, που αποδίδονται στην προσθήκη

ριζών υδροξυλίου στους διπλούς δεσμούς της οργανικής φάσεως των οστών [Κολοβού, 2008].

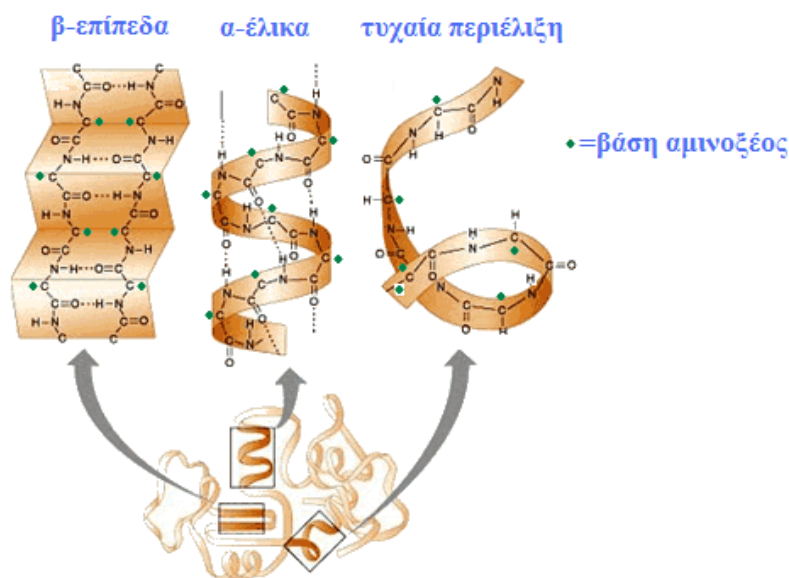
Η πλατιά κορυφή που παρατηρούμε στα 3300 cm^{-1} περίπου αποδίδεται στις δονήσεις των αμινομάδων του οστού. Είναι γνωστό ότι το κολλαγόνο περιέχει τον πεπτιδικό δεσμό και επομένως το δεσμό ($-\text{NH}-$). Η κορυφή στα 3082 cm^{-1} αποδίδεται στην δόνηση $\nu=\text{CH}$ τερματικής ολεφινικού τύπου ($\nu\text{C}=\text{CH}_2$) ομάδας. Η κορυφή που εμφανίζεται στο φάσμα περίπου στα 2928 cm^{-1} , αποδίδεται στην αντισυμμετρική δόνηση τάσης της ομάδας $-\text{CH}_2$ του κολλαγόνου των οστών, ενώ η συμμετρική δόνηση τάσης της ομάδας $-\text{CH}_2$ παρουσιάζεται στα 2857 cm^{-1} . Οι ταινίες αυτές μαρτυρούν την παρουσία οργανικής φάσης στον οστίτη ιστό. Η μη ύπαρξη μεθυλομάδων (CH_3) ως τερματικές ομάδες στο κολλαγόνο επιβεβαιώνεται από την απουσία κορυφών στα 2953 cm^{-1} και 2870 cm^{-1} . Πράγματι, οι παρατηρήσεις αυτές συμβαδίζουν με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Σχήμα 5.3) [Κυριακίδου 2014].



Σχήμα 5.3: Χημικοί τύποι των αμινοξέων του κολλαγόνου: a:προλίνη, b: υδροξυπρολίνη και c: γλυκίνη.

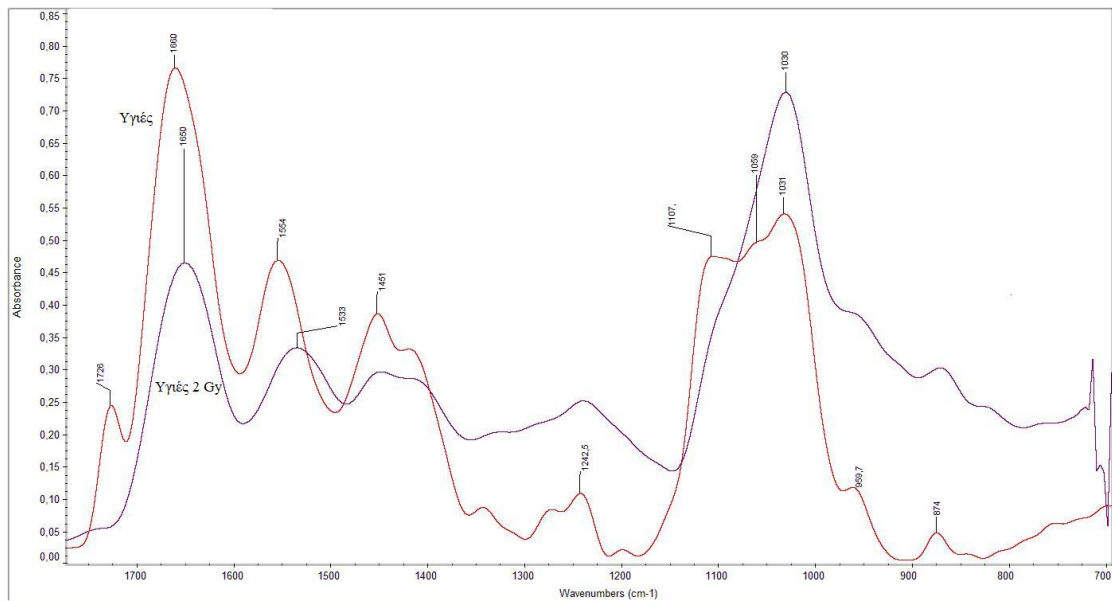
Στην περιοχή του φάσματος $2700-1800\text{ cm}^{-1}$ δεν εμφανίζονται χαρακτηριστικές ταινίες των ομάδων του οστού. Σημαντικές διαφορές εμφανίζονται στην περιοχή από $1800-1200\text{ cm}^{-1}$, όπου απορροφούν οι ομάδες $-\text{C}=\text{O}$, Amide I, Amide II και Amide III. Στο ακτινοβολημένο οστό, η ταινία που εμφανίζεται στα 1744 cm^{-1} , αποδίδεται στις δονήσεις τάσης της ομάδας του καρβονυλίου $\nu\text{C}=\text{O}$, αλδεϋδικού ($-\text{CHO}$) και κετονικού (CO) χαρακτήρα. Στην περίπτωση του υγιούς οστού, η κορυφή των Amide I βρίσκεται στη θέση περίπου 1655 cm^{-1} και αποδίδεται στην παρουσία της πεπτιδικής ομάδας NH πρωτεϊνών. Στην ταινία αυτή συμμετέχει η δόνηση τάσης $\nu\text{C}-\text{N}$ και κάμψης $\delta\text{N}-\text{H}$ εντός επιπέδου και είναι συνδυασμός της δόνησης τάσης της ομάδας $\text{C}=\text{O}$ και της ομάδας $\text{N}-\text{H}$. Αυτή η ταινία υποδηλώνει ότι η δευτεροταγής δομή του κολλαγόνου βρίσκεται σε διαμόρφωση α-έλικας. Μετά την

ακτινοβόληση του οστού, η ταινία μετατοπίζεται σε μικρότερους κυματάριθμους (1640 cm^{-1}) συνεπάγεται ότι το κολλαγόνο και οι μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες των οστών έχουν αλλάξει δευτεροταγή διαμόρφωση και η μοριακή τους δομή από α-έλικα μετατράπηκε σε τυχαία ελικοειδή περιέλιξη (Εικόνα 5.2).



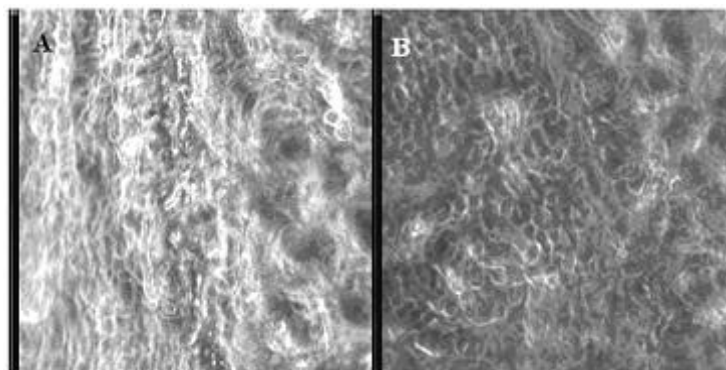
Εικόνα 5.2. Δευτεροταγής δομή των πρωτεϊνών, α-έλικα, β-αναδίπλωση (β-επίπεδα) και τυχαία περιέλιξη.

Η κορυφή στα 1549 cm^{-1} διατηρείται μεν μετά την ακτινοβόληση, αλλά μετατοπίζεται σημαντικά και εντοπίζεται στα 1538 cm^{-1} . Η μετατόπιση της ταινίας προφανώς προκαλείται από το σχάση της αλυσίδας των μακρομορίων του κολλαγόνου και την αλλαγή της δευτεροταγούς δομής του. Επίσης οι κορυφές στην περιοχή $1450\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ που αντιστοιχούν στα ανθρακικά ιόντα έχουν αλλάξει σημαντικά. Αυτό δείχνει ότι τα ανθρακικά ιόντα δεν παραμένουν αδρανή στην καταστρεπτική δράση της ακτινοβολίας. Οι κορυφές στα 1450 cm^{-1} αποδίδονται στην απορρόφηση των ανθρακικών ιόντων του CaCO_3 τύπου AB. Η μικρή μετατόπιση της ταινίας από τα 1413 cm^{-1} προς μεγαλύτερους κυματάριθμους κατά 5 cm^{-1} (1418 cm^{-1}) πιθανόν να οφείλεται σε μεταβολή της δομής του καλσίτη, όπου επικρατούσε το ανθρακικό ασβέστιο και στη συνέχεια εμφανίσθηκε κάποια νέα δομή.



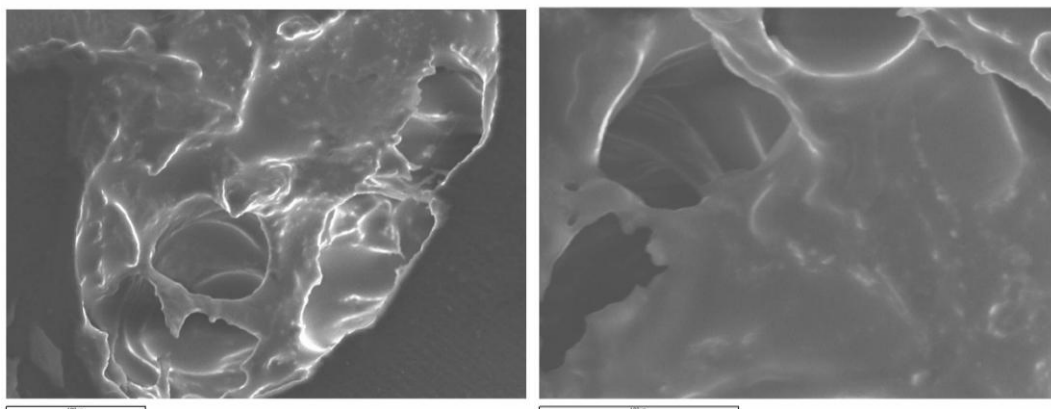
Σχήμα 5.4: FT-IR φάσματα στην περιοχή του φάσματος $1800\text{--}700\text{ cm}^{-1}$: 1. Υγιές οστό προερχόμενο από κεφαλή ισχίου χωρίς οστική και μεταβολική νόσο και 2. Ακτινοβολημένο υγιούς οστό *in situ* με δόση ακτινοβολίας 2 Gy

Η κορυφή στα 1379 cm^{-1} , όπως προαναφέρθηκε, αποδίδεται στην δόνηση κάμψης δCH_2 της μεθυλομάδας. Επιπλέον και η κορυφή που εμφανίζεται στα 1240 cm^{-1} μειώνεται σημαντικά μετά την ακτινοβολήση του οστού. Η μείωση προφανώς οφείλεται στην μείωση όλων των χαρακτηριστικών ομάδων που συμμετέχουν στην ταινία αυτή, όπως είναι η ομάδα Amide III. Η ταινία αυτή επίσης χαρακτηρίζει και την τεταρτοταγή δομή των κολλαγονούχων πρωτεϊνών, οπότε επιβεβαιώνεται ότι μετά την ακτινοβολήση ο τρόπος αναδίπλωσης των πρωτεϊνών μεταβάλλεται. Αυτό αποδεικνύεται και από τις εικόνες SEM που ελήφθησαν πριν και μετά την ακτινοβολήση οστίτη ιστού (Εικόνα 5.3).



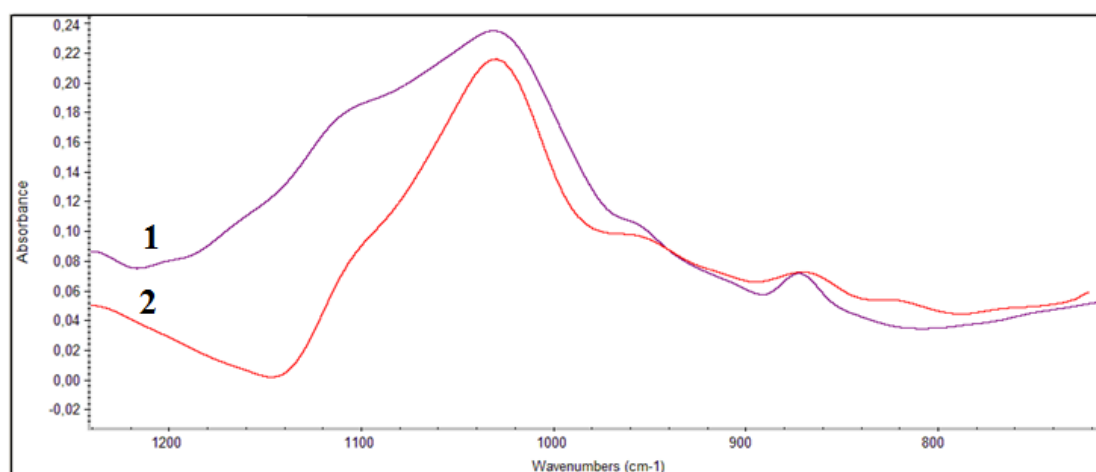
Εικόνα 5.3. SEM εικόνες οστίτη ιστού: A: μη ακτινοβολημένο και B: ακτινοβολημένο με δόση ακτινοβολίας 2Gy.

Όπως φαίνεται από την απεικόνιση του ιστού μετά την ακτινοβόληση ο ιστός έχει υποστεί λύση. Η διαταραχή της αρχιτεκτονικής της επιφάνειας του οστού παρουσιάζεται και από τη σύγκριση άλλων εικόνων SEM (Εικόνα 5.4), οι οποίες ελήφθησαν από διαφορετικά δείγματα σε διαφορετικές παράλληλες θέσεις των οστών.



Εικόνα 5.4. SEM απεικόνιση. Αριστερά: μη ακτινοβολημένου οστού, Δεξιά: ακτινοβολημένου οστού. Μεγέθυνση 100 μm .

Προκειμένου να διαπιστώσουμε την βλάβη που προκαλεί η ακτινοβόληση ακτινοβολίας στην ανόργανη φάση του οστού, δηλαδή στη δομή του υδροξυαπατίτη απομονώθηκε η περιοχή του φάσματος $1250\text{--}850\text{ cm}^{-1}$. Στο Σχήμα 5.5,1 δίδονται τα υπέρυθρα φάσματα των οστών στην περιοχή $1200\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ όπου απορροφούν οι ομάδες $\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ και $\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$ των φωσφορικών ιόντων του υδροξυαπατίτη.



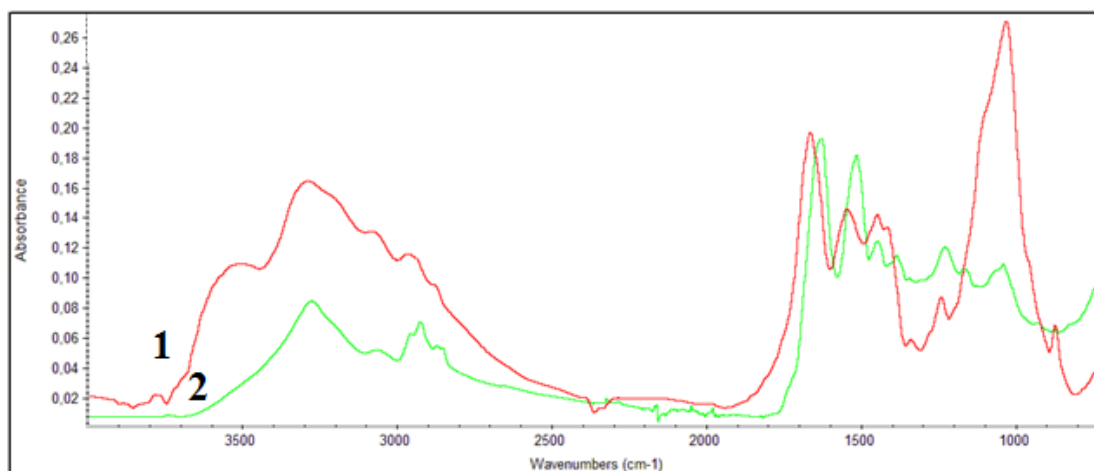
Σχήμα 5.5: FT-IR φάσματα στην περιοχή του φάσματος $1200\text{--}700\text{ cm}^{-1}$: 1. Υγιές οστό προερχόμενο από κεφαλή ισχίου χωρίς οστική και μεταβολική νόσο και 2. Ακτινοβολημένο υγιές οστό *in situ* με δόση ακτινοβολίας 2 Gy.

Οι επόμενες κορυφές που εμφανίζονται στα 1096 cm^{-1} και στα 1028 cm^{-1} , αποδίδονται αντίστοιχα στην αντισυμμετρική δόνηση τάσης $\nu_3\text{PO}_4^{3-}$ και στην συμμετρική δόνηση τάσης $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ της ομάδας $-\text{PO}_4^{3-}$, των φωσφορικών ιόντων του υδροξυαπατίτη. Η μικρή κορυφή που παρουσιάζεται στα 1116 cm^{-1} έχει βρεθεί σε ώριμους υδροξυαπατίτες με μικρό βαθμό κρυσταλλικότητας. Η κορυφή στα 1026 cm^{-1} οφείλεται στην συμμετρική δόνηση τάσης των φωσφορικών ιόντων $\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$. Η δόνηση αυτή αποτελείται από δύο κορυφές πολύ κοντινές μεταξύ τους, στα 1020 cm^{-1} και στα 1030 cm^{-1} [Κολοβού, 2008]. Ο λόγος των δύο αυτών κορυφών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό του μέτρου κρυσταλλικότητας του υδροξυαπατίτη. Συγκεκριμένα, η κορυφή στα 1020 cm^{-1} είναι χαρακτηριστική του μη στοιχειομετρικού και με μικρό βαθμό κρυσταλλικότητας βιολογικού απατίτη που περιέχει όξινα φωσφορικά και ανθρακικά ιόντα ενώ η κορυφή στα 1030 cm^{-1} αντιστοιχεί σε στοιχειομετρικό υδροξυαπατίτη με μεγάλο βαθμό κρυσταλλικότητας.

Η ταινία που εμφανίζεται στα 872 cm^{-1} αποδίδεται στην δόνηση τάσης των ανθρακικών ιόντων $\nu_2(\text{CO}_3^{2-})$. Είναι γνωστό ότι επικρατεί ο υδροξυαπατίτης τύπου B, όπου τα ανθρακικά ιόντα έχουν αντικαταστήσει τα φωσφορικά του υδροξυαπατίτη. Εάν η δόνηση μετατοπιζόταν προς μεγαλύτερους κυματάριθμους (περίπου 879 cm^{-1}), θα είχαμε υδροξυαπατίτη τύπου A, δηλαδή τα ανθρακικά ιόντα έχουν αντικαταστήσει τα υδροξυλιόντα του υδροξυαπατίτη [Κολοβού, 2008, Πετρά, 2003]. Η δομή του υδροξυαπατίτη μετατρέπεται από βιολογικό σε άμορφο μετά την ακτινοβόληση.

5.3. Σύγκριση υπέρυθρων φασμάτων υγιούς και καρκινικού οστού

Στο Σχήμα 5.6 παρουσιάζονται τα φάσματα ενός υγιούς οστού και ενός καρκινικού οστού, με σκοπό να δούμε τις μεταβολές στη δομή του οστού που προκαλούνται από την ασθένεια. Η σύγκριση μεταξύ των φασμάτων δείχνει σημαντικές διαφορές σε όλη την έκταση του φάσματος από $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$.

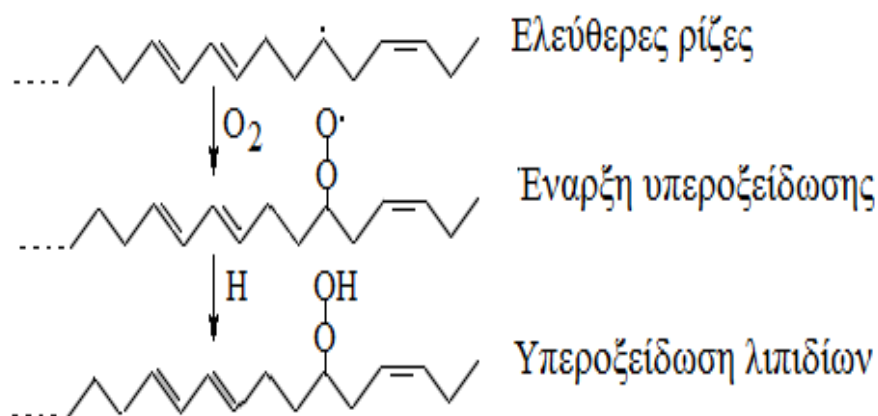


Σχήμα 5.6: FT-IR φάσματα στην περιοχή 4000–700 cm^{-1} : 1. Υγιές οστό προερχόμενο από κεφαλή ισχίου χωρίς οστική και μεταβολική νόσο (κόκκινο) και 2. Καρκινικό οστό (πράσινο).

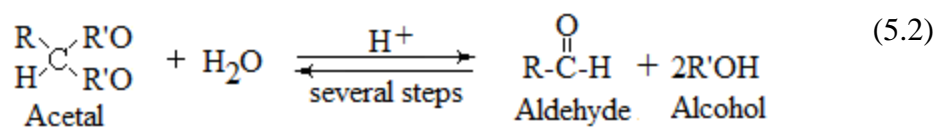
Η δόνηση τάσης των ομάδων νOH του νερού και του υδροξυαπατίτη που εμφανίζεται ως ώμος στα 3550 cm^{-1} περίπου για το υγιές οστό, στο καρκινικό οστό μειώνεται σημαντικά και ανάλογα με το στάδιο της ασθένειας εξαφανίζεται πλήρως [Κυριακίδου, 2014]. Όπως προαναφέρθηκε, η πλατιά κορυφή στα 3300 cm^{-1} αντιστοιχεί στις δονήσεις τάσης των νNH ομάδων του κολλαγόνου. Στο καρκινικό οστό, η δόνηση αυτή μετατοπίζεται σε μικρότερους κυματάριθμους (3275 cm^{-1}), ως αποτέλεσμα της μεταβολής της δομής των πρωτεϊνών που προκαλεί η ασθένεια. Η πλατιά ταινία στα 3060 cm^{-1} , αποδίδεται στην δόνηση νCH τερματικής ολεφινικού τύπου ($\nu\text{C}=\text{CH}_2$) ομάδας [Πισσαρίδη, 2012, Κολοβού, 2008]. Στο καρκινικό οστό, ακολουθούν οι δονήσεις τάσης των αντισυμμετρικών $\nu_{\text{as}}\text{CH}_3$ και $\nu_{\text{s}}\text{CH}_3$ μεθυλενομάδων που βρίσκονται στα 2965 και 2880 cm^{-1} , αντίστοιχα. Οι δονήσεις των μεθυλομάδων $\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$ και $\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$ εμφανίζονται στους 2924 cm^{-1} και 2854 cm^{-1} κυματάριθμους, αντίστοιχα. Η αύξηση της έντασης δείχνει τη μεταβολή του περιβάλλοντος των κυττάρων και τη μείωση της ανθρακικής αλυσίδας των μακρομορίων [Κυριακίδου, 2014, Κολοβού, 2008, Πετρά, 2003]. Σε αντίθεση, στο υγιές οστό δεν εμφανίζονται οι δονήσεις τάσης των μεθυλενομάδων $\nu_{\text{as}}\text{CH}_3$ και $\nu_{\text{s}}\text{CH}_3$, αφού δεν αποτελούν τερματικές ομάδες του κολλαγόνου. Σημαντικές διαφορές παρουσιάζονται στην περιοχή $1800\text{--}1500 \text{ cm}^{-1}$ του φάσματος, όπου χαρακτηρίζει κυρίως την δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών.

Σημαντική είναι η ταινία που εμφανίζεται στα 1744 cm^{-1} , η οποία αποδίδεται στις δονήσεις τάσης της ομάδας του καρβονυλίου $\nu\text{C}=\text{O}$ αλδευδικού ($-\text{CHO}$) και κετονικού (CO) χαρακτήρα. Η ταινία έχει αποδειχθεί ότι συνδέεται με την υπεροξείδωση των λιπιδίων. Πράγματι, ο ανθρώπινος οργανισμός ως αερόβιος διαθέτει οξυγόνο και επομένως οι σχηματιζόμενες ελεύθερες ρίζες των λιπιδίων και φωσφολιπιδίων των μεμβρανών αντιδρούν ταχύτατα με το οξυγόνο του οργανισμού σχηματίζοντας υπερόξυλ-ελεύθερες ρίζες ($-\text{O}-\text{O}\cdot$) και τελικά υπεροξείδια (COOH) [Μαμαρέλης, *in vivo*, 2010].

(5.1)



Οι παραγόμενες υπερόξυλ-ελεύθερες ρίζες σύμφωνα με την παρακάτω γενική αντίδραση παρέχουν τελικά αλδεύδες.



Είναι γνωστό ότι ο σχηματισμός των αλδευδών έχει ανιχνευθεί στην ανάπτυξη του καρκίνου.

Στην περιοχή $1700-1500\text{ cm}^{-1}$ που εμφανίζονται οι δονήσεις κάμψης των ομάδων NH των πρωτεϊνών, παρατηρούνται σημαντικές διαφορές του υγιούς ως προς το καρκινικό οστό. Η ταινία απορρόφησης των δονήσεων των Amide I των πρωτεϊνών από τα 1655 cm^{-1} μετατοπίζεται προς μικρότερους κυματαριθμούς, στα 1628 cm^{-1} . Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της δευτεροταγούς διαμόρφωσης του κολλαγόνου και των μη κολλαγονούχων πρωτεϊνών που βρίσκονται στα οστά. Συνεπώς, η μοριακή τους δομή από α -έλικα μετατράπηκε σε τυχαία ελικοειδή

περιέλιξη. Στην περίπτωση του υγιούς οστού, η δεύτερη κορυφή του πεπτιδικού δεσμού (AmideII) βρίσκεται στα 1550 cm^{-1} και αποδίδεται στο κολλαγόνο με διαμόρφωση α-έλικας [Κυριακίδου, 2014]. Η μετατόπιση της κορυφής στα 1530 cm^{-1} στο καρκινικό οστό, υποδηλώνει ότι οι πρωτεΐνες αποκτούν τυχαία σπειροειδή διαμόρφωση, μεταβάλλοντας τη δομή του κολλαγόνου και του υδροξυαπατίτη, όπως προαναφέρθηκε.

Στην περιοχή του φάσματος $1500\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$, αντιστοιχούν οι κορυφές οι οποίες οφείλονται τόσο στα οργανικά, όσο και στα ανόργανα συστατικά του οστού. Η κορυφή που εμφανίζεται στα 1465 cm^{-1} προκύπτει από την δόνηση τάσης των ανθρακικών ιόντων του οστού $\nu_3(\text{CO}_3^{2-})$ και δείχνει ότι ο ανθρακικός απατίτης είναι τύπου A. Η ταινία αυτή σε συνδυασμό με την ταινία στα 1416 cm^{-1} δείχνει ότι μέρος του ανθρακικού απατίτη αποκτά δομή AB. Επιπλέον και η κορυφή που εμφανίζεται στα 1240 cm^{-1} μειώνεται σημαντικά και μετατοπίζεται σε μικρότερους κυματάρθμους στο καρκινικό οστό. Η μείωση οφείλεται στην μείωση όλων των χαρακτηριστικών ομάδων που συμμετέχουν στην ταινία Amide III, που χαρακτηρίζει την τεταρτοταγή δομή των κολλαγονούχων πρωτεϊνών. Επομένως, ο τρόπος αναδίπλωσης των πρωτεϊνών μεταβάλλεται σε συνδυασμό με τις μεταβολές που παρατηρήθηκαν στην περιοχή $4000\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$.

Χαρακτηριστικές μεταβολές παρατηρούνται στην περιοχή $1200\text{--}900\text{ cm}^{-1}$, όπου οι ταινίες των αντισυμμετρικών και συμμετρικών δονήσεων τάσης των φωσφορικών ομάδων $\nu_3\text{PO}_4^{3-}$ στα 1096 cm^{-1} και 1028 cm^{-1} σχεδόν εξαφανίζονται στο καρκινικό οστό, ενώ η ταινία γίνεται πιο πλατιά. Από την μορφή της ταινίας συνάγεται το συμπέρασμα ότι το οστό δεν φαίνεται να αποτελείται από βιολογικό υδροξυαπατίτη, αλλά από άμορφο. Στην περιοχή $600\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ απεικονίζονται οι χαρακτηριστικές ταινίες που οφείλονται στις δονήσεις των φωσφορικών ιόντων του υδροξυαπατίτη. Από τις κορυφές του φάσματος του υγιούς οστού, οι ταινίες στα 603 cm^{-1} και στα 560 cm^{-1} αποδίδονται στην τριπλά εκφυλισμένη δόνηση τάσης $\nu_4(\text{O-P-O})$. Στην περιοχή του φάσματος του καρκινικού οστού μεταξύ 700 cm^{-1} και 400 cm^{-1} , οι ταινίες δεν μπορούν να αποδοθούν σε μετατοπίσεις των ταινιών του υδροξυαπατίτη αλλά κυρίως στις ομάδες C-S των S-S των θειολών. Φαίνεται ότι οι θειούχες βάσεις των πρωτεϊνών (κυστεΐνη) και οι γλουταθειόλες (GSH) έχουν οξειδωθεί [Μαμαρέλης, *in vivo*, 2010]. Οι ενώσεις αυτές αντιδρούν πολύ εύκολα με

τις παραγόμενες οξειδωτικές ελεύθερες ρίζες των υδροξυλίων παρέχοντας το ευκίνητο υδρογόνο σύμφωνα με τις αντιδράσεις:



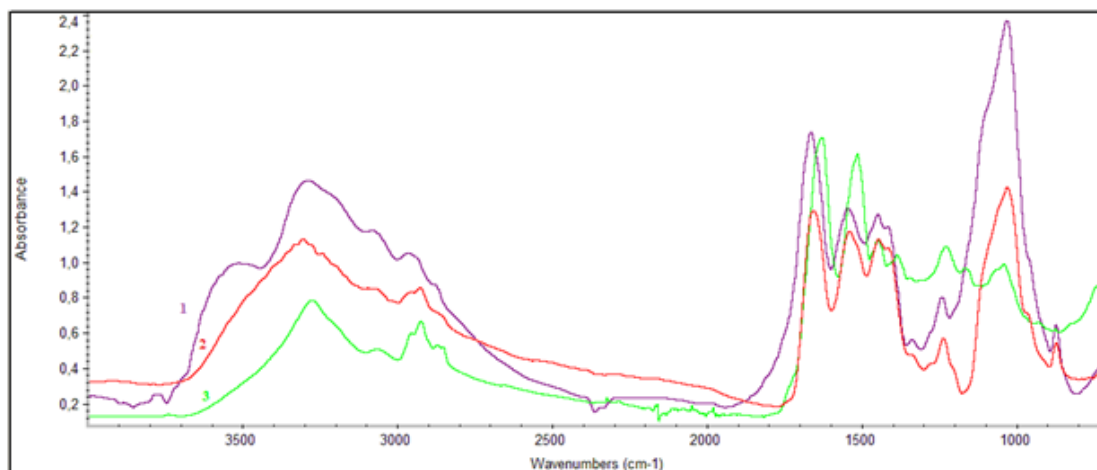
Η αύξηση της έντασης της ταινίας απορρόφησης των ομάδων S-S δείχνει ότι σε κάποιο από τα στάδια της ασθένειας αναπτύσσεται οξειδωτικό στρες.

5.4. Σύγκριση υπέρυθρων φασμάτων καρκινικού και ακτινοβολημένου οστού

Στο Σχήμα 5.7 δίνονται τα υπέρυθρα φάσματα ασθενούς με καρκίνο των οστών, του υγιούς οστού και του ίδιου οστού το οποίο έχει ακτινοβοληθεί με δόση ακτινοβολίας 2 Gy.

Παρατηρούνται σημαντικές μεταβολές, ως αποτέλεσμα τόσο της ασθένειας όσο και της ακτινοβολήσεως. Οι ταινίες των απορροφήσεων των δονήσεων τάσης ομάδων νOH του υδροξυαπατίτη εξαφανίζονται, ενώ των ταινιών νNH των πρωτεϊνών έχουν διαφοροποιηθεί σημαντικά, ως προς το υγιές οστό, υποδηλώνοντας ότι έχει αλλάξει η δομή των πρωτεϊνών. Σημαντική επίσης είναι η αύξηση των εντάσεων των ταινιών των αντισυμμετρικών και συμμετρικών δονήσεων τάσης των ομάδων νCH₂ στα 2920 cm⁻¹ και 2852 cm⁻¹ στο ακτινοβολημένο και καρκινικό οστό. Η παρουσία των ταινιών των αντισυμμετρικών και συμμετρικών δονήσεων τάσης των ομάδων νCH₃ σε σχέση με το υγιές οστό, υποδηλώνει την ελεύθερη δόνηση των ανθρακικών αλυσίδων, η οποία οφείλονται στην μεταβολή του περιβάλλοντος στο οποίο δονούνται. Στην περιοχή του φάσματος από 1800–1500 cm⁻¹, παρουσιάζονται μεγάλες μετατοπίσεις στις ταινίες απορρόφησης των Amide I και II όσον αφορά το ακτινοβολημένο και καρκινικό οστό, καθώς εμφανίζεται και η ταινία στα 1740 cm⁻¹ περίπου. Όπως προαναφέρθηκε, η αύξηση της ταινίας που αντιστοιχεί στην ομάδα νC=O σχετίζεται με την υπεροξείδωση των μεμβρανών και την παραγωγή αλδεϋδών. Συνεπώς, επιβεβαιώνεται η παραδοχή ότι σε κάποιο από τα στάδια της ασθένειας συμμετέχουν οι ελεύθερες ρίζες. Είναι γνωστό ότι κατά την ακτινοβολήση, οι ιοντίζουσες ακτινοβολίες οδηγούν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών, με συνέπεια την έντονη υπεροξείδωση [Anastassopoulou et.al, 2015]. Οι ταινίες των αμιδίων των

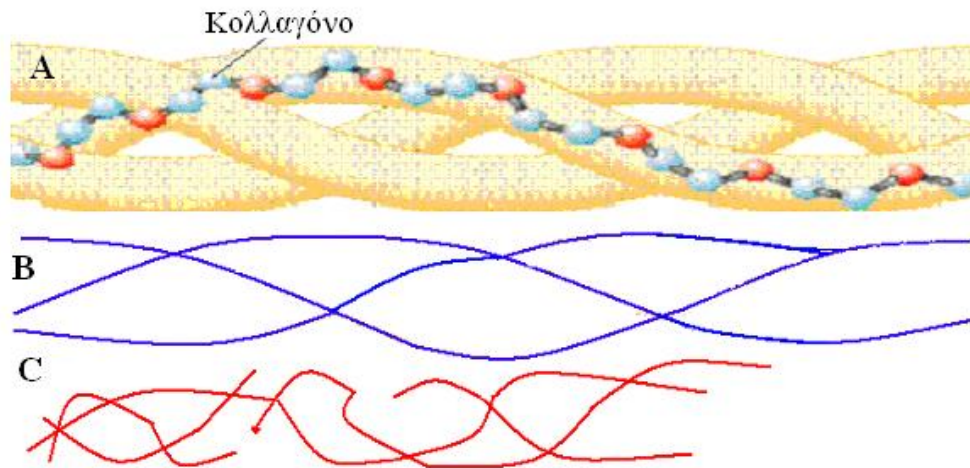
πρωτεϊνών μετατοπίζονται από τα 1650 cm^{-1} (Amide I) και 1550 cm^{-1} (Amide II) προς μικρότερους κυματαριθμούς σε σχέση με το υγιές, δείχνοντας και πάλι την καταστροφή της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών, η οποία οδηγεί στην ευθραυστότητα των οστών.



Σχήμα 5.7: FT-IR φάσματα στην περιοχή του φάσματος $4000\text{--}700\text{ cm}^{-1}$: 1. Υγιές οστό προερχόμενο από κεφαλή ισχίου χωρίς οστική και μεταβολική νόσο, 2. Ακτινοβολημένο υγιές οστό *in situ* με δόση ακτινοβολίας 2Gy, 3. Καρκινικό οστό.

Η ταινία στα 1735 cm^{-1} που αποδίδεται στην δόνηση τάσης της ομάδας του καρβονυλίου $\nu\text{C=O}$ πριν την ακτινοβολήση, αυξάνει σε ένταση και μετατοπίζεται προς μεγαλύτερους κυματαριθμούς μετά την ακτινοβολήση. Είναι γνωστό ότι τα υπεροξειδία των λιπιδίων που προκύπτουν από την ραδιόλυση, οδηγούν στο σχηματισμό ακόρεστων αλδευδών, κετονών και υδρογονανθράκων [Μαμαρέλης, *in vivo*, 2010]. Η ταινία αυτή του καρβονυλίου έχει προταθεί για τον χαρακτηρισμό των αποπτωτικών κυττάρων.

Η σχάση της αλυσίδας της πρωτεΐνης, που περιγράφεται παραπάνω, φαίνεται να συνοδεύεται και από τοπική αλλαγή της δευτεροταγούς δομής της. Αυτό σημαίνει ότι τοπικά, κοντά στα σημεία θραύσης της αλυσίδας, η πρωτεΐνη χάνει την δομή της α-έλικας που είχε αρχικά, σχηματίζοντας δομή β-αναδίπλωσης και στη συνέχεια με αύξηση της δόσης της ακτινοβολίας σχηματίζει τυχαία διαμόρφωση, όπως παρουσιάζεται στην Σχήμα 5.8 [Petra et al., 2005].

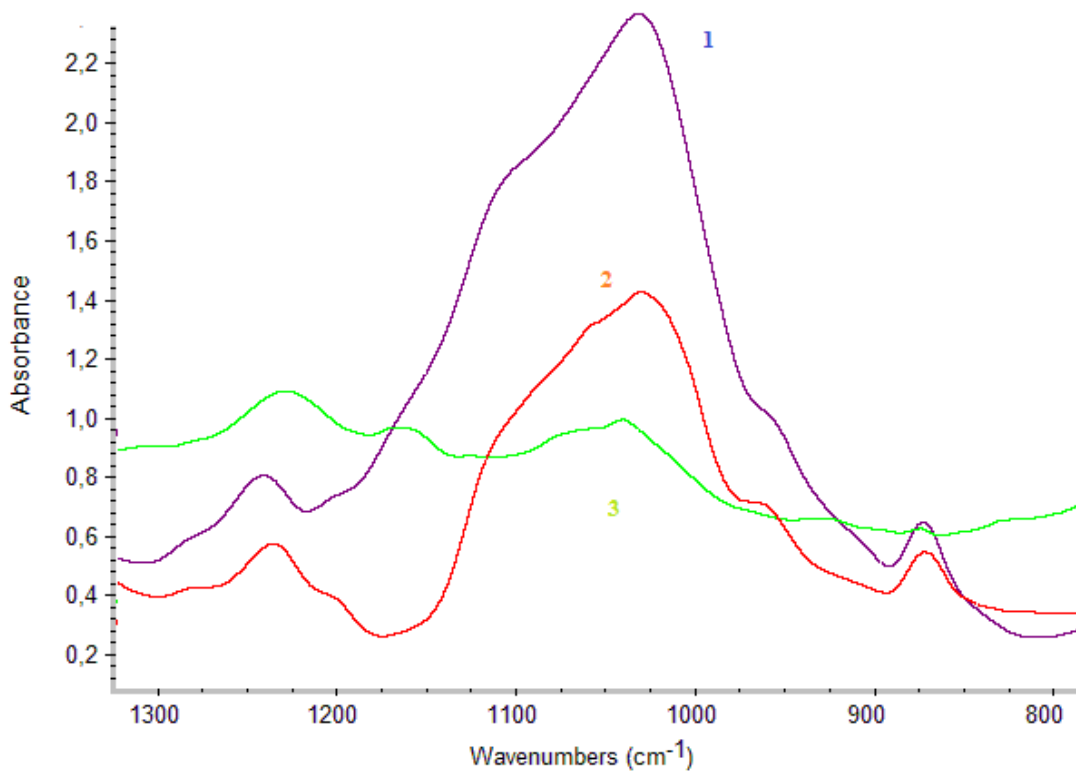


Σχήμα 5.8: Σχηματική παράσταση της αλλαγής της στερεοδομής του κολλαγόνου που προκαλείται με την ακτινοβολήση: από α-έλικα (A) σε β-έλικα (B) και τυχαίος σχηματισμός με αλυσίδες μικρότερου μήκους (C)

In vivo, οι αντιδράσεις που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται κατά τον μεταβολισμό του οργανισμού, γίνονται είτε με άμεση σχάση των δεσμών των πρωτεϊνών και του κολλαγόνου, είτε με αντιδράσεις μεταφοράς φορτίου. Οι αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών στους ζώντες οργανισμούς συμβάλλουν σημαντικά στην γήρανση των κυττάρων και στην εμφάνιση ασθενειών [Αναστασοπούλου, 2003, Κολοβού, 2008, Κολοβού, 2003].

Στην περιοχή του φάσματος από $1450-1400\text{ cm}^{-1}$, οι κορυφές που αντιστοιχούν στα ανθρακικά ιόντα έχουν αλλάξει σημαντικά, υποδεικνύοντας ότι τα ανθρακικά ιόντα δεν παραμένουν αδρανή στην καταστρεπτική δράση της ακτινοβολίας ή κατά την εξέλιξη της ασθένειας. Σημαντική μείωση ως προς το υγιές οστό παρατηρείται στην κορυφή που αντιστοιχεί στην ομάδα Amide III και χαρακτηρίζει την τεταρτοταγή δομή των πρωτεϊνών. Η ταινία αυτή σε συνδυασμό με τις ταινίες των N-H στην περιοχή $4000-3000\text{ cm}^{-1}$ επιβεβαιώνει τη μεταβολή της δομής των πρωτεϊνών.

Για να διαπιστωθούν οι βλάβες τις οποίες προκαλεί ο καρκίνος στην δομή των οστών και να επιβεβαιώσουμε την παραδοχή της επίδρασης των ελευθέρων ριζών σε κάποιο στάδιο της ασθένειας, συγκρίναμε τα φάσματα του καρκινικού οστού με τα αντίστοιχα του υγιούς και του υγιούς ακτινοβολημένου.



Σχήμα 5.9: FT-IR φάσματα οστών στην περιοχή του φάσματος 1400–700 cm^{-1} :
 1: Υγιές, 2: Ακτινοβολημένο, 3: Καρκινικό

Στο Σχήμα 5.9 δίνονται τα υπέρυθρα φάσματα του υγιούς (1), του ακτινοβολημένου (2) και του καρκινικού (3) οστού στην περιοχή 1300–900 cm^{-1} όπου απορροφούν οι ομάδες $\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ και $\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$ των φωσφορικών ιόντων του υδροξυαπατίτη. Από την σύγκριση των φασμάτων διαπιστώνεται ότι για το ακτινοβολημένο οστό, ο βιολογικός υδροξυαπατίτης μειώνεται και μετατρέπεται τελικά σε άμορφο υδροξυαπατίτη, ενώ για το καρκινικό οστό ο υδροξυαπατίτης γίνεται κρυσταλλικός (ανόργανος) [Κυριακίδου, 2014]. Η μείωση του βιολογικού υδροξυαπατίτη οφείλεται κυρίως στην καταστροφή της οργανικής μάζας, η οποία συγκρατεί τους κρυστάλλους του υδροξυαπατίτη. Όπως αναφέρεται βιβλιογραφικά [J. Anastassopoulou, et al., 2011], ανάλογα με το ιατρικό ιστορικό και το στάδιο της ασθένειας, φαίνεται ότι η αφαλάτωση των οστών γίνεται σταδιακά με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται τόσο η δομή των φωσφορικών αλάτων όσο και το μέγεθος των κρυστάλλων του υδροξυαπατίτη.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η υπέρυθη φασματοσκοπία με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared, FT-IR) σε συνδυασμό με την μικροσκοπία σάρωσης (Scanning Electron Microscope, SEM) για την μελέτη υγιών οστών και την σύγκρισή τους με φάσματα οστών τα οποία λήφθηκαν από ασθενείς, καθώς και με φάσμα από υγιές οστό το οποίο ακτινοβολήθηκε με δόση ακτινοβολίας 2Gy, προερχόμενη από πηγή γ - ^{60}Co Gammachamber 4000A. Η ακτινοβολήση έγινε για να μελετηθεί ποιές είναι οι βλάβες οι οποίες προκαλούνται κατά την ακτινοθεραπεία των οστών.

Από την σύγκριση των υπέρυθρων φασμάτων των καρκινικών και των ακτινοβολημένων οστών με τα υγιή στην περιοχή του φάσματος από $4000\text{--}400\text{cm}^{-1}$ διαπιστώθηκαν σημαντικές μεταβολές.

Από την μελέτη της μοριακής δομής των οστών πριν και μετά την ακτινοβολήση, διαπιστώθηκε ότι η ακτινοβολία επιδρά άμεσα στη μοριακή δομή τους. Οι βλάβες φαίνεται να αρχίζουν με μεταβολή της τεταρτοταγούς δομής και στην συνέχεια της δευτεροταγούς δομής των κολλαγονούχων πρωτεϊνών, μετατρέποντας την α -έλικα σε β -αναδίπλωση και τελικά σε τυχαία ελικοειδή περιέλιξη. Όσο αφορά την δομή του υδροξυαπατίτη, παρατηρήθηκε η μετατροπή του από βιολογικό σε άμορφο μετά την ακτινοβολήση.

Στην περίπτωση των καρκινικών οστών παρατηρήθηκε μεταβολή τόσο της τεταρτοταγούς όσο και της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών, καθώς και μεταβολή του περιβάλλοντος των κυττάρων και μείωση της ανθρακικής αλυσίδας των μακρομορίων. Ακόμη, διαπιστώθηκε ότι οι μεταβολές του φάσματος σε σύγκριση με το υγιές οστό, οφείλονται στην υπεροξείδωση των λιπιδίων, δηλαδή στην επίδραση των ελεύθερων ριζών.

Στην περίπτωση του καρκινικού οστού μεταβάλλεται η δομή των πρωτεϊνών και το κολλαγόνο αποκτά τυχαία σπειροειδή διαμόρφωση, όπως και στην περίπτωση του ακτινοβολημένου υγιούς οστού. Ιδιαίτερα τονίζεται ότι τόσο στο ακτινοβολημένο όσο και στο καρκινικό οστό μειώνεται σημαντικά η περιεκτικότητα σε υδροξυαπατίτη, γεγονός που ερμηνεύει την παρατηρούμενη οστεοπόρωση στα καρκινικά οστά. Παρατηρήθηκε επίσης ότι στα καρκινικά οστά ο υδροξυαπατίτης

μετατρέπεται από βιολογικό σε κρυσταλλικό, αυξάνοντας με τον τρόπο αυτό την ευθραυστότητα των οστών.

Η σύγκριση των υπέρυθρων φασμάτων μεταξύ ακτινοβολημένου υγιούς και καρκινικού οστού έδειξε ότι σε κάποιο από τα στάδια της ασθένειας συμμετέχουν οι ελεύθερες ρίζες στην ανάπτυξή της.

Τέλος, όλα τα συμπεράσματα που εξήχθησαν από τη μελέτη των φασμάτων, επιβεβαιώθηκαν και από τη μελέτη των εικόνων που προέκυψαν από το SEM, όπου διαπιστώθηκε η μείωση της οστικής μάζας.

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η υπέρυθη φασματοσκοπία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα ισχυρό μέσο ανάλυσης ενός πολυσύνθετου βιολογικού συστήματος, όπως είναι ο οστίτης ιστός.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Αναστασοπούλου, Ι., Θεοφανίδης, Θ. (2010). Βιοϋλικά, Χημικός δεσμός δότη–δέκτη, Μακρομόρια–Υπερμόρια, ΕΜΠ, Αθήνα
- Αναστασοπούλου, Ι. (2003). Ακτινοχημεία, Χημεία ελευθέρων ριζών, Εφαρμογές στην Βιομηχανία, Περιβάλλον, Βιολογία, Αθήνα
- Θεοφανίδης, Θ., Αναστασοπούλου, Ι. (1997). Φασματοσκοπία Δονήσεων–Συμμετρία, ΕΜΠ, Αθήνα
- Καλονάκης, Κ (2007). Ανάλυση οστών με χρήση φασματοσκοπίας RAMAN, Διατμηματικό πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών, Μεταπτυχιακή εργασία, Πανεπιστήμιο Πάτρας
- Κολοβού, Π (2008). Επίδραση των ακτινοβολιών στην γήρανση των οστών–Ο ρόλος των ελευθέρων ριζών, Διδακτορική διατριβή, Υπεύθυνη Ι. Αναστασοπούλου
- Π. Κολοβού, Α. Ντόβας, Π. Ευσταθίου, Ι. Αναστασοπούλου (2003). Μελέτη της επίδρασης των ακτινοβολιών στο κολλαγόνο και στην οστική συνοχή οστού με φασματοσκοπία FT-IR, Οστούν, 14, 68
- Μαμαρέλης, Ι., Πισσαρίδη, Κ., Δρίτσα, Β., Κοτιλέας, Π., Τσιλιγγίρης, Β., Τζιλάλης, Β., Αναστασοπούλου, Ι., (2010). Υπεροξειδωση των Καρωτίδων Αρτηριών Κατά το Οξειδωτικό Στρες. FT-IR Φασματοσκοπική Μελέτη, *In vivo*
- Παντέρη, Μ., Χατζηβασιλείου, Μ., (2005). Οστεοπορωτικά κατάγματα σπονδυλικής στήλης, Πτυχιακή εργασία, Υπεύθυνος Ν. Γιαννακουδάκης
- Πετρά Μ., Θεολόγης Τ., Μισαϊλίδης Σ., Αναστασοπούλου Ι., Θεοφανίδης Θ. (2002). Μελέτη της σύστασης και δομής παιδικού οστού με μικρο-υπέρυθρη φασματοσκοπία (micro-FTIR), Οστούν, 13
- Πετρά Μ., (2003). Μελέτη της εξέλιξης και γήρανσης των οστών με υπέρυθη φασματοσκοπία και μικρο – φασματοσκοπία. Σύγκριση με παθολογικά οστά και υποκατάστατα οστών, Διδακτορική Διατριβή, ΕΜΠ, Αθήνα, υπεύθυνη Ι. Αναστασοπούλου

- Πισσαρίδη, Α (2012). Φασματοσκοπική μελέτη ιστών και βιοϋλικών, Διδακτορική Διατριβή, ΕΜΠ, Αθήνα, υπεύθυνη Ι. Αναστασοπούλου
- Πουλημένος, (2012). Δημιουργία και σύγκριση ευφών-έμπειρων συστημάτων διάγνωσης ασθενειών των οστών, Διατμηματικό πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών, Μεταπτυχιακή εργασία, Πανεπιστήμιο Πάτρας,
- J. Anastassopoulou, M. Kyriakidou, S. Kyriazis, V. Dritsa, T. Kormas. (2015) Protein folding and cancer, *Anticancer Res*, 34/10, 5806-5709.
- J. Anastassopoulou, M. Kyriakidou, A.E. Mavrogenis, P.J. Papagelopoulos & T. Theophanides (2011). Demineralization of bones due to breast cancer metastasis: an Infrared study, *Met. Ions Biol. Med.*
- G. Currell, (2007). *Analytical Instrumentation – Performance, Characteristics and Quality*, John Wiley & sons Ltd, England.
- Dritsa, V (2012). FT-IR spectroscopy in medicine, In *Infrared Spectroscopy*, T. Theophanides (Ed.), Book 2, Intech Publications, pp 262-278.
- P.R. Griffiths, (1972). *Fourier Transform Spectroscopy – Laboratory Methods in Infrared Spectroscopy*, Heyden & son Ltd
- Mamarelis, I., Kotoulas, Chr., Tsiligiris, V., Tzilalis, V., Pissaridi, K., Dritsa V., Anastassopoulou, J. (2011a). The role of free radicals on hyperoxidation of coronary and carotid arteries. In: *Current research in cardiothoracic surgery in Greece*, Ed. D. Dougenis, University of Patras, Patra, 2011,69-73
- Martin, R.B. and Burr, D.B, (1998) *Skeletal Tissue Mechanics*”, Springer –Verlag, New York,
- Nair A.K., Gautieri A., Chang S.-W. & Buehler M. J. (2012) Molecular mechanics of mineralized collagen fibrils in bone, *Nature Communications* 4, Article number: 1724 doi: 10.1038/ncomms2720.
- M. Petra, J. Anastassopoulou, T. Theologis & T. Theophanides, (2005). Synchrotron micro-FT-IR spectroscopic evaluation of normal pediatric human bone, *J. Mol Structure*, 78 101
- P. G. Robey and A. L. Boskey, (1996). *The Biochemistry of Bone*”, in *Osteoporosis*, Eds. R. Feldman and J. Kelsey, Chapter 4, Academic Press, pp: 95-183

Theophanides, T. (2012)a. Infrared Spectroscopy - Life and Biomedical Sciences, Publisher: InTech, Chapters ,published, DOI: 10.5772/2655

Theophanides, T. (2012)b. Infrared Spectroscopy - Materials Science, Engineering and Technology, Publisher: InTech, Chapters ,published, DOI: 10.5772/2055

Theophanides, T. (2015). Infrared Spectroscopy - Anharmonicity of Biomolecules, Crosslinking of Biopolymers, Food Quality and Medical Applications, Publisher: InTech, Chapters ,published, DOI: 10.5772/58483

M. H. Uddin, Takuya Matsumoto, Masayuki Okazaki, Atsushi Nakahira and Taiji Sohmura, (2010). Biomimetic Fabrication of Apatite Related Biomaterials, Biomimetics Learning from Nature, Amitava Mukherjee (Ed.), ISBN: 978-953-307-025-4, InTech, DOI: 10.5772/8777.

<http://www2.eng.cam.ac.uk/~bcb/history.htm>

<http://www.york.ac.uk/res/bonefromblood/background/boneremodelling.html>