



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

ΠΑΠΑΜΙΧΑΗΛ ΗΛΙΑΝΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΚΟΣ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ
ΣΤΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ
ΜΕ ΤΗΝ ΕΦΑΡΜΟΓΗ
ΤΗΣ ΥΠΕΡΥΘΡΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ

Διπλωματική Εργασία
Επιβλέπουσα: ΚΑΡΑΓΙΑΝΝΗ ΧΑΪΔΩ-ΣΤΕΦΑΝΙΑ,
Καθηγήτρια Ε.Μ.Π

ΑΘΗΝΑ 2019

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στον Τομέα ΙΙΙ «Επιστήμης και Τεχνικής των Υλικών» της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π., με σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης των ασθενειών στη μοριακή δομή των οστών με την εφαρμογή της υπέρυθρης φασματοσκοπίας. Τα πειράματα ATR-FTIR πραγματοποιήθηκαν στο Ινστιτούτο Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος, ενώ τα πειράματα SEM στη Σχολή Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Το οστό αποτελεί μέρος του σκελετικού συστήματος των σπονδυλωτών και είναι σκληρό, με μερική ελαστικότητα, βιοϋλικό και ανάλογα με τη θέση στο σώμα στηρίζει ή προστατεύει διάφορα άλλα ζωτικά όργανα, ενώ στο εσωτερικό του παράγονται ερυθρά και λευκά αιμοσφαίρια. Τα συστατικά του οστού είναι οργανομεταλλικά και ρυθμίζουν τη σκληρότητα και ελαστικότητά του. Η μελέτη της μοριακής δομής τους και η μεταβολή της συναρτήσει του χρόνου επιτρέπει να μελετήσουμε την εξέλιξη της ζωής του πλανήτη εδώ και χιλιάδες χρόνια. Αν και πολλοί επιστήμονες ασχολήθηκαν με τα οστά, παρόλα αυτά συνεχίζουν να υπάρχουν αναπάντητα ερωτήματα.

Τα τελευταία χρόνια, η επιστημονική κοινότητα προσπαθεί να κατανοήσει τον μηχανισμό της επίδρασης των ασθενειών σε μοριακό επίπεδο, έτσι ώστε να μπορέσει να αντιμετωπίσει τις ασθένειες και να αναπτύξει νέες θεραπείες οι οποίες να μην εμφανίζουν ανεπιθύμητες παρενέργειες.

Για τη μελέτη της επίδρασης των ασθενειών στη μεταβολή της μοριακής δομής των οστών χρησιμοποιείται η Φασματοσκοπία Υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier με αποσβένουσα ολική ανάκλαση (Attenuated Total Reflectance- Fourier Transform Infrared Spectroscopy, ATR- FTIR). Η ATR-FTIR φασματοσκοπία χρησιμοποιείται τα τελευταία χρόνια για τη μελέτη

ανθρωπίνων ιστών και υγρών, συμπεριλαμβανομένων και οστών, αφού δεν απαιτείται ιδιαίτερη επεξεργασία του δείγματος. Πλεονέκτημα της ATR-FTIR φασματοσκοπίας είναι η ταυτόχρονη καταγραφή όλων των συστατικών του οστού, χωρίς να απαιτείται ο διαχωρισμός των συστατικών, με αποτέλεσμα να μπορούμε να πάρουμε πληροφορίες και για το βιολογικό περιβάλλον και τον τρόπο σύνδεσης των συστατικών.

Η μικροδομή των δειγμάτων και η επιφανειακή δομή των οστών, μελετήθηκαν με Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Scanning Electron Microscope, SEM) σε σύνδεση με φασματόμετρο ακτινών-Χ ενεργειακής διασποράς (EDX) για τη στοιχειακή ανάλυση.

Τα ATR-FTIR φάσματα που λήφθηκαν οδήγησαν σε ενθαρρυντικά συμπεράσματα, τα οποία θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως συμπληρωματικά στοιχεία στην κλινική διάγνωση, δεδομένου ότι η μέθοδος είναι ταχύτατη και επαναλαμβανόμενη.

Εκφράζω θερμότες ευχαριστίες προς την επιβλέπουσα τη διπλωματική μου εργασία, Καθηγήτρια του Ε.Μ.Π. κα Χάιδω-Στεφανία Καραγιάννη, για την πολύτιμη βοήθειά της στις τελικές διορθώσεις της εργασίας.

Ευχαριστώ, επίσης, θερμά την τ. Καθηγήτρια του Ε.Μ.Π. κα Μαρία Κουή, για την αρχική ανάθεση του θέματος, καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την καθοδήγηση που μου παρείχε κατά την εκπόνηση της εργασίας μου.

Ακόμη, θερμές ευχαριστίες εκφράζω προς την τ. Καθηγήτρια του Ε.Μ.Π. κα Ιωάννα Αναστασοπούλου, για τις πολύτιμες επιστημονικές συμβουλές και υποδείξεις της και την καθοδήγησή της κατά τη διάρκεια συγγραφής της εργασίας.

Περαιτέρω, θερμές ευχαριστίες εκφράζω προς τον Ομότιμο Καθηγητή του Ε.Μ.Π. κ. Θεόφιλο Θεοφανίδη και τη Δρα Βασιλική Δρίτσα, μέλος Ε.Ε.ΔΙ.Π., για τις συμβουλές και υποδείξεις τους σχετικά με την πραγματοποίηση της εργασίας μου και της συγγραφής της.

Επιπλέον, εκφράζω τις ευχαριστίες μου στους Υ.Δ. του Τομέα ΙΙΙ, κ. Ορέστη Τάνη, Χημικό Μηχανικό, και κα Βασιλική Μαμαρέλη, Ιατρό, για την καθοδήγηση και βοήθεια που μου προσέφεραν στην εκτέλεση του πειραματικού μέρους της διπλωματικής μου εργασίας, που βοήθησε στην πλήρη κατανόηση των βασικών αρχών λειτουργίας των φυσικοχημικών μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω θερμά τον Δρα Πέτρο Σχοινά, μέλος Ε.Ε.ΔΙ.Π., για την πολύτιμη βοήθειά του στην ανάλυση της μορφολογίας των επιφανειών των δειγμάτων με το Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες εκφράζω και στους Δρα Δημήτρη Τσιούρβα και Δρα Ωραιοζήλη Σιδεράτου, Ερευνητές στο Ινστιτούτο Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. Δημόκριτος, για τη δυνατότητα που μου παρείχαν να πραγματοποιήσω τις μετρήσεις ATR-FTIR στο εργαστήριό τους, καθώς επίσης και για τη φιλοξενία τους.

Τέλος, εκφράζω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου και τους δικούς μου ανθρώπους για την υποστήριξη και αγάπη που μου έδωσαν όλα αυτά τα χρόνια μέχρι την ολοκλήρωση των σπουδών μου.

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2019

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	8
I. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΟΣΤΑ.....	10
1.1 Γενικά.....	10
1.2 Η δομή των οστών.....	11
1.3 Κύτταρα οστίτη ιστού.....	18
1.4 Οργανική και ανόργανη Οστική Φάση.....	22
1.5 Οστεογένεση.....	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΤΩΝ ΜΕΛΕΤΟΥΜΕΝΩΝ ΟΣΤΩΝ.....	32
2.1 Οστεοπόρωση.....	32
2.2 Σακχαρώδης Διαβήτης.....	34
2.3 Κατάγματα.....	37
2.4 Καρκίνος Παχέος εντέρου.....	41
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΠΕΡΥΘΡΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ FOURIER ΜΕ ΑΠΟΣΒΕΝΟΥΣΑ ΟΛΙΚΗ ΑΝΑΚΛΑΣΗ(ATR-FTIR).....	42
3.1 Ιστορική Αναδρομή.....	42
3.2 Βασικές αρχές της υπέρυθρης φασματοσκοπίας.....	44
3.3 Φασματοφωτόμετρα Υπερύθρου.....	49
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ ΣΑΡΩΣΗΣ (SEM).....	54
4.1 Ιστορική Αναδρομή.....	54
4.2 Αρχή Λειτουργίας SEM.....	55
II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	58
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	58
5.1 Δείγματα και αντιδραστήρια.....	58
5.2 Προετοιμασία Δειγμάτων.....	58
5.3 Φάσματα ATR-FTIR.....	62
5.4 SEM-EDAX.....	63

ΙΙΙ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	64
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΜΕΛΕΤΗ ΦΑΣΜΑΤΩΝ ATR-FTIR.....	64
6.1 Φάσματα Υγιούς Οστού.....	64
6.2 Σύγκριση ATR-FTIR φασμάτων οστών ασθενών με υγιείς δότες	66
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	84
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	88

ΕΙΚΟΝΕΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Εικόνα 1.1: Ταξινόμηση των οστών: μακρύ (1), βραχύ (2) και πλατύ (3).....	12
Εικόνα 1.2: Μακροσκοπική δομή συμπαγούς οστίτη ιστού και σπογγώδους Οστίτη ιστού.....	16
Εικόνα 1.3: Διαφοροποίηση οστεοβλάστη σε οστεοκύτταρο.....	10
Εικόνα 1.4: Δίνεται σχηματικά ο κύκλος της οστικής αναδόμησης.....	29

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Εικόνα 2.1: Ταξινόμηση καταγμάτων ανάλογα με τη φορά της γραμμής του κατάγματος σε σχέση προς τον άξονα του οστού. α) εγκάρσιο κάταγμα β) λοξό κάταγμα και γ) σπειροειδές κάταγμα.....	38
---	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Εικόνα 3.1: Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα. Η Υπέρυθρη περιοχή χωρίζεται σε NIR, MIR(MWIR) και FIR	45
Εικόνα 3.2: Δονήσεις τάσης.....	47
Εικόνα 3.3: Δονήσεις κάμψης.....	48
Εικόνα 3.4: Συμβολόμετρο Michelson.....	50
Εικόνα 3.5: Σχηματική Αναπαράσταση της διαδρομής της δέσμης στην τεχνική ATR-FTIR.....	52

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Εικόνα 4.1: Αρχή λειτουργίας SEM.....	56
--	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

- Εικόνα 5.1:** Τα δείγματα οστού μετά την απομάκρυνση του αίματος, τοποθετήθηκαν
εναλλάξ σε υπεροξειδίο του Υδρογόνου και Ακετόνη.....59
- Εικόνα 5.2:** Το δείγμα 1 χωρίστηκε σε δύο περιοχές λόγω ετερογένειας.....60
- Εικόνα 5.3:** Φασματοφωτόμετρο Nicolet 6700. Ινστιτούτο Νανοεπιστήμης και
Νανοτεχνολογίας του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος.....62

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

- Εικόνα 6.1:** Χημική δομή κολλαγόνου. Υδροξυπρολίνη, προλίνη και γλυκίνη είναι τα
τρία αμινοξέα του κολλαγόνου.....67
- Εικόνα 6.2:** Αντίδραση υπεροξυλ-ελεύθερων ριζών για παραγωγή αλδεϋδης ή
κετόνης.....69
- Εικόνα 6.3:** Απεικονίσεις SEM σε συνδυασμό με στοιχειακή ανάλυση EDAX
δειγμάτων 1(α) και 3(β)-οστεοπορωτικά δείγματα σακχαρώδους διαβήτη
τύπου II.....69
- Εικόνα 6.4:** Απεικόνιση SEM και ανάλυση EDAX δείγματος 5(καρκινικό).
Το άσπρο βέλος δείχνει περιοχή χαμηλής οστικής πυκνότητας λόγω
της οστεοπόρωσης ενώ το κόκκινο βέλος δείχνει σπασμένη
αμυλοειδή πρωτεΐνη.75

ΣΧΗΜΑΤΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

- Σχήμα 6.1:** ATR-FTIR φάσμα υγιές οστού.....64
- Σχήμα 6.2:** Σύγκριση υγιούς οστού (κόκκινο) με δείγμα 1- οστεοπορωτικό οστό με
σακχαρώδη διαβήτη τύπου II.....66
- Σχήμα 6.3:** Σύγκριση υγιούς οστού (κόκκινο) με οστό με οστεοπορωτικό δείγμα
σακχαρώδους διαβήτη. Οι τρεις «ώμοι» του υγιούς οστού δεν συνυπάρχουν
στο δείγμα, ομολογώντας την παρουσία σακχαρώδους διαβήτη.....71

Σχήμα 6.4: Δείγμα ασθενούς με καρκίνο (κόκκινο) σε σύγκριση με δείγμα υγιούς οστού.....	71
Σχήμα 6.5: Σύγκριση δευτεροταγούς δομής πρωτεϊνών σε υγιές οστό (πράσινο) και σε καρκινικό δείγμα (κόκκινο).....	73
Σχήμα 6.6: Σύγκριση του υπό διερεύνηση οστεοπορωτικού δείγματος (πράσινο) σε σύγκριση με δείγμα ασθενούς με καρκίνο (κόκκινο). Τα δύο φάσματα είναι σχεδόν ταυτόσημα.	76
Σχήμα 6.7: Φάσματα υγιούς οστού (κόκκινο) και δείγματος 3, σακχαρώδους διαβήτη και οστεοπόρωσης (πράσινο).....	76
Σχήμα 6.8: Φάσματα υγιούς οστού (μπλε) και δείγματος 4 ασθενούς με σακχαρώδη διαβήτη και οστεοπόρωση (κόκκινο).....	77
Σχήμα 6.9: Δείγμα 1(κόκκινο- ασθενής ηλικίας 81 ετών, έπασχε από ΣΔ τύπου II και ρύθμιζε το σάκχαρο του αίματος με μετφορμίνη), δείγμα 3 (μπλε-ασθενής ηλικίας 72 ετών, έπασχε από ΣΔ τύπου II και ρύθμιζε το σάκχαρο του αίματος με ινσουλίνη) και δείγμα 4 (πράσινο- ασθενής ηλικίας 86 ετών, έπασχε από ΣΔ τύπου II και ρύθμιζε το σάκχαρο του αίματος με ινσουλίνη. Στην ταινία 1160 cm^{-1} φαίνεται ολοκάθαρα η απουσία ουρικού οξέος στο δείγμα 1, το οποίο είναι υπό αγωγή με μετφορμίνη, σε αντίθεση με τα δείγματα 3 και 4 που λόγω παρουσίας ινσουλίνης έχουν αυξημένο ουρικό οξύ.....	78
Σχήμα 6.10: Σύγκριση περιοχής 860-880 cm^{-1} των δειγμάτων από ασθενείς που πάσχουν από οστεοπόρωση και σακχαρώδη διαβήτη Τύπου II, δείγματα 3 (κόκκινο) και 4 (μπλε).	79
Σχήμα 6.11: Δείγμα από ασθενή με οστεοπόρωση και καρκίνο, δείγμα 3 (κόκκινη) και δείγμα ασθενούς με σακχαρώδη διαβήτη Τύπου II και οστεοπόρωση, δείγμα 4 (μοβ). Το κόκκινο φάσμα δείχνει τη χαρακτηριστική διαμόρφωση των αμυλοειδών πρωτεϊνών σε φάσματα ATR-FTIR.....	80
Σχήμα 6.12: Σύγκριση υγιούς οστού (κόκκινο) με επιληπτικό ασθενή (μόβ).....	81

ΠΙΝΑΚΕΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Πίνακας 1.1: Σύσταση συμπαγούς οστού.....	13
--	----

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιείται η Φασματοσκοπία Υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier με αποσβένουσα ολική ανάκλαση (Attenuated Total Reflectance- Fourier Transform Infrared Spectroscopy, ATR- FTIR) και του Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σάρωσης (Scanning Electron Microscope) για τη διερεύνηση της επίδρασης ασθενειών στη μοριακή δομή των οστών.

Για τον σκοπό αυτό, λήφθηκαν δείγματα οστών από ασθενείς που υποβλήθηκαν σε αποκατάσταση καταγμάτων ή και αρθροπλαστική. Με βάση το κλινικό ιστορικό, οι ασθενείς εμφάνιζαν επί πλέον και οστεοπόρωση. Ορισμένοι ασθενείς, σύμφωνα με το κλινικό ιστορικό, εμφάνιζαν Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου II, μεταστατικό καρκίνο των οστών με αρχική εστία στο παχύ έντερο και επιληψία. Για τη μελέτη των μεταβολών της μοριακής δομής των οστών λόγω της ασθένειας, συγκρίθηκαν τα υπέρυθρα φάσματα των ασθενών με αντίστοιχα φάσματα υγίων ατόμων.

Από τη σύγκριση των φασμάτων διαπιστώθηκαν σημαντικές μεταβολές στην ένταση των κορυφών και μετατοπίσεις στη συχνότητα απορρόφησης των ταινιών, στα κυριότερα συστατικά των βιολογικών μορίων των οστών, λόγω των ασθενειών, σε όλη την έκταση του φάσματος από $4000-400\text{ cm}^{-1}$. Οι κυριότερες μεταβολές παρατηρήθηκαν στις κολλαγονούχες πρωτεΐνες και τον υδροξυαπατίτη, που αποτελούν τα βασικά συστατικά των οστών.

Επίσης, παρατηρήθηκε μεγάλη επίδραση των ελευθέρων ριζών σε οστά που εμφάνισαν καρκίνο, όπως προκύπτει από την αύξηση της έντασης της ταινίας στα 1744 cm^{-1} , η οποία αποδίδεται στον σχηματισμό της αλδεϋδικής ομάδας (HCO). Ο σχηματισμός αλδεϋδών χρησιμοποιείται ως δείκτης καρκινογένεσης, επιβεβαιώνοντας τα φασματοσκοπικά δεδομένα.

Τέλος, οι απεικονίσεις SEM της μορφολογίας των δειγμάτων επιβεβαιώνουν την υπάρχουσα οστεοπόρωση, την καταστροφή της μοριακής δομής των πρωτεϊνών και τις παρατηρούμενες μεταβολές στα ATR-FTIR φάσματα. Επίσης, σε ασθενείς με εμφυτεύματα παρατηρήθηκε η παρουσία των στοιχείων Cr, Fe και Ni, λόγω των κραμάτων που χρησιμοποιούνται στην παρασκευή των εμφυτευμάτων και έχει αποδειχθεί ότι προκαλούν οξειδωτικό στρες.

Από τη σειρά πειραμάτων διαπιστώθηκε ότι η υπέρυθη φασματοσκοπία δίνει γρήγορα και αξιόπιστα αποτελέσματα για την ύπαρξη ασθένειας, το στάδιο στο οποίο βρίσκεται και την επίδραση στον οργανισμό.

ABSTRACT

In the present study, Attenuated Total Reflectance- Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR) in combination with Scanning Electron Microscope (SEM) were used in order to study the influence of the diseases on the molecular structure of bones.

For this purpose, samples were obtained from patients undergoing osteoarthritic surgery or surgery due to a fracture. Based on the clinical history of the patients, the conditions that were observed were osteoporosis, Type II Diabetes, Metastatic Colorectal Cancer and epilepsy. From the analysis of the molecular structure and damage of the samples at the region $4000-400\text{ cm}^{-1}$, many differences regarding the intensity and frequency of the peaks were observed in comparison with the healthy bone sample. These variations were due to the changes in the structure of collagen proteins and the hydroxyapatite of bones.

Furthermore, observations were made concerning the cancerous samples, where there was an extreme influence of free radicals and oxidative stress to the bone structure compared to the healthy bone sample. This confirms the suggestion that the free radicals are involved in hyperoxidation of lipids in a pathway of the disease development.

Additionally, the SEM images confirmed the results obtained by ATR-FTIR, revealing areas of low bone density, transition metals involvement in oxidative stress and increased amyloid protein concentration in the presence of cancer.

As a conclusion to the series of these experiments, Infrared spectroscopy can give fast and accurate results in regards to the existence, state and effect of a medical condition.

I. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΟΣΤΑ

1.1 Γενικά

Τα οστά και τα δόντια, αποτελούν το μοναδικό τμήμα του ανθρώπινου σώματος το οποίο μπορεί να διατηρηθεί, κάτω από κατάλληλες συνθήκες, για χιλιάδες χρόνια. Αυτό δεν συμβαίνει με τους μαλακούς ιστούς, οι οποίοι μετά τον θάνατο οδηγούνται σε αποσύνθεση. Μέχρι την ανάπτυξη χημικών και βιοχημικών μεθόδων η ταξινόμηση των οστών γινόταν με βάση τα μορφολογικά γνωρίσματα (μέγεθος, σκληρότητα, κ.ά.)[1].

Είναι γνωστό ότι, ενώ η αντίσταση σε δυνάμεις εφελκυσμού του οστού είναι σχεδόν ίση με αυτή του σιδήρου, το οστό είναι 3 φορές ελαφρύτερο και 10 φορές πιο εύκαμπτο. Παρόλα αυτά, το οστό δεν είναι ομοιογενές υλικό, όπως ο σίδηρος, τα πλαστικά ή τα μέταλλα που χρησιμοποιούνται στα περισσότερα ορθοπεδικά εμφυτεύματα. Η θεμέλια ουσία του αποτελείται από οργανικά και ανόργανα συστατικά, και οι εσωτερικές και εξωτερικές επιφάνειές του καλύπτονται από κύτταρα και κυτταρικές προσεκβολές[1].

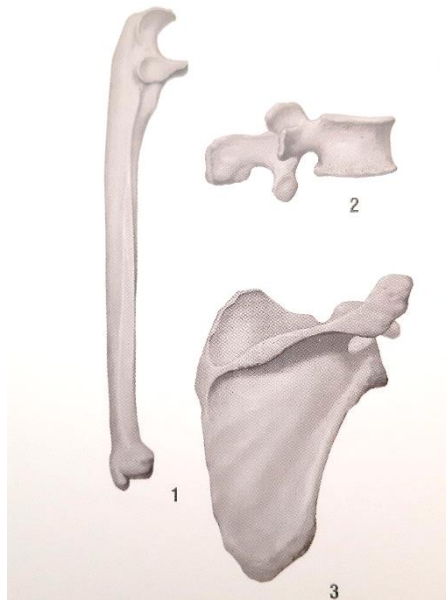
Τα οστά συνδέονται συχνά μόνο με τον προστατευτικό και υποστηρικτικό τους ρόλο στο ανθρώπινο σώμα. Παρόλο που ένα οστό εκτελεί αυτές τις λειτουργίες, στην πραγματικότητα είναι ένα πολύ δυναμικό όργανο, το οποίο μεταβάλλεται διαρκώς, ανταποκρινόμενο σε μηχανικά και ορμονικά ερεθίσματα. Συνάμα, αποθηκεύει κρίσιμα θρεπτικά συστατικά, λιπίδια και πρωτεΐνες, ενώ συμβάλλει στην ομοιοστάση μεταλλικών ιόντων[1-3].

1.2 Δομή των οστών

1.2.1 Γενική ταξινόμηση των οστών

Η ταξινόμηση των οστών γίνεται σύμφωνα με το σχήμα και τη λειτουργία τους, χωρίζονται δε σε μακρά, πλατιά, βραχέα και αεροφόρα[1].

- Μακρά οστά ονομάζονται εκείνα τα οποία έχουν μία από τις τρεις διαστάσεις τους μεγαλύτερη από τις άλλες δύο. Τα μακρά οστά έχουν ένα μακρύ αυλοειδές σώμα που ονομάζεται διάφυση και δύο άκρα που ονομάζονται επιφύσεις. Το σημείο που ενώνεται η διάφυση με την επίφυση ονομάζεται μετάφυση. Η διάφυση αποτελείται από συμπαγές οστό ενώ εσωτερικά βρίσκεται ο μυελώδης αυλός, που περιέχει μυελό. Οι δοκίδες του σπογγώδους οστού, το οποίο βρίσκεται στις επιφύσεις, είναι επίσης πλήρεις με μυελό των οστών. Τα μακρά οστά αυξάνονται κατά μήκος. Μακρά είναι τα οστά των ανθρώπινων άκρων, όπως το βραχιόνιο, η κερκίδα, η ωλένη, το μηριαίο, η κνήμη και η περόνη [1][2].
- Βραχέα οστά ονομάζονται τα οστά τα οποία έχουν όλες τις διαστάσεις περίπου ίσες. Έχουν συνήθως τραπεζοειδές, κυβοειδές, κωνοειδές ή ακανόνιστο σχήμα. Αποτελούνται, κυρίως, από σπογγώδες οστό με μια λεπτή στιβάδα συμπαγούς οστού εξωτερικά και αυξάνονται κατά τρεις άξονες. Βραχέα οστά είναι τα οστά του καρπού και του ταρσού.
- Τα πλατιά οστά αποτελούνται από δύο στρώματα συμπαγούς οστού μεταξύ των οποίων υπάρχει σπογγώδες οστό, το οποίο ονομάζεται διπλόη. Η ανάπτυξή τους γίνεται σε δύο άξονες. Χαρακτηριστικά πλατιά οστά είναι η ωμοπλάτη και η λεκάνη[1][2].
- Τέλος, τα αεροφόρα οστά τα οποία έχουν κοιλότητες που επενδύονται με βλεννογόνο, όπως η άνω γνάθος[1][2][5].



Εικόνα 1.1: Ταξινόμηση των οστών: μακρύ (1), βραχύ (2) και πλατύ (3).[2]

1.2.2 Σύσταση του οστίτη ιστού

Ο οστίτης ιστός είναι συνδετικός ιστός και είναι ένας από τους σκληρότερους ιστούς του ανθρώπινου σώματος. Αποτελείται, σε μεγάλο βαθμό, από ασβέστιο (22,2%) και κατά συνέπεια απορροφά τις ακτίνες X καλύτερα, παρέχοντας μεγαλύτερη ευκρίνεια στις ακτινογραφίες[4].

Αποτελείται από την οστική θεμέλια ουσία που αποτελείται από την ανόργανη και την οργανική (οστεοειδής) ύλη σε αναλογία 65% με 35% αντίστοιχα[1,6]. Η οργανική θεμέλια ουσία περιέχει ίνες κολλαγόνου τύπου I (90%) και πρωτογλυκάνες εμπλουτισμένες με θεική χονδροϊτίνη, θεική κερατίνη και υαλουρονικό οξύ καθώς και μη κολλαγονούχες ουσίες. Το ανόργανο στοιχείο περιέχει, συνήθως, εναποθέσεις φωσφορικού ασβεστίου και μαγνησίου, δηλαδή άλατα υδροξυαπατίτη[1,6].

Το κολλαγόνο τύπου I αποτελεί την κυρίαρχη πρωτεΐνη της οστικής θεμέλιας ουσίας. Οι μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες της θεμέλιας ουσίας περιλαμβάνουν την οστεοκαλσίνη, την οστεοποντίνη και την οστεονεκτίνη, οι οποίες συντίθενται από τους οστεοβλάστες και έχουν συγκεκριμένες ιδιότητες κατά την επασβέστωση (mineralization) του οστού[1,6,7].

Αποτέλεσμα της περιεκτικότητας του οστού σε ινίδια κολλαγόνου είναι η ελαστικότητα των οστών, ενώ η ύπαρξη του ανόργανου τμήματος της θεμέλιας ουσίας διασφαλίζει τη σκληρότητα του οστίτη ιστού[4,7].

Στοιχείο	Περιεκτικότητα (%)
H	3,4
C	15,5
N	4,0
O	44,0
Mg	0,2
P	10,2
S	0,3
Ca	22,2
Διάφορα	0,2

1.2.3 Φλοιώδες και σπογγώδες οστό

Ανάλογα με το πορώδες και τη φαινομενική πυκνότητά τους (apparent density), τα οστά διακρίνονται σε συμπαγή (φλοιώδη) και σπογγώδη (δοκιδωτά). Οι μέσες τιμές της φαινομενικής πυκνότητας ενός φλοιώδους μηριαίου οστού είναι $1,85 \text{ g/cm}^3$ και ενός κνημιαίου σπογγώδους οστού $0,30 \text{ g/cm}^3$ [1]. Κάθε οστό περιέχει διαφορετικές αναλογίες σπογγώδους και συμπαγούς ιστού ανάλογα με την τοποθεσία του στον ανθρώπινο σκελετό. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η περιφέρεια του σκελετικού συστήματος, η οποία απαρτίζεται, κυρίως, από συμπαγή οστίτη ιστό[1,8].

Το φλοιώδες οστό σχηματίζει περίπου το 80% του ώριμου σκελετού και περιβάλλει το μυελό και το σπογγώδες οστό. 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 οστό έχει 20 περίπου φορές μεγαλύτερη

επιφάνεια ανά μονάδα όγκου, σε σύγκριση με το φλοιώδες οστό, και τα κύτταρά του ανευρίσκονται κυρίως μεταξύ των πεταλίων 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 θεμέλια ουσία. Το μεγάλο ποσοστό της οστικής επιφάνειας, η οποία καλύπτεται από κύτταρα, σε συνδυασμό με την εγγύτητα των αιμοφόρων αγγείων στο μυελό των οστών, εξηγεί εν μέρει το γεγονός ότι το σπογγώδες οστό έχει αυξημένο ρυθμό μεταβολικής δραστηριότητας και συνεχούς ανασχηματισμού (remodelling), όπως και το ότι εμφανίζει ταχύτερη αντίδραση σε μηχανικά ερεθίσματα συγκρινόμενο με το φλοιώδες οστό[1].

Μεγάλες διαφορές παρουσιάζονται μεταξύ του φλοιώδους και του σπογγώδους οστού όσον αφορά την αρχιτεκτονική τους. Το φλοιώδες οστό περιέχει μια σειρά από κενούς χώρους (voids) στα οποία συγκαταλέγονται τα Αβερσιανά κανάλια (Haversian canals), οι σωλήνες Volkmann, τα βοθρία και οι καναλίσκοι. Το σπογγώδες οστό συνίσταται από μικρές αλληλοσυνδεόμενες πλάκες και ραβδία που αποτελούν τις επιμέρους δοκίδες του οστού[1,6].

1.2.4 Ινώδες και πεταλιώδες οστό

Το σπογγώδες και το φλοιώδες οστό μπορεί να αποτελείται από ινώδες (πρωτογενές) ή πεταλιώδες (δευτερογενές) οστό.

Το ινώδες οστό σχηματίζει τον εμβρυονικό σκελετό, ο οποίος στη συνέχεια αντικαθίσταται από ώριμο οστό, καθώς εξελίσσεται η ανάπτυξη του σκελετού. Μικρές ποσότητες ινώδους οστού ανευρίσκονται σε τμήματα των τενόντων και συνδεσμικών προσφύσεων, στις ραφές του κρανίου και στα οστάρια του αυτιού[1].

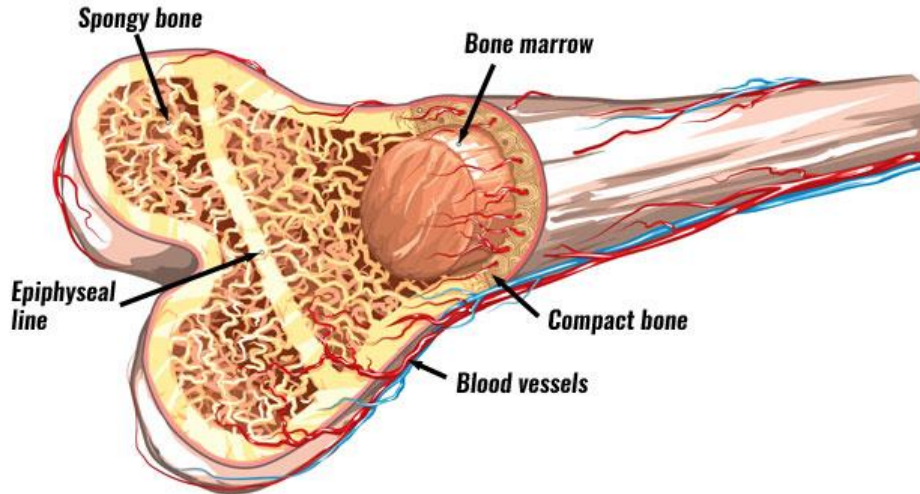
Ινώδες οστό σχηματίζεται, επίσης, στους συζευκτικούς χόνδρους. Εκτός από τις προαναφερθείσες εξαιρέσεις, ινώδες οστό σπάνια ανευρίσκεται στον φυσιολογικό ανθρώπινο σκελετό μετά την ηλικία των 4 - 5 ετών. Μπορεί όμως, να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε ηλικία ως αποτέλεσμα οστικής βλάβης ή βλάβης των μαλακών μορίων,

φαρμακευτικής θεραπείας που διεγείρει τον σχηματισμό οστού, των μεταβολικών ή νεοπλασματικών νόσων ή φλεγμονών[1].

Το ινώδες και το πεταλιώδες οστό διαφέρουν ως προς τον σχηματισμό, τη σύσταση, την οργάνωση-δομή και τις μηχανικές τους ιδιότητες. Το ινώδες οστό έχει ταχύ ρυθμό εναπόθεσης και ανασχηματισμού (turnover), ενώ το πεταλιώδες οστό είναι συνήθως λιγότερο ενεργοποιημένο (δραστήριο). Συγκρινόμενο με το πεταλιώδες οστό, το ινώδες εμφανίζει ένα ακανόνιστο, σχεδόν τυχαίο τρόπο διάταξης των ινιδίων κολλαγόνου και περιέχει 4 περίπου 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, ενώ ο επιμήκης άξονάς τους είναι παράλληλος με τον άξονα των υπολοίπων κυττάρων και των ινιδίων κολλαγόνου της θεμέλιας ουσίας[1,6].

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 οστό είναι πιο εύκαμπτο, παραμορφώνεται πιο εύκολα και είναι μηχανικά λιγότερο ανθεκτικό από το πεταλιώδες οστό. Η σχεδόν τυχαία διάταξη των ινιδίων κολλαγόνου κάνει το ινώδες οστό να εμφανίζει παρόμοιες μηχανικές ιδιότητες ανεξάρτητα από τον τρόπο εφαρμογής των μηχανικών φορτίων – να συμπεριφέρεται, δηλαδή, ιστροπικά. Σε αντιδιαστολή, το πεταλιώδες οστό συμπεριφέρεται ανισότροπα: οι μηχανικές ιδιότητες του διαφέρουν ανάλογα με τον προσανατολισμό των εφαρμοζόμενων φορτίων[1].

Το πεταλιώδες οστό 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[1].



Εικόνα 1.2: Μακροσκοπική δομή συμπαγούς οστίτη ιστού και σπογγώδους οστίτη ιστού[9].

1.2.5 Οστέωνες

Σχηματίζουν τον κύριο όγκο του διαφυσιακού φλοιού στον ώριμο ανθρώπινο σκελετό. Κάθε οστέονας αποτελείται από ένα κεντρικό κανάλι (αβερσιανό, Haversian) που περιβάλλεται από ομόκεντρα πετάλια. Οι οστέωνες διακλαδίζονται ακανόνιστα και διατάσσονται μεταξύ τους με τρόπο που δίνει την εικόνα κυλίνδρων που διατρέχουν κατά μήκος της διάφυσης του οστού[1,6].

Το κεντρικό κανάλι κάθε οστέονα περιέχει αιμοφόρα και λεμφικά αγγεία, και μερικές φορές, νεύρα. Καναλίσκοι (canaliculi), που περιέχουν τις κυτταρικές προεκβολές των οστεοκυττάρων, εκτείνονται ακτινωτά από το κεντρικό αβερσιανό κανάλι. Αυτοί οι καναλίσκοι ενώνουν το κεντρικό κανάλι με τα οστεοκύτταρα.

Διαχωριστικές γραμμές (cement lines) ορίζουν τα εξωτερικά όρια κάθε οστέονα. Αποτελούν λεπτά στρώματα οργανικής θεμέλιας ουσίας, η σύσταση της οποίας είναι παρόμοια με αυτήν του οστεοειδούς. Οι κυτταρικές προεκβολές των καναλίσκων και τα ινίδια κολλαγόνου των οστεώνων δεν διασχίζουν τις διαχωριστικές αυτές γραμμές, με αποτέλεσμα κάθε οστέονας να είναι απομονωμένος σε σχέση με τους γειτονικούς του[1,6].

Ένα πολύπλοκο εσωτερικό δίκτυο καναλιών, κοιλοτήτων (lacunae) και καναλίσκων σχηματίζει ένα από τα πιο αξιοπρόσεκτα δομικά χαρακτηριστικά του ώριμου πεταλιώδους

φλοιώδους οστού. Ακόμα και στο πιο πυκνό τμήμα του, τα κεντρικά κανάλια των οστεώνων διακλαδίζονται και αναστομώνονται τόσο μεταξύ τους όσο και με τα αιμοφόρα κανάλια, γνωστά ως κανάλια του Volkmann[1].

Μέσα στους οστέωνες, οι κοιλότητες που περιέχουν τα οστεοκύτταρα και οι καναλίσκοι σχηματίζουν μια ακόμη μεγαλύτερη επιφάνεια. Συνολικά, η προαναφερθείσα επιφάνεια είναι 100 περίπου 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 θεμέλια ουσία[1,6].

1.3 Κύτταρα οστίτη ιστού

1.3.1 Οστεοπρογονικά κύτταρα

Τα οστεοπρογονικά κύτταρα έχουν ιδιότητες αρχέγονων κυττάρων, φέρουν δηλαδή το δυναμικό για πολλαπλασιασμό και την ικανότητα διαφοροποίησης. Αποτελούν κατηγορία εν ηρεμία κυττάρων που δίνουν γένεση στους οστεοβλάστες, μέσω ενός ρυθμιστικού μηχανισμού που εμπλέκει αυξητικούς και μεταγραφικούς παράγοντες[6,10].

1.3.2 Οστεοβλάστες

Οι οστεοβλάστες προέρχονται από τα οστεοπρογονικά κύτταρα και η πλέον εμφανής λειτουργία τους είναι η σύνθεση και έκκριση οστεοειδούς, ή αλλιώς μη επιμεταλλωμένης οστικής θεμέλιας ουσίας[1]. Πιθανολογείται ότι παίζουν ρόλο στον έλεγχο της ανταλλαγής ηλεκτρολυτών μεταξύ εξωκυττάρων και οστικών υγρών και ότι επηρεάζουν τη διαδικασία επασβέστωσης της οργανικής θεμέλιας ουσίας, διαμέσου της παραγωγής των matrix vesicles[1]. Είναι επιθηλιοειδή κύτταρα με κυβοειδές ή κυλινδρικό σχήμα, σχηματίζοντας ένα κάλυμμα μίας στιβάδας που επενδύει όλες τις περιοχές της ενεργούς οστικής σύνθεσης. Η ρύθμιση της επασβέστωσης (mineralization) της θεμέλιας ουσίας, γίνεται λόγω της υψηλής πολικότητας των κυττάρων αυτών, αφού εναποθέτουν μη επασβεστωμένη θεμέλια ουσία (οστεοειδές) κατά μήκος της επιφάνειας επαφής μεταξύ οστεοβλάστη και οστού [1,6].

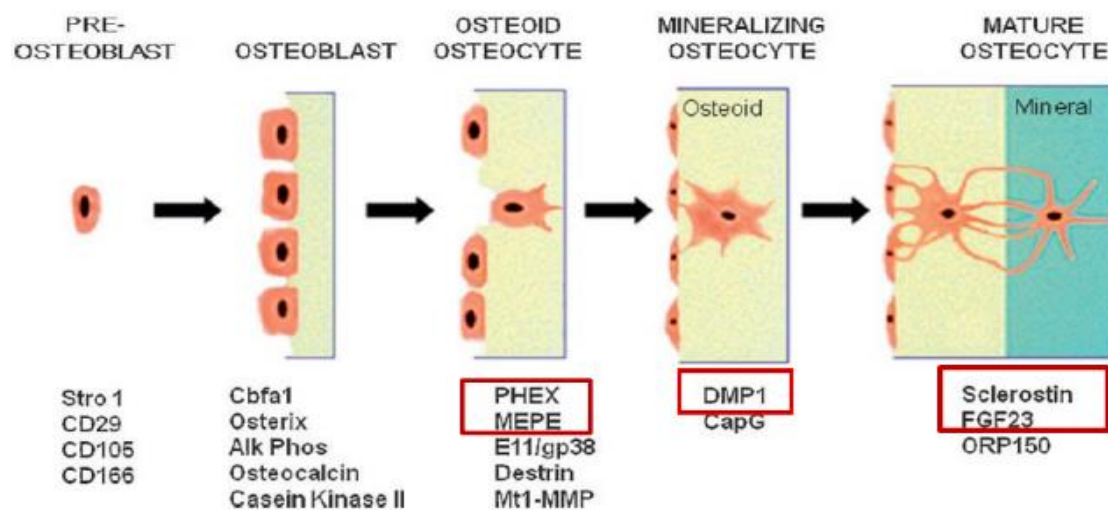
Ακόμη, οι οστεοβλάστες παρουσιάζουν χαρακτηριστικά κυττάρων που συμμετέχουν στην πρωτεϊνοσύνθεση, τη γλυκοζυλίωση και την έκκριση.

Περιέχουν κολλαγόνο I, οστεοκαλσίνη, υπεύθυνη για την εναπόθεση των αλάτων ασβεστίου και φωσφόρου, οστεοποντίνη και οστική σιαλοπρωτεΐνη[1]. Επιπλέον, παράγουν αυξητικούς παράγοντες της οικογένειας των μορφογενετικών πρωτεϊνών των οστών (BMP) που συμβάλουν στην οστική ανάπτυξη[1,6].

Οι ενεργοποιημένοι οστεοβλάστες μπορεί: α) να παραμείνουν στην επιφάνεια του οστού, μειώνοντας τη συνθετική τους δραστηριότητα και παίρνοντας την πιο επίπεδη μορφή των bonelining cells· β) να εγκλωβισθούν μέσα σε οργανική θεμέλια ουσία και να εξελιχθούν σε οστεοκύτταρα· γ) να εξαφανισθούν από τις περιοχές οστικής σύνθεσης[1].

1.3.3 Οστεοκύτταρα

Όταν οι οστεοβλάστες ολοκληρώσουν την παραγωγή οστεοειδούς, αποκτούν ένα πεπλατυσμένο ατρακτόμορφο σχήμα και μετατρέπονται σε οστεοκύτταρα. Έτσι, τα οστεοκύτταρα αποτελούν τα περισσότερα ώριμα ή τα τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα της οστεοβλαστικής γενεάς. Η διαφοροποίηση αυτή ρυθμίζεται από τους αυξητικούς και μεταγραφικούς παράγοντες στους οστεοβλάστες[6].



Εικόνα 1.3: Διαφοροποίηση οστεοβλάστη σε οστεοκύτταρο. Υπάρχει εξελικτική διατήρηση της δομής και θέσης των οστεοκυττάρων. Έχουν βρεθεί οστικά δείγματα αυτών εντός της θεμέλιας ουσίας στον Tyrannosaurus Rex, από απολίθωμα χρονολογημένο 80 εκατομμύρια χρόνια πριν![6]

Τα οστεοκύτταρα είναι εξαιρετικά διακλαδισμένα, καταλαμβάνοντας μικρά διάκενα μεταξύ των πεταλίων ονομαζόμενα *βοθρία* (*Lacunae*)[6]. Μικροί διάυλοι ονομαζόμενοι οστικά σωληνάκια συνδέουν τα βοθρία μεταξύ τους. Τα θρεπτικά συστατικά μεταφέρονται από αιμοφόρα αγγεία εντός ενός αβέρσειου σωλήνα σε οστικό σωληνάριο και εν τέλει στο εσωτερικό των βοθρίων. Επισημαίνεται ότι το πυκνό δίκτυο οστεοκυττάρων βασίζεται τόσο

σε μόρια ενδοκυτταρικής επικοινωνίας όσο και στην κινητοποίηση του εξωκυτταρικού περιβάλλοντος με την διακίνηση θρεπτικών συστατικών προς το εσωτερικό των βοθρίων [6]. Ο χρόνος ζωής ενός οστεοκυττάρου εξαρτάται από αυτή τη διεργασία διάχυσης και παραμένουν ενεργά επί σειρά ετών (10-20 έτη), δεδομένου ότι αγγειώνονται συνεχώς[6].

1.3.4 Επιφανειακά οστεοκύτταρα (bone-lining cells)

Εντοπίζονται στην επιφάνεια της οστικής θεμέλιας ουσίας και ορισμένες φορές αναφέρονται και ως αδρανείς οστεοβλάστες (resting osteoblasts). Επικοινωνούν με τα οστεοκύτταρα μέσω κυτταρικών προσεκβολών που διαπερνούν την οστική θεμέλια ουσία. Τα επιφανειακά οστεοκύτταρα, διεγερόμενα από την παραθορμόνη, εκκρίνουν ένζυμα που απομακρύνουν τη λεπτή στρώση του οστεοειδούς που καλύπτει την επασβεστωμένη θεμέλια ουσία. Η δράση τους αυτή αποτελεί το πρώτο βήμα που επιτρέπει στους οστεοκλάστες να αγκιστρωθούν στην οστική επιφάνεια και να αρχίσουν την οστική απορρόφηση[1].

1.3.5 Οστεοκλάστες

Οι οστεοκλάστες δεν προέρχονται από την οστεοπρογονική κυτταρική γενεά αλλά από την κυτταρική γενεά του προγονικού μονοκύτταρου-μακροφάγου στο μυελό των οστών, η οποία ακολουθεί διαφορετική πορεία διαφοροποίησης. Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αναδόμηση και ανανέωση των οστών. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει απομάκρυνση της οστικής θεμέλιας ουσίας σε πολλαπλές περιοχές, που ακολουθείται από την αντικατάστασή της από νέο οστό μέσω των οστεβλαστών[1,6].

Οι οστεοκλάστες, προερχόμενοι από αιμοποιητικά αρχέγονα κύτταρα, ανευρίσκονται σπάνια στο φυσιολογικό οστό. Ενίοτε, είναι δυνατό να εντοπισθούν στην επιφάνεια του ενδοοστικού, περιοστικού ή αβερσιανού οστού. Στο περίοστεο και στο σπογγώδες οστό, δημιουργούν μια χαρακτηριστική κοιλότητα, που είναι γνωστή ως Howship lacuna. Στο πυκνό φλοιώδες οστό, δημιουργούν τους λεγόμενους osteonal cutting

cones, οι οποίοι εκτείνονται μέσα στο οστό σχηματίζοντας κοιλότητες οστικής απορρόφησης [1,6].

Το πιο χαρακτηριστικό στοιχείο των οστεοκλαστών είναι ο πολύπλοκος τρόπος δίπλωσης της κυτταρικής μεμβράνης, στο σημείο όπου αυτή εφάπτεται στην περιοχή της απορρόφησης του οστού, γνωστή ως ruffled ή brush border. Οι οστεοκλάστες καταστρέφουν το οστό και συνδεδεμένοι με την επιφάνεια του οστού, σχηματίζουν έναν κλειστό χώρο μεταξύ του κυττάρου και της οστικής θεμέλιας ουσίας. Αντλίες ιόντων εισέρχονται στην κυτταρική μεμβράνη, σχηματίζεται το brush border και οι αντλίες μεταφέρουν πρωτόνια στον σφραγισμένο αυτό χώρο, μειώνοντας το pH από ~7 σε ~4.

Η δημιουργία όξινου περιβάλλοντος με την πρόσδεση των οστεοκλαστών στο οστό, είναι αναγκαία για την απορρόφηση του οστού. Η οστική απορρόφηση εμπλέκει την οστική απασβέστωση (demineralization), τη διάλυση δηλαδή των ανόργανων συστατικών του οστού, που ακολουθείται από ενζυμική αποικοδόμηση της οργανικής θεμέλιας ουσίας από την πρωτεάση καθεψίνη K[1,6].

1.4 Οργανική και ανόργανη οστική φάση

Το οστό είναι σύνθετο υλικό που αποτελείται από ανόργανα συστατικά, όπως πρωτεΐνες, νερό, κύτταρα και άλλα μακρομόρια. Παρ' όλα αυτά, τόσο η ανόργανη όσο και η οργανική θεμέλια ουσία συμβάλουν στον έλεγχο των κυτταρικών διεργασιών. Η σύσταση του οστού ποικίλει σε σχέση με την ηλικία του ατόμου, την ανατομική εντόπιση, καθώς και άλλους εξωγενείς παράγοντες, όπως οι διατροφικές συνήθειες και η ύπαρξη μη παθολογικών διεργασιών[1].

Η ανόργανη οστική φάση αποτελεί το 60-70% 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 ικανότητά του να αντέχει σε δυνάμεις τάσης. Το υπόλοιπο 10% του υγρού βάρους του ιστού αποτελείται από νερό[1].

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. Συνήθως τα ανιόντα που ανιχνεύονται ως προσμείξεις περιέχουν μαγνήσιο, κάλιο, φθόριο και κιτρικό[1]. 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). Το μικρό τους μέγεθος, εκτός του ότι παρέχει δομική σταθερότητα και αντοχή στο σύμπλεγμα ανόργανης οστικής μάζας, διευκολύνει την ενσωμάτωση και απορρόφηση εξωγενών ιόντων, όπως και την αποσύνθεση της ανόργανης οστικής φάσης στο όξινο περιβάλλον που έχουν δημιουργήσει οι οστεοκλάστες κατά τη διάρκεια οστικού ανασχηματισμού[1].

1.4.2 Οργανική φάση- 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 αποτελεί το 90% περίπου της οργανικής φάσης. Το υπόλοιπο 10% συνίσταται σε μη-κολλαγονούχες γλυκοπρωτεΐνες και πρωτεογλυκάνες ειδικές για το οστό. Ακόμα και αν έχουν μικρή περιεκτικότητα, επηρεάζουν πολύ τη βιολογική λειτουργία του οστού[1].

Το κολλαγόνο είναι συστατικό πολύ μικρής διαλυτότητας αποτελούμενο από τρεις πολυπεπτιδικές α-αλυσίδες, που σχηματίζουν τριπλή α-έλικα. Καθεμία από τις αλυσίδες αποτελείται από 1000 περίπου αμινοξέα, με επαναλαμβανόμενη ακολουθία αμινοξέων γλυκίνης (Gly), προλίνης (Pro) και υδροξυπρολίνης (Hyp). Υπάρχουν τουλάχιστον 12 διαφορετικοί τύποι κολλαγόνου, ο καθένας από τους οποίους εμφανίζει διαφορετικό χαρακτηριστικό συνδυασμό αμινοξέων. Το κολλαγόνο τύπου I των οστών παρουσιάζει τεταρτοταγή δομή[1].

Κάθε μόριο κολλαγόνου διατάσσεται παράλληλα με το γειτονικό του για τον σχηματισμό ενός ινιδίου κολλαγόνου. Τα ινίδια οργανώνονται σε δεσμίδες που σχηματίζουν ίνες κολλαγόνου. Η σύνθεση του κολλαγόνου ολοκληρώνεται μέσα στο κύτταρο και η εξέλιξη του μορίου μέσα στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. Τέλος, μετά από σειρά ενζυμικών παρεμβολών, τα μόρια κολλαγόνου σταθεροποιούνται, με τη δημιουργία διασταυρούμενων δεσμών (cross-links) [1].

Το κολλαγόνο παρέχει στο οστό ελαστικότητα και ευκαμψία και κατευθύνει την οργάνωση της θεμέλιας ουσίας. Τα ινίδια κολλαγόνου οργανώνονται κυκλωτερώς στο οστεωνικό οστό. Διατάσσονται σπειροειδώς στα οστικά πετάλια και εμφανίζουν τον ίδιο προσανατολισμό μέσα στο ίδιο πετάλιο, πλην όμως 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[1].

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 – κολλαγόνο. 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 [1].

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 επιμετάλλωση των οστών[1].

1.5 Οστεογένεση

1.5.1 Γενικά

Η οστεογένεση, ή αλλιώς οστεοποίηση είναι η ανάπτυξη των οστών. Η οστεογένεση ξεκινάει από την εμβρυική ζωή και τα οστά προσχηματίζονται από μια ειδική μορφή συνδετικού ιστού και αποτελούν τον υμενώδη σκελετό [2,6,11].

Οι δύο διεργασίες οστεοποίησης που παρατηρούνται είναι η ενδομεμβρανώδης οστεοποίηση και η ενδοχόνδριος οστεοποίηση. Και στις δύο περιπτώσεις ο οστίτης ιστός που εμφανίζεται αρχικά είναι πρωτογενής και προσωρινός. Στη συνέχεια, αντικαθίσταται από τον οριστικό, δοκιδώδη τύπο οστού, τον δευτερογενή. Ανεξάρτητα από τον μηχανισμό που προηγείται, το οστό που προκύπτει είναι πανομοιότυπο και στις δύο περιπτώσεις[2,6,11].

1.5.2 Ενδομεμβρανώδης οστεογένεση

Τα μεμβρανώδη οστά, όπως τα πλατιά οστά του κρανίου, αναπτύσσονται με ενδομεμβρανώδη οστεοποίηση[6]. Η διαδικασία ξεκινά με εμφάνιση στη περιοχή ανάπτυξης του οστού μιας πύκνωσης στο μεσεγγυματικό ιστό, πλούσια σε μεσεγγυματικά κύτταρα[6,11]. Το μεσέγγυμα, είναι εμβρυικός συνδετικός ιστός, από τον οποίο προέρχονται σχεδόν όλα τα είδη των κυττάρων του συνδετικού ιστού[10]. Το εμβρυικό μεσέγγυμα μεταβάλλεται σε συνδετικό ιστό και τα μεσεγγυματικά κύτταρα εγκλωβίζονται σε ζελατινώδη εξωκυττάριο ουσία που περιέχει ίνες κολλαγόνου[6]. Τα μεσεγγυματικά κύτταρα διαφοροποιούνται τελικά σε οστεοβλάστες και ξεκινά η σύνθεση και η έκκριση συστατικών της οστικής θεμέλιας ουσίας[6,11]. Μέσω αυτής της διαδικασίας αρχίζει η δημιουργία του σπογγώδους οστίτη ιστού ή, αλλιώς, πρωτογενούς σπογγώδη οστίτη ιστού[6].

Στη συνέχεια αρχίζει η ασβεστοποίηση (επασβέστωση) της οστικής θεμέλιας ουσίας, γεγονός που σηματοδοτεί δύο σημαντικά γεγονότα: τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών σε οστεοκύτταρα και τη μερική σύγκλιση των περιαγγειακών διαύλων. Τα

τελευταία, μαζί με τα μεσεγγυματικά κύτταρα που διαφοροποιούνται σε αιμοποιητικά, σχηματίζουν το αιμοποιητικό μυελό των οστών[6].

Τέλος, οι τελευταίες διαδικασίες ανάπτυξης συμπεριλαμβάνουν τη μετατροπή του δικτυωτού οστού σε πεταλιώδες, όπου οι ίνες κολλαγόνου διατάσσονται σε κανονικές δεσμίδες και τα πετάλια σχηματίζουν το σύστημα Havers. Επίσης, συμπυκνώνεται η εξωτερική και εσωτερική στιβάδα συνδετικού ιστού για να σχηματιστεί το περίοστεο και ενδόστεο αντίστοιχα, τα οποία περιέχουν ατρακτοειδή κύτταρα με δυναμικό οστεοπρογονικού κυττάρου[6].

1.5.3 Ενδοχόνδρια οστεογένεση

Στην ενδοχόνδρια οστεοποίηση, τα προπλάσματα του χόνδρινου σκελετού αντικαθίστανται από οστό. Η διαφορά από την ενδομεμβρανώδη οστεοποίηση είναι ότι τα προπλάσματα του σκελετικού *μεσεγγύματος* αντικαθίστανται από οστό χωρίς το χόνδρινο στάδιο. Συνήθως, τα οστά των άκρων, η σπονδυλική στήλη και η πύελος (λεκάνη) προέρχονται από ενδοχόνδρια οστεοποίηση[1,6]. Όπως και στην ενδομεμβρανώδη οστεοποίηση, εναρκτήριο γεγονός της ιστογένεσης είναι ο πολλαπλασιασμός και η συγκέντρωση μεσεγγυματικών κυττάρων, με τη διαφορά ότι τα κύτταρα αυτά εξελίσσονται σε χονδροβλάστες και χονδροκύτταρα, τα οποία εναποθέτουν εξωκυττάρια θεμέλια ουσία που περιέχει κολλαγόνο τύπου II.[6,11]. Τα χονδροκύτταρα υπερτρέφονται και συνθέτουν αλκαλική φωσφατάση, επάγοντας την ασβεστοποίηση της οστικής θεμέλιας ουσίας[1]. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της διάχυσης θρεπτικών ουσιών και τελικά τον θάνατο των χονδροκυττάρων (απόπτωση)[6,11]. Τα κενά που δημιουργούνται από τον θάνατο των χονδροκυττάρων συνενώνονται, δημιουργώντας μια συνεχώς αυξανόμενη κοιλότητα[11].

Στη συνέχεια, η αλληλουχία διεργασιών καθορίζει τα στάδια της ενδοχόνδριας οστεοποίησης. Αιμοφόρα αγγεία διεισδύουν στις κοιλότητες που άφησαν τα χονδροκύτταρα, διακλαδίζονται και προεκτείνονται με κατεύθυνση τα άκρα του πυρήνα οστεοποίησης. Οστεοπρογονικά κύτταρα προσεγγίζουν τον πυρήνα του ασβεστοποιημένου χόνδρου, μέσω του περιαγγειακού συνδετικού ιστού που περιλαμβάνει αιμοφόρα αγγεία.

Ακολούθως, τα οστεοπρογονικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες, οι οποίοι συσσωρεύονται στην επιφάνεια του ασβεστοποιημένου χόνδρου και αρχίζουν να εναποθέτουν οστική θεμέλια ουσία[6].

1.5.4 Αναδόμηση των οστών

Η οστική αναδόμηση αποτελεί την αντικατάσταση παλαιού οστού από καινούριο, διεργασία που εξασφαλίζει τη σταθερότητα των οστών σε όλη τη διάρκεια της ζωής μας[6]. Κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας και στην αρχή της ενηλικίωσης, το οστό 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 ετών όπου αποκτά την μέγιστη τιμή της και ορίζει τη Μέγιστη Μάζα Οστών ή μέγιστη οστική πυκνότητα και δύναμη. Όσο μεγαλύτερη είναι η μέγιστη μάζα των οστών, τόσο χαμηλότερος είναι ο κίνδυνος της οστεοπόρωσης. Το παλαιό οστό απομακρύνεται (απορρόφηση), ενώ συγχρόνως δημιουργείται (σχηματισμός) νέο οστό. Η οστική μάζα παραμένει σταθερή για μερικά χρόνια (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 χρόνια πριν από την εμμηνόπαυση και γίνεται όλο και περισσότερο σημαντική μέχρι τον θάνατο.[1].

Κύκλος της οστικής αναμόρφωσης

Δύο κύριοι τύποι κυττάρων είναι αρμόδιοι για την ανανέωση των οστών: οι οστεοβλάστες, που συμμετέχουν στον σχηματισμό των οστών και οι οστεοκλάστες, που συμμετέχουν στην απορρόφηση τους[1,6]. Υπάρχουν δύο είδη οστικής αναδόμησης, η φλοιώδης και η δοκιδώδης. Η φλοιώδης οστική αναδόμηση συμπεριλαμβάνει την απορρόφηση ενός παλιού συστήματος Havers στο εσωτερικό ενός οστέωνα και την οργάνωση ενός καινούριου, ενώ η δοκιδώδης οστική αναμόρφωση πραγματοποιείται στην επιφάνεια μιας οστικής δοκίδας με παρόμοιο μηχανισμό. Ο γενικός μηχανισμός συμπεριλαμβάνει τέσσερα στάδια [1,6,10]:

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 θεμέλια ουσία[1,6,10].

II. Απορρόφηση

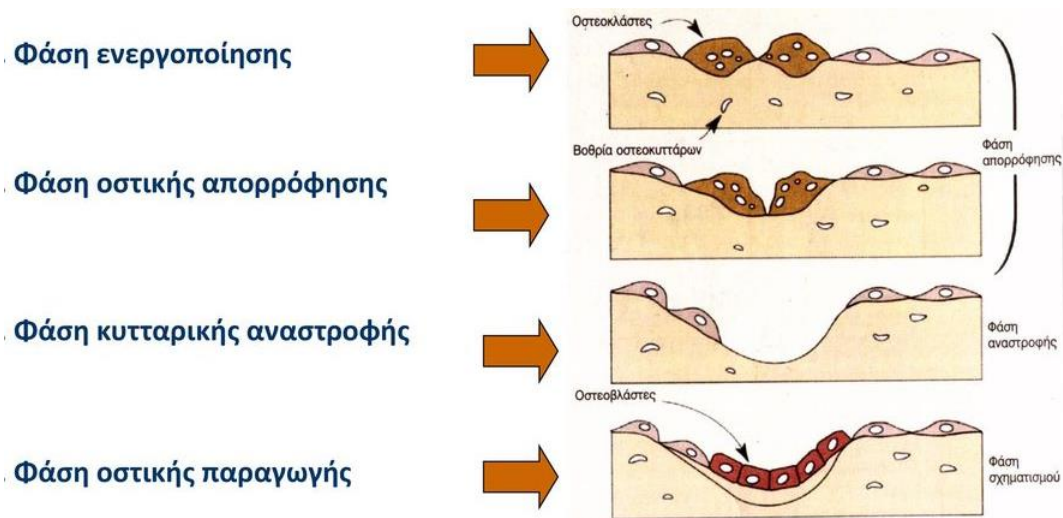
Στην απορρόφηση των οστέων συμμετέχουν οι οστεοκλάστες από τα κανάλια Haversian, οι οποίοι διαβρώνουν τα πεταλώδη μέρη, οδηγώντας έτσι στο σχηματισμό κοιλοτήτων απορρόφησης. Αυτές μπορούν να συνδεθούν με κοιλότητες απορρόφησης από παρακείμενους οστέωνες[1,6,10].

III. Αντιστροφή

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 [1,6,10].

IV. Σχηματισμός

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 ταχύτατα κατά τη διάρκεια των πρώτων ημερών, φτάνοντας στο 75% της τελικής περιεκτικότητας σε ανόργανα συστατικά[1,6].



Εικόνα 1.4: Δίνεται σχηματικά ο κύκλος της οστικής αναδόμησης[12].

Ο σχηματισμός και η απορρόφηση των οστών επηρεάζεται 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 οστό. Τα επίπεδα ασβεστίου στο εξωκυττάριο υγρό του σώματος είναι πολύ καλά ρυθμισμένα. Οι πιο σημαντικές ορμόνες υπεύθυνες για την ομοιόσταση του ασβεστίου είναι [1,6]:

- Παραθυροειδής ορμόνη (PTH)
- Βιταμίνη D₃
- Καλσιτονίνη

Πολλές παθολογικές καταστάσεις μπορούν να επηρεάσουν τον σκελετό, επιδρώντας στη μεσολαβούμενη κυτταρική οστική αναδόμηση, διαταράσσοντας την επασβέσωση της οστικής θεμέλιας ουσίας και της αναλογίας των παραπάνω ουσιών[1,6]. Η βιταμίνη D και η PTH είναι οι κύριες ορμόνες που επηρεάζουν την ομοιόσταση του ασβεστίου του οργανισμού. 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. Η έλλειψη Βιταμίνης D3 μπορεί να οδηγήσει σε λάθος ασβεστοποίηση του οστίτη ιστού, ενώ περίσσεια της συνεπάγεται απώλεια οστού. Ο κύριος ρόλος της βιταμίνης D είναι η επασβέστωση (μεταλλοποίηση, mineralization) των οστών και η ρύθμιση της εντερικής απορρόφησης του ασβεστίου[13].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΤΩΝ ΜΕΛΕΤΟΥΜΕΝΩΝ ΟΣΤΩΝ

2.1 Οστεοπόρωση

2.1.1 Ορισμός

Οστεοπόρωση καλείται η ελάττωση της οστικής μάζας. Η φυσιολογική αποδόμηση του οστού δεν ακολουθείται από αντίστοιχη οστεογένεση, με αποτέλεσμα την ελάττωση της οστικής μάζας[1].

Η οστεοπόρωση ορίζεται ως συστηματική σκελετική νόσος, που χαρακτηρίζεται από χαμηλή οστική μάζα και διαταραχή της μακροαρχιτεκτονικής του οστίτη ιστού, η οποία συνεπάγεται αυξημένη ευθραυστότητα του οστού και τάση για κατάγματα[14].

Τις περισσότερες φορές τα κατάγματα αναδεικνύουν την επικράτηση της οστεοπόρωσης. Σε κυτταρικό επίπεδο, είναι το αποτέλεσμα διαταραχής της ισορροπίας μεταξύ οστικής απορρόφησης και οστικής σύνθεσης με υπεροχή της οστικής απορρόφησης, που, είτε λόγω αυξημένης παραγωγής οστεοκλαστών είτε λόγω ανεπαρκούς παραγωγής οστεοβλαστών, έχει ως συνέπεια τη σταδιακή απώλεια της οστικής μάζας. Οι ορμόνες του φύλου ασκούν την αντιοστεοπορωτική τους δράση, τουλάχιστον εν μέρει, ρυθμίζοντας την ανάπτυξη των οστικών κυττάρων στο μυελό των οστών και ίσως τον ρυθμό του κυτταρικού θανάτου τους[14].

Υπάρχουν διάφορα αίτια που προκαλούν την οστεοπόρωση αν και δεν υπάρχει ομοφωνία για τον ακριβή μηχανισμό της νόσου. Η δημιουργία οστικής μάζας σε κάθε άτομο επηρεάζεται από γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η μέγιστη τιμή της οστικής μάζας μετριέται όταν ο άνθρωπος είναι 24 ετών. Η τιμή αυτή έχει πολύ μεγάλη σημασία για τη μελλοντική κλινική εκδήλωση της πάθησης, αφού άτομα με υψηλή τιμή μέγιστης οστικής μάζας έχουν μικρότερες πιθανότητες να νοσήσουν με οστεοπόρωση στο μέλλον[1].

Η βαθμιαία απώλεια οστικής μάζας αρχίζει περίπου από την ηλικία των 50 ετών και για τα δύο φύλα. Μία στις τρεις γυναίκες και ένας στους πέντε άντρες, άνω των 50 ετών, θα

υποστεί κάποιο οστεοπορωτικό κάταγμα κατά τη διάρκεια της ζωής του. Στις γυναίκες όμως, ο βαθμός απώλειας είναι πολύ μεγαλύτερος και ιδιαίτερα στα 10-15 χρόνια της εμμηνόπαυσης[14]. Μέχρι τη γεροντική ηλικία, οι γυναίκες χάνουν το 50% της οστικής τους μάζας ενώ οι άντρες το 35%[15].

2.1.2 Κλινικοί Τύποι Οστεοπόρωσης

I. Οστεοπόρωση τύπου I (μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση)

Εκδηλώνεται στο 30-35% των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών της λευκής κυρίως φυλής, στα πρώτα 15 χρόνια μετά την εμμηνόπαυση. Επηρεάζονται κυρίως τα σπογγώδη οστά, με ρυθμό απώλειας οστικής μάζας της τάξης του 3-10%[13].

Η κύρια αιτία της οστεοπόρωσης τύπου I είναι η οιστρογονική ανεπάρκεια, που εκδηλώνεται με την εμμηνόπαυση. Μέχρι σήμερα έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη οιστρογονικών υποδοχέων σε οστεοβλάστες και όχι οστεοκλάστες. Τα οιστρογόνα επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των οστεοβλαστών μέσω αυτών των υποδοχέων, ελέγχοντας ταυτόχρονα την παραγωγή αυξητικών παραγόντων, κυτοκινών, όπως επίσης και τα επίπεδα της καλσιτονίνης, η οποία έχει αντιοστεοκλαστική δράση[13].

II. Οστεοπόρωση τύπου II (γεροντική οστεοπόρωση)

Προσβάλλει άτομα και των δύο φύλων, συνήθως μετά το 70ό τους έτος, με αναλογία 3 γυναικών προς 1 άνδρα. Προσβάλλονται κατά κύριο λόγο τα φλοιώδη οστά του περιφερικού σκελετού αλλά και τα σπογγώδη με αργό και σταθερό ρυθμό.

Στη γεροντική οστεοπόρωση οι οστεοκλάστες αποδομούν φυσιολογική ποσότητα οστού, ενώ οι οστεοβλάστες δεν λειτουργούν επαρκώς και παράγουν μειωμένη οστική μάζα. Η κύρια αιτία είναι η ελλιπής απορρόφηση του ασβεστίου από το έντερο και συνήθως συνοδεύεται από δευτεροπαθή υπερπαραθυρεοειδισμό, χωρίς ο μηχανισμός αυτός να είναι επαρκώς αποδεδειγμένος[13]

2.2 Σακχαρώδης διαβήτης

2.2.1 Ορισμός και περιγραφή

Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ) είναι μεταβολική ασθένεια, που χαρακτηρίζεται από υπεργλυκαιμία ως συνέπεια διαταραχών στην έκκριση ή τη δράση της ινσουλίνης. Η ινσουλίνη είναι ορμόνη που παράγεται σε ειδική μοίρα του παγκρέατος, τα Β-κύτταρα. Η χρόνια υπεργλυκαιμία των ασθενών με ΣΔ σχετίζεται με βλάβες, δυσλειτουργίες ή ανεπάρκειες οργάνων, συνήθως των ματιών, της καρδιάς, των νεύρων των νεφρών και των αγγείων[16].

Η εμφάνιση του ΣΔ συχνά οφείλεται σε γενετικούς παράγοντες, χωρίς να αποκλείονται και οι διατροφικοί ή περιβαλλοντικοί παράγοντες. Καταστάσεις όπως το στρες, λοιμώξεις που κινητοποιούν την καταστροφή των β-κυττάρων στο πάγκρεας, μπορούν να συμβάλουν στην κλινική εκδήλωση των συμπτωμάτων του ΣΔ. Η διάγνωση της νόσου, γίνεται με τη μέτρηση της γλυκόζης νήστεως στο αίμα, με όρια άνω των 7 mmol/dL ή 126 mg/dL σε δυο διαδοχικές πρωινές μετρήσεις[17].

Το 2013, σύμφωνα με τα δεδομένα του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ), ο ΣΔ ήταν ένα πολύ συχνό φαινόμενο το οποίο οι επιστήμονες προέβλεψαν ότι θα λάμβανε μορφή «επιδημίας» στην ερχόμενη δεκαετία[17]. Τα λεγόμενά τους επιβεβαιώθηκαν, αφού έρευνες αποδεικνύουν μια αύξηση διαγνωσμένων και μη διαγνωσμένων ασθενών ΣΔ της τάξης του 22% στην Αμερική[18].

Ο ΣΔ ταξινομείται συνήθως σε δύο μεγάλες κατηγορίες: Τύπου I και Τύπου II. Αίτια για την ανάπτυξη διαβήτη μπορεί να είναι τα κάτωθι [19]:

- Γενετικές ανωμαλίες των β-κυττάρων.
- Γενετικές ανωμαλίες στη δράση της ινσουλίνης.
- Ενδοκρinoπάθειες.
- Φάρμακα και χημικές ουσίες.
- Φλεγμονές.
- Ασυνήθεις μορφές ανοσολογικά προκαλούμενου Σ.Δ.
- Γενετικά σύνδρομα.
- Διαβήτη της κύησης.

2.2.2 Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου I

Ο ΣΔ τύπου I ή αλλιώς ινσουλινοεξαρτώμενος ΣΔ εμφανίζεται κυρίως σε παιδιά και νέους ενήλικες, μπορεί όμως να εμφανισθεί σε όλες τις ηλικίες. Η επίπτωση του ινσουλινοεξαρτώμενου ΣΔ αυξάνει κατά την παιδική ηλικία έως την εφηβεία και σταθεροποιείται περίπου στην ηλικία των 20 ετών. Η μεγαλύτερη γενετικά ευαισθησία συνδέεται με το αντιγόνο HLA που σχετίζεται με το χρωμόσωμα 6[17].

Ο ΣΔ τύπου I, είναι μία διαταραχή που οφείλεται στην καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος, κυρίως, λόγω παραγωγής αυτοαντισωμάτων. Αυτή η μορφή ΣΔ τύπου I, ονομάζεται *αυτοάνοσος ΣΔ*[16]. Δείκτες αυτοανοσίας που μπορούν να ελεγχθούν για διαπίστωση της ύπαρξης της νόσου είναι τα αντινησιδιακά και αντιινσουλινικά αντισώματα, τα εναντίον της αποκαρβοξυλάσης του γλουταμινικού οξέος και τα αυτοαντισώματα στις φωσφατάσες της τυροσίνης IA-2 και IA-2β[19].

Τέλος, στο ΣΔ τύπου I ανήκει και ο *ιδιοπαθής ΣΔ*, οποίος δεν δίνει ενδείξεις αυτοανοσίας αλλά ισχυρής κληρονομικής προδιάθεσης[19]. Αποτελεί μειονότητα των περιστατικών ΣΔ τύπου I και συνήθως οι ασθενείς είναι Ασιατικής ή Αφρικανικής καταγωγής. Στον ιδιοπαθή ΣΔ, η ινσουλινοθεραπεία είναι απαραίτητη[16].

2.2.3 Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου II

Ο ΣΔ τύπου II, ή μη ινσουλινοεξαρτώμενος ΣΔ, αποτελεί αίτιο υπεργλυκαιμίας στο 80-90% περίπου των ασθενών με ΣΔ. Σε αυτή την περίπτωση, ο ΣΔ των ενηλίκων, όπως ονομάζεται, χαρακτηρίζεται από αύξηση της γλυκόζης του αίματος σε έδαφος ινσουλινοαντοχής και σχετικής ινσουλινοανεπάρκειας. Αυτό σημαίνει ότι υπάρχει αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης που μπορεί να συνοδεύεται από σχετική ανεπαρκή έκκριση της ινσουλίνης[16]. Με άλλα λόγια, το πάγκρεας εκκρίνει ινσουλίνη αλλά σε ελλιπή ποσότητα από τα β-κύτταρα[20].

Ο ΣΔ τύπου II εμφανίζεται κυρίως σε ενήλικες και γι' αυτό η παλαιότερη ονομασία του ήταν «διαβήτης των ενηλίκων», συνοδεύεται δε, τις πλείστες φορές, από παχυσαρκία. Η θεραπεία του δεν απαιτεί συνήθως ινσουλίνη και λόγω της ήπιας συμπτωματολογίας του

πολλές φορές μένει για πολλά χρόνια αδιάγνωστος. Αν συμβεί κάτι τέτοιο υπάρχει μεγάλος κίνδυνος αγγειακών βλαβών, αφού συμπεριλαμβάνεται στους κύριους παράγοντες κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων και μικροαγγειακών επιπλοκών[19].

Παράλληλα, υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του ΣΔ τύπου II και της οστεοπόρωσης η οποία παραμένει αμφιλεγόμενη. Αν και οι μεταβολικές ανωμαλίες του διαβήτη επηρεάζουν σημαντικά την οστική αναμόρφωση, τη δομή και την οστική πυκνότητα, η βαρύτητα συμμετοχής του ΣΔ τύπου II στην αύξηση του κινδύνου κατάγματος παραμένει υπό συζήτηση[21].

Ασθενείς με ΣΔ, τυπικά εμφανίζουν χαμηλό κύκλο οστικής εναλλαγής με ελάττωση του οστικού σχηματισμού και, σε μικρότερο βαθμό, της οστικής απορρόφησης. Ο μηχανισμός του μειωμένου κύκλου οστικής εναλλαγής είναι πιθανώς πολυπαραγοντικός. Τόσο στον ΣΔ τύπου I όσο και στον ΣΔ τύπου II, η συσσώρευση των τελικών προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (AGE) στο κολλαγόνο ως αποτέλεσμα της υπεργλυκαιμίας μπορεί να συνεισφέρει στη μείωση του οστικού σχηματισμού [21].

Ο κίνδυνος κατάγματος είναι αυξημένος σε αμφότερες τις ομάδες, σχετιζόμενος πιθανόν με παράγοντες πέραν της οστικής πυκνότητας, όπως η διάρκεια του διαβήτη, οι διαβητικές επιπλοκές, η οστική ποιότητα, η θεραπεία και ο κίνδυνος των πτώσεων[21].

Λόγω έλλειψης επιστημονικών δεδομένων όσον αφορά την οστεοπόρωση σε άτομα με διαβήτη, τα ερωτήματα είναι περισσότερα από τις απαντήσεις. Τα ασταθή στοιχεία των μετρήσεων δείχνουν ότι ο διαβήτης και η οστική ευθραυστότητα βρίσκονται σε τροχιά σύγκρουσης [21].

2.3 Κατάγματα

2.3.1 Ορισμός και ταξινόμηση

Ως κάταγμα μπορεί να ορισθεί η πλήρης ή μερική λύση της συνέχειας ενός οστού[22,23]. Όταν ένας ιστός υποστεί τραυματισμό, αρχίζει αμέσως μια διαδικασία επισκευής, η οποία ονομάζεται επούλωση και ολοκληρώνεται με τον σχηματισμό ουλής. Όταν, όμως, υπάρχει κάταγμα, η διαδικασία της επισκευής δεν οδηγεί στη δημιουργία ουλής αλλά στην εκ νέου δημιουργία οστίτη ιστού, δηλαδή σε μια οστική αναδόμηση.

Οι ορθοπεδικές κακώσεις είναι οι συχνότερες κακώσεις σε τραυματισμούς. Το 60% αυτών οφείλονται σε τροχαία ατυχήματα, το 30% σε πτώσεις ενώ το υπόλοιπο 10% σε αθλητικές κακώσεις. Οι ορθοπεδικές κακώσεις μπορεί να είναι απλές αλλά και πολύ βαριές, ειδικά εάν περιλαμβάνονται κατάγματα μακρών οστών και κατάγματα λεκάνης[22].

Ταξινομούνται:

Ανάλογα με την ένταση της βίας που τα προκάλεσε και την ποιότητα του οστού, σε:

- Βίαια (από καταπόνηση).
- Παθολογικά.

Ανάλογα με την κλινική εικόνα σε:

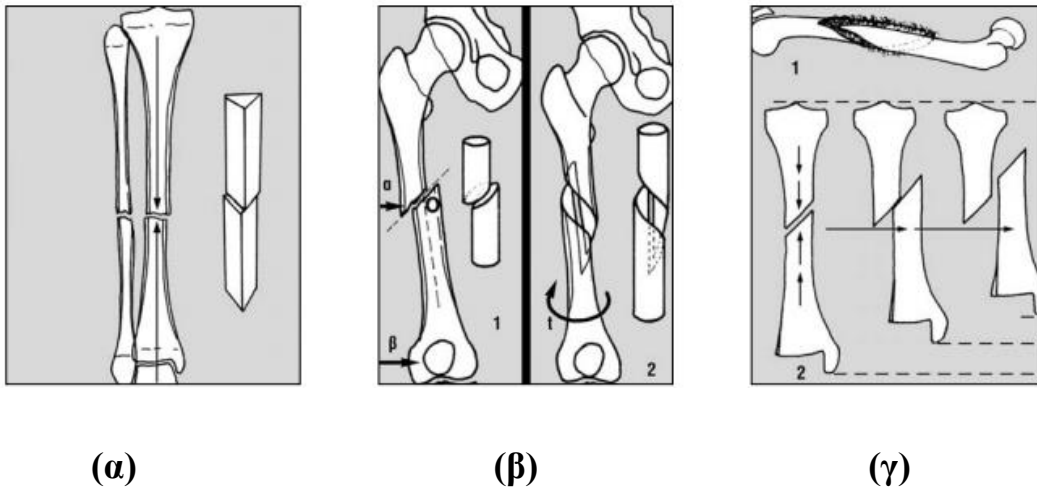
- Ανοικτά: ονομάζονται τα κατάγματα που συνοδεύονται από τραύμα το οποίο επικοινωνεί με το εξωτερικό περιβάλλον.
- Κλειστά: ονομάζονται τα κατάγματα, στα οποία δεν υπάρχει τραύμα του δέρματος, ή αν υπάρχει αυτό είναι επιφανειακό και δεν επικοινωνεί με το οστό.

Ανάλογα με τον μηχανισμό σε:

- Άμεσα: το κάταγμα έγινε στο σημείο δράσης της επιβαλλόμενης δύναμης
- Έμμεσα: το κάταγμα έγινε μακριά από τη θέση εφαρμοζόμενης βίας.

Ανάλογα με τη φορά της γραμμής του κατάγματος σε σχέση προς τον άξονα του οστού, σε:

- **Εγκάρσια:** καλούνται τα κατάγματα στα οποία η τομή του κατάγματος, δηλαδή το σημείο όπου σπάει ή ραγίζει το οστό, σχηματίζει ορθή γωνία με τον κατά μήκος άξονα του οστού.
- **Λοξά:** καλούνται τα κατάγματα στα οποία η τομή του κατάγματος σχηματίζει γωνία μικρότερη από 90° με τον κατά μήκος άξονα του οστού.
- **Σπειροειδή:** καλούνται τα κατάγματα στα οποία, η τομή που αναπτύσσεται στο κάταγμα ελίσσεται σπειροειδώς γύρω από το οστό[23].



Εικόνα 2.1: Ταξινόμηση καταγμάτων ανάλογα με τη φορά της τομής του κατάγματος σε σχέση προς τον άξονα του οστού: α) εγκάρσιο κάταγμα· β) λοξό κάταγμα και γ) σπειροειδές κάταγμα[23].

Άλλες ταξινομήσεις συμπεριλαμβάνουν:

- **Ενσφηνωμένα:** όταν το ένα τμήμα με τη μικρότερη διάμετρο μπαίνει μέσα στο άλλο με τη μεγαλύτερη διάμετρο.
- **Αποσπαστικά:** Συμβαίνουν στα σημεία πρόσφυσης των μυών ύστερα από βίαιη σύσπαση τους.

- Συντριπτικά: Παρουσιάζουν στο επίπεδο του κατάγματος περισσότερα από τρία οστικά τμήματα.
- Διπλά ή διπολικά: Όταν στο ίδιο οστό υπάρχουν δύο λύσεις που απέχουν όμως μεταξύ τους.
- Συμπιεστικά: Συμβαίνουν σε σπογγώδη οστά και οφείλονται σε καθίζηση των δοκίδων τους.
- Κάταγμα-εξάρθρωση: Όταν μαζί με την εξάρθρωση υπάρχει και κάταγμα στο ένα από τα δύο οστά που αποτελούν την άρθρωση.
- Κάκωση από βία υψηλής έντασης: στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα κατάγματα, κατά κανόνα συντριπτικά, που συνοδεύονται από εκτεταμένη καταστροφή μαλακών μορίων[23].

2.3.2 Οστεοσύνθεση

Η οστεοσύνθεση, είναι η συγκράτηση του άξονα του οστού με τη χρήση υλικών για καλύτερη αναδόμηση τις περιοχής του σκελετικού συστήματος που υπέστη τη βλάβη. Τα υλικά που χρησιμοποιούνται μπορεί να έχουν τη μορφή ενδομυελικών καρφιών, πλακών και κοχλιωτών καρφιών στην επιφάνεια του οστού (*εσωτερική οστεοσύνθεση*) ή συγκρατούν περιφερειακά και κεντρικά το κάταγμα (*εξωτερική οστεοσύνθεση*) [24]. Τα υλικά που χρησιμοποιούνται πρόσδεσης των οστών για να επιτευχθεί η οστεοσύνθεση μπορεί να είναι[25]:

I. Κράματα χρωμίου-κοβαλτίου

Λόγω της χημικής αδράνειας της επιφάνειας και του βάθους του κράματος, μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο ανθρώπινο σώμα χωρίς παρενέργειες. Παρ' όλα αυτά, λόγω σκληρότητας θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η ευκολότερη κόπωση και θραύση ενός τέτοιου κράματος.

II. Ανοξειδωτος χάλυβας

Σε αντίθεση με το κράμα χρωμίου-κοβαλτίου, η βιολογική ανοχή του ανοξειδωτου χάλυβα αφορά μόνο την επιφάνειά του και έτσι χρειάζεται συνεχής ανανέωση αυτής κατά τη χρήση. Από την άλλη, είναι εύκολη η μηχανουργική επεξεργασία του, έχει μεγάλη ελαστικότητα, άρα μικρότερες πιθανότητες θραύσης, και χαμηλό κόστος.

III. Τιτάνιο

Έχει άριστη βιολογική ανοχή, μεγάλη αντοχή και άριστες μηχανικές ικανότητες. Όμως, έχει υψηλό κόστος παραγωγής, κάτι που το καθιστά απλησίαστο για ασθενείς χαμηλότερης οικονομικής τάξης. Τα υλικά οστεοσύνθεσης πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο μία φορά. Μετά την αφαίρεσή τους θα πρέπει να καταστρέφονται, γιατί ο τραυματισμός της επιφάνειάς τους και η μη ελεγχόμενη κόπωσή τους τα καθιστά ακατάλληλα για επαναχρησιμοποίηση.

IV. Βιοαπορροφήσιμα υλικά

Τα βιοαπορροφήσιμα υλικά, είναι υλικά τα οποία είτε απορροφώνται από τον οργανισμό μετά το πέρας της αποκατάστασης είτε αποβάλλονται σταδιακά. Συνήθως είναι ενώσεις του πολυγλυκολικού οξέος (RGA), πολυδιοξανόνης (PDS) ακόμη και μεταλλικών, όπως κράματα μαγνησίου-λιθίου. Με τη χρήση αυτών των υλικών, ο ασθενής υποβάλλεται σε νέα χειρουργική επέμβαση για αφαίρεση του στηρικτικού υλικού, μειώνοντας τις φλεγμονές και το οξειδωτικό στρες [26,27].

2.4 Καρκίνος παχέος εντέρου

Καρκίνος ονομάζεται η αφύσικη κυτταρική ανάπτυξη σε ένα μέρος του οργανισμού, όπου τα κύτταρα δεν ακολουθούν τη φυσιολογική διαδικασία της απόπτωσης, με αποτέλεσμα να πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα. Τα καρκινώματα του παχέος εντέρου αρχικά εμφανίζονται με τη μορφή πολύποδα και αν δεν ανιχνευθούν έγκαιρα μπορεί να εξελιχθούν σε καρκίνο. Τα κύτταρα αυτά μπορούν να μεταφερθούν μέσω του κυκλοφορικού ή του λεμφικού συστήματος σε άλλα σημεία του σώματος, δημιουργώντας όγκους που ονομάζονται μεταστάσεις[27].

Ο καρκίνος του παχέος εντέρου είναι το δεύτερο κακοήθες νεόπλασμα όσον αφορά τον αριθμό των θανάτων, μετά τον καρκίνο του πνεύμονα στους άντρες και τον καρκίνο του μαστού στις γυναίκες. Ο καρκίνος του παχέος εντέρου προσβάλλει όλες τις ηλικίες κυρίως μετά τα 40 έτη. Παρά τις διαγνωστικές εξελίξεις η καθυστερημένη διάγνωση βρίσκεται σε υψηλά ποσοστά. Στο 10% του συνόλου των περιπτώσεων ο όγκος δεν μπορεί να αφαιρεθεί χειρουργικά ενώ σε ποσοστό μεγαλύτερο του 20% μπορεί να επιφέρει μεταστάσεις[27].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΥΠΕΡΥΘΡΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ FOURIER ΜΕ ΑΠΟΣΒΕΝΟΥΣΑ ΟΛΙΚΗ ΑΝΑΚΛΑΣΗ (ATR-FTIR)

3.1 Ιστορική αναδρομή

Η υπέρυθρη φασματοσκοπία, ανακαλύφθηκε από τον William Herschel το 1800, όταν μελετούσε τον συσχετισμό της ενέργειας των ορατών ακτινοβολιών με βάση το μήκος κύματος.[1,28,30] Ο Herschel, μετακινώντας ένα θερμόμετρο κατά μήκος του ορατού φάσματος από το μπλε προς το κόκκινο παρατήρησε την αύξηση της θερμοκρασίας. Αφού κατέγραψε το γεγονός, αποφάσισε να καταγράψει τη θερμοκρασία σε περιοχή χαμηλότερη από την ερυθρή όπου δεν υπήρχε ηλιακό φως και ανακάλυψε πως εκεί η περιοχή είχε υψηλότερη θερμοκρασία από οποιαδήποτε άλλη. Ονόμασε αυτήν την περιοχή θερμικές ακτίνες (*calorific rays*) και διαπίστωσε ότι οι ακτίνες μπορούσαν να ανακλαστούν, διαθλαστούν, μεταδοθούν και να απορροφηθούν όπως ακριβώς το ορατό φως. Με αυτά τα δεδομένα, συμπέρανε ότι πρέπει να υπάρχει φως μη ορατό στο ανθρώπινο μάτι πέρα από την ερυθρή περιοχή του φάσματος. Αυτές οι θερμικές ακτίνες αργότερα ονομάστηκαν υπέρυθρες ακτινοβολίες[28].

Τα πειράματα με το υπέρυθρο φως συνεχίστηκαν και οδήγησαν στην κατασκευή του πρώτου φασματοφωτόμετρου υπέρυθρου το 1835. Οι W.deW. Abney και E.P. Festing πρότειναν το 1881 συγκεκριμένες περιοχές του φάσματος που επηρέαζαν χαρακτηριστικούς χημικούς δεσμούς και αναγνωρίστηκε η δυνατότητα εφαρμογής του φασματοφωτόμετρου στην Οργανική Χημεία [30]. Στη συνέχεια, λόγω των πρωτοποριακών εργασιών των Coblentz και Angstrom (1850-1900), διαδόθηκε και καθιερώθηκε ως σημαντικό εργαλείο, κυρίως για την ταυτοποίηση χημικών ενώσεων και στην αστρονομία.

Στο ίδιο χρονικό διάστημα, κατασκευάστηκε ένα νέο 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 ανάκλασης (reflecting microscope) με το φασματοσκόπιο υπερύθρου 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 [30].

Όμως η πραγματική επανάσταση στην υπέρυθη φασματοσκοπία ήταν η ανακάλυψη του υψηλής απόδοσης φασματοφωτόμετρου υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier[31]. Το 1887 ο Πολωνικής καταγωγής φυσικός Albert A. Michelson, στην προσπάθεια να υπολογίσει την ταχύτητα του φωτός με μεγάλη ακρίβεια, χρησιμοποίησε ένα σύστημα κάτοπτρων διαφανών και ημι-διαφανών (semitransparent mirrors or beam splitters/διαχωριστές δέσμης) για να πετύχει τη σύγκλιση των αποκλινουσών ακτινών φωτός που προέρχονταν από την ίδια πηγή. Ο Michelson 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.

3.2 Βασικές αρχές της υπέρυθρης Φασματοσκοπίας

3.2.1 Το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα

Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα ονομάζεται η ευρεία ενέργεια των ακτινοβολιών οι οποίες εκτείνονται από τις κοσμικές ακτίνες με μήκη κύματος από 10^{-9} nm μέχρι τα ραδιοκύματα με μήκη κύματος μεγαλύτερα των 1000 km (Εικόνα 3.1)[30]. Οι ηλεκτρομαγνητικές ακτινοβολίες εκφράζονται είτε με το μήκος κύματος, είτε τη συχνότητα (αντίστροφο του μήκους κύματος), είτε με την ενέργεια.[31] Οι ηλεκτρομαγνητικές ακτινοβολίες συμπεριλαμβάνουν το φάσμα των ακτίνων γ , X, UV που είναι αόρατες, το ορατό φώς και κάτω αυτών την υπέρυθη ακτινοβολία, τα μικροκύματα και ραδιοκύματα. Η φύση όλων των ακτινοβολιών είναι ίδια και όλες κινούνται με την ταχύτητα του φωτός[30].

3.2.2 Υπέρυθρες περιοχές ενδιαφέροντος στην IR φασματοσκοπία

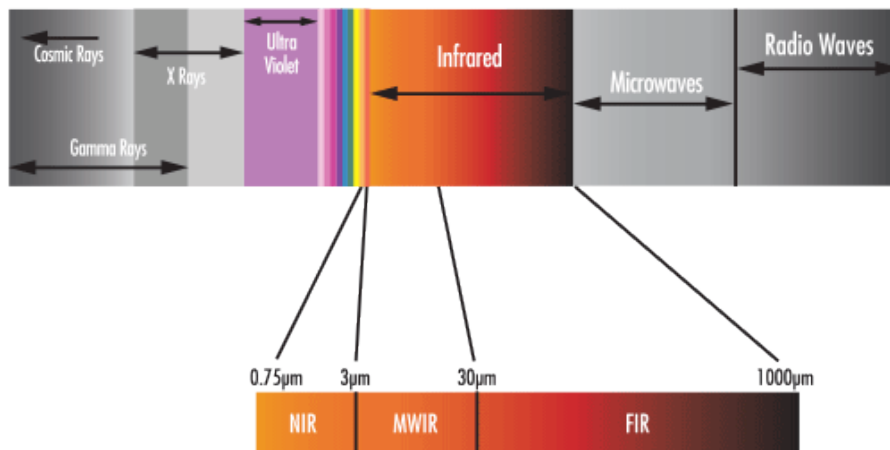
Τα φάσματα απορρόφησης, εκπομπής και ανάκλασης υπέρυθρου των διαφόρων ουσιών μπορούν να ερμηνευθούν αν ληφθούν υπόψη οι ενεργειακές μεταβολές, που προκαλούνται από την αλληλεπίδραση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας με το υλικό. Οι μεταβολές αυτές, είναι αποτέλεσμα μεταπτώσεων των μορίων από μια ενεργειακή κατάσταση δόνησης σε μια άλλη. Στο τμήμα αυτό, χρησιμοποιείται η απορρόφηση των μορίων για να γίνει περιγραφή της φύσης των μεταπτώσεων[31].

Η υπέρυθη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος εκτείνεται από το τέλος του ορατού φάσματος έως την περιοχή των μικροκυμάτων, δηλαδή μεταξύ 0,7 μm έως 300 μm , και διακρίνεται σε τρεις περιοχές[33]:

- Το **εγγύς υπέρυθρο (NIR)**: φάσμα που κυμαίνεται μεταξύ 0,8 μm έως 2,5 μm και αντιστοιχεί στους κυματαριθμούς 14.000-4.000 cm^{-1} . Επιτρέπεται η μελέτη υπερτονικών (overtones) και αρμονικών δονήσεων ή δονήσεων συνδυασμού[33].
- Το **μέσο υπέρυθρο (MIR)**: φάσμα που κυμαίνεται μεταξύ 2,5 μm έως 25 μm και αντιστοιχεί στους κυματαριθμούς 4.000-400 cm^{-1} . Σε αυτό το τμήμα, παρατηρούνται οι

βασικές μεταβολές στη δόνηση των μορίων λόγω απορρόφησης ακτινοβολίας. Αυτή η περιοχή χρησιμοποιείται συνήθως στα φασματομέτρα υπέρυθρου[29,33].

- Το **άπω υπέρυθρο (FIR)**: φάσμα που κυμαίνεται μεταξύ 25 μm έως 300 μm και αντιστοιχεί στους κυματάριθμους $400\text{-}10\text{ cm}^{-1}$. Παρέχει πληροφορίες για τις μοριακές περιστροφές και τις δονήσεις βαρέων ατόμων και κρυσταλλικού πλέγματος (δονήσεις υποκαταστάτη-μετάλλου[33]).



Εικόνα 3.1: Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα. Η Υπέρυθρη περιοχή χωρίζεται σε NIR, MIR(MWIR) και FIR [32].

3.2.3 Αρχές της υπέρυθρης φασματοσκοπίας

Η μέθοδος της υπέρυθρης φασματοσκοπίας βασίζεται στην απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας από τα μόρια μιας ένωσης τα οποία διεγείρονται σε υψηλότερες στάθμες δόνησης ή περιστροφής[33]. Η προέλευση των απορροφήσεων στο IR φάσμα είναι αποτέλεσμα της αλληλοεπίδρασης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με το ηλεκτρικό δίπολο ενός μορίου. Αυτό συμβαίνει σε μόρια όπου αποτελούνται από δύο διαφορετικά άτομα (π.χ. CO, HCl, NO), ενώ ομοδιατομικές ενώσεις είναι ανενεργές (π.χ. O₂, H₂). Περιοδική μεταβολή της διπολικής ροπής, λόγω περιστροφής ή δόνησης, επιτυγχάνεται

μόνο σε ορισμένες συχνότητες και συμβαίνει όταν η προσπίπτουσα ακτινοβολία έχει την ίδια συχνότητα με τη συχνότητα του διπόλου[29].

Το φάσμα απορρόφησης υπερύθρου, αποτελεί θεμελιώδη ιδιότητα κάθε μορίου και χρησιμεύει κυρίως στην ποιοτική ανάλυση και για την απόδοση της μοριακής δομής μιας ένωσης, δρώντας σαν αποτύπωμα. Παρέχουν πληροφορίες για τη φύση των ατόμων στο μόριο αλλά και για τη διάταξή του στον χώρο[33].

Η απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας από τα μόρια αποτυπώνεται στα φάσματα απορρόφησης υπερύθρου με την εμφάνιση κορυφών, οι οποίες καλούνται ταινίες απορρόφησης (absorption bands). Διακρίνονται ανάλογα με την έντασή τους σε ισχυρές (strong), μέτριες (medium) και ασθενείς (weak), και ανάλογα με το εύρος που παρουσιάζουν διακρίνονται σε πλατιές ή ευρείες (broad) και στενές (narrow) [33].

Στη φασματοσκοπία ένα υλικό ακτινοβολείται με φως και μετριέται η ποσότητα που απορροφήθηκε συναρτήσει της ενέργειας του φωτός. Η διαπερατότητα, εκφράζει την απορροφημένη ποσότητα φωτός και εκφράζεται από την εξίσωση (3.1) συνήθως σε %[29].

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (3.1)$$

Όπου:

T= διαπερατότητα.

I= έντασης της εξερχόμενης από το υλικό ακτινοβολίας.

I₀= ένταση προσπίπτουσας ακτινοβολίας.

Πολλές φορές χρησιμοποιείται η απορροφητικότητα, η οποία σύμφωνα με τον νόμο Lambert –Beer είναι[33]:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (3.2)$$

ή

$$A = \log \frac{I_0}{I} = -\log T$$

Όπου:

A= απορροφητικότητα.

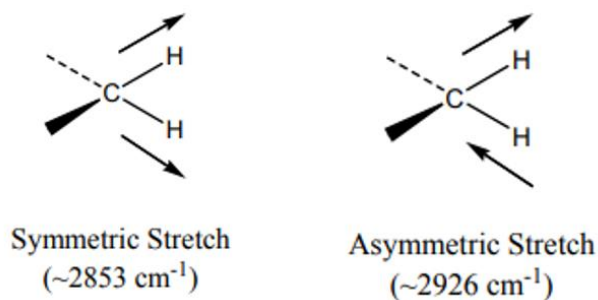
ϵ = συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας όταν η συγκέντρωση εκφράζεται σε mol/lit.
 λ = μήκος διαδρομής της φωτεινής ακτίνας που συμπίπτει με το μήκος της κυψελίδας που περιέχει το δείγμα (cm).
 c = συγκέντρωση του δείγματος.

3.2.4 Δονήσεις

Κατά τη διάρκεια της δόνησης, μεταβάλλεται η διπολική ροπή του μορίου και η ένταση μίας απορρόφησης στο IR φάσμα εξαρτάται κατά κύριο λόγο από αυτήν τη μεταβολή. Η τιμή της διπολικής ροπής ενός μορίου εξαρτάται από την πολικότητα του δεσμού μεταξύ των ατόμων, που σημαίνει ότι όσο μεγαλύτερη είναι η διαφορά των τιμών ηλεκτραρνητικότητας μεταξύ των ατόμων, τόσο πιο έντονη θα είναι και η αντίστοιχη απορρόφηση[33].

Συνήθως στα μόρια παρατηρούνται οι παρακάτω τύποι δονήσεων:

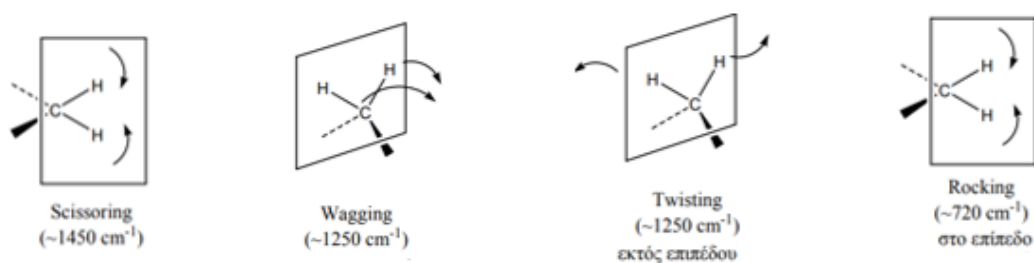
I. Δονήσεις Τάσης: Παράγονται όταν δύο συνδεδεμένα άτομα πάλλονται μεταξύ τους, μεταβάλλοντας την απόσταση ανάμεσά τους. Μπορεί να είναι συμμετρικές ή αντισυμμετρικές δονήσεις.



Εικόνα 3.2: Δονήσεις τάσης [44]

II. Δονήσεις Κάμψης: Η γωνία μεταξύ δύο δεσμών μεταβάλλεται συνεχώς και διακρίνονται σε:

- Δονήσεις ψαλίδισης ή παραμόρφωσης: Δύο άτομα συνδεδεμένα με το ίδιο κεντρικό άτομο κινούνται μπρος και πίσω εντός ενός επιπέδου ισορροπίας.
- Δονήσεις αιώρησης: Μη γραμμική δομική ομάδα τριών ατόμων κινείται μπρος και πίσω εντός ενός επιπέδου ισορροπίας.
- Δονήσεις σεισης: Μη γραμμική δομική ομάδα τριών ατόμων κινείται μπρος και πίσω εκτός του επιπέδου ισορροπίας.
- Δονήσεις συστροφής: Δομική ομάδα τριών ατόμων συστρέφεται γύρω από τον δεσμό σύνδεσης με το υπόλοιπο τμήμα του μορίου εκτός από το επίπεδο ισορροπίας [33].



Εικόνα 3.3: Δονήσεις κάμψης[44]

3.3 Φασματοφωτόμετρα Υπερύθρου

3.3.1 Φασματοφωτόμετρα Υπερύθρου Διασποράς (Dispersive IR Spectrometers)

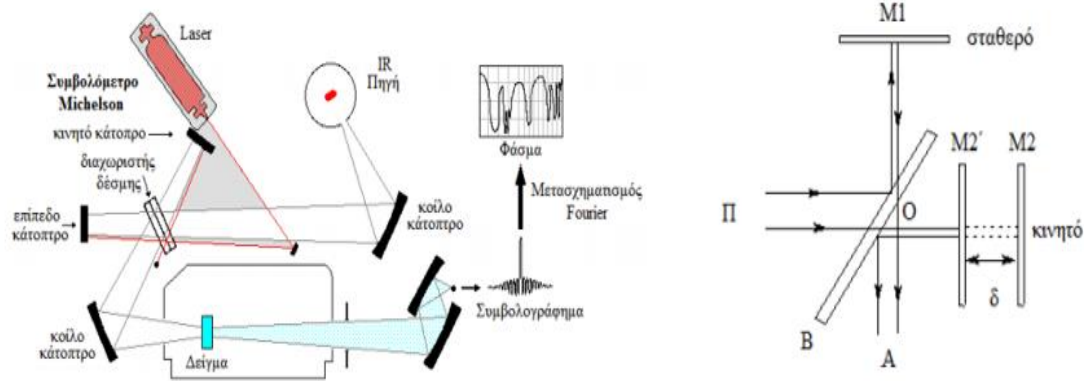
Τα φασματοφωτόμετρα Υπερύθρου Διασποράς ή κλασικά, αποτελούνται από την πηγή της υπέρυθρης ακτινοβολίας, τον χώρο του δείγματος και τον μονοχρωμάτορα, που αναλύει την ακτινοβολία στα μήκη κύματος από τα οποία αποτελείται, και τον ανιχνευτή ακτινοβολίας[29].

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 παλλόμενων κατόπτρων ή διακόπτου (chopper) επιτρέπει την περιοδική διέλευση της δέσμης μέσω του δείγματος και της αναφοράς για να προσπίψει τελικά στον μονοχρωμάτορα. Τέλος η δέσμη διέρχεται από έναν πολλαπλασιαστή και καταλήγει στο καταγραφικό ως κύμανση[29].

3.3.2 Φασματοφωτόμετρα Υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier-Συμβολόμετρο Michelson

Τα φασματοφωτόμετρα Fourier αποτελούνται από την πηγή της υπέρυθρης ακτινοβολίας, το συμβολόμετρο, τον χώρο του δείγματος και τον ανιχνευτή υπέρυθρου. Η πηγή laser χρησιμοποιείται για τη δημιουργία εσωτερικής αναφοράς, τη μέτρηση των κυματάριμων και τη ρύθμιση της διάρκειας των παλμών[29,33].

Η χρήση ενός συμβολόμετρου αντί ενός μονοχρωμάτορα δίνει σημαντικά πλεονεκτήματα στην καταγραφή του IR φάσματος. Το βασικό τμήμα ενός φασματοφωτόμετρου Fourier αποτελεί το συμβολόμετρο Michelson(Εικόνα 3.4). 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 κατόπτρων είναι κάθετα μεταξύ τους. Ανάμεσα στο σταθερό και στο κινούμενο κάτοπτρο υπάρχει ένας διαχωριστής δέσμης 50/50 (beam splitter). [29,33,34].



Εικόνα 3.4: Συμβολόμετρο Michelson[35].

Ο διαχωριστής δέσμης είναι ένα ημιδιαφανές κάτοπτρο, το οποίο αποτελείται από υλικό που δεν απορροφά στην υπέρυθρη περιοχή, με ανακλαστικότητα και διαπερατότητα 50% αντίστοιχα. Η μια δέσμη προσπίπτει στο σταθερό κάτοπτρο ενώ η άλλη στο κινητό και, στη συνέχεια, αφού αντανακλαστούν, επιστρέφουν στον διαχωριστή δέσμης όπου συμβάλλουν. Μετά τη συμβολή ένα τμήμα της ακτινοβολίας οδηγείται στον χώρο του δείγματος, ενώ το υπόλοιπο τμήμα επιστρέφει στην πηγή ακτινοβολίας. Το αποτέλεσμα είναι ότι περίπου το μισό κάθε δέσμης καταλήγει στον ανιχνευτή, παρόλο που διέσχισαν διαφορετικές διαδρομές[29,34,35].

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 [1,30].

Σήμερα, η χρήση του αδάμαντα για την κατασκευή των φακών μειώνει σημαντικά τη διάμετρο της φωτεινής δέσμης που προσπίπτει στο δείγμα και επομένως το να λαμβάνουμε φάσματα σε μικρότερες διαστάσεις δείγματος. Η τεχνολογία των φασματοφωτομέτρων υπέρυθρου με δέσμη προερχόμενη από επιταχυντές συνδυασμένες με μικροσκόπιο (micro synchrotron FTIR) επιτρέπουν την ανάλυση των δειγμάτων τοπολογικά. Η ένταση και η λαμπρότητα της προσπίπτουσας δέσμης ακτινοβολίας, αυξάνει

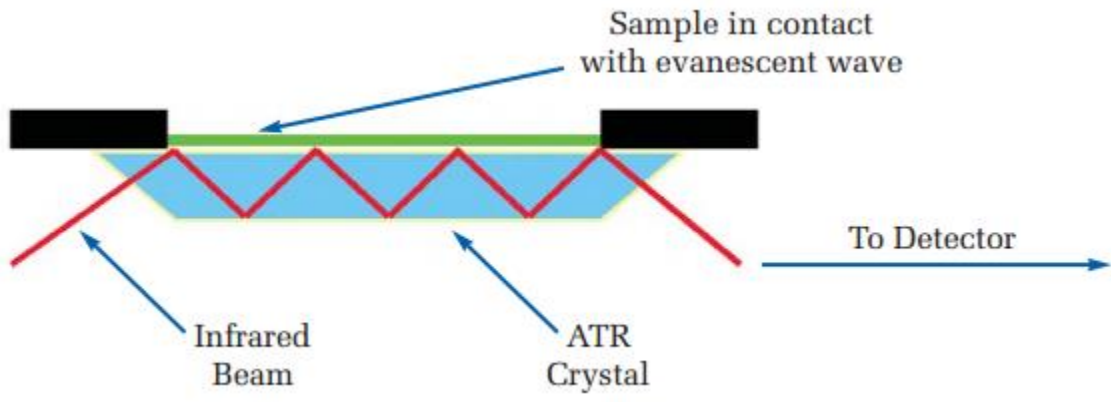
σημαντικά τον λόγο σήμα προς θόρυβο, με αποτέλεσμα τη λεπτομερή ανάλυση για πολύ μικρές ποσότητες δείγματος[35].

3.3.3 Φασματοφωτόμετρο μετασχηματισμού Fourier με Αποσβένουσα Ολική Ανάκλαση (ATR- FTIR)

Οι τεχνικές ανάκλασης IR στην υπέρυθρη φασματοσκοπία χρησιμοποιούνται για την ανάλυση υλικών και δειγμάτων τα οποία είναι δύσκολο να μελετηθούν με τις συμβατικές φασματοσκοπικές μεθόδους διαπερατότητας.[33] Η τεχνική αποσβένουσας ολικής ανάκλασης (Attenuated Total Reflection, ATR της ATR-FTIR), στην περιοχή του μέσου υπέρυθρου, εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό στερεών δειγμάτων, τα οποία είναι δύσκολα στον χειρισμό τους και δεν μπορούν να εξετασθούν με τις συμβατικές τεχνικές προετοιμασίας στερεών δειγμάτων στο IR.[55]

Στα ATR εξαρτήματα χρησιμοποιείται ως στοιχείο εσωτερικής ανάκλασης (internal reflection element, IRE) ένας διαφανής κρύσταλλος στην υπέρυθρη ακτινοβολία με υψηλό δείκτη διάθλασης πάνω στον οποίο τοποθετείται το δείγμα.[33] Η υπέρυθρη ακτινοβολία διαπερνά το δείγμα με γωνία 45° και υφίσταται πολλαπλές ανακλάσεις στη διεπιφάνεια μεταξύ ενός κρυστάλλου με υψηλό δείκτη διάθλασης (πχ ZnSe, σεληνιούχος ψευδάργυρος) και του δείγματος. Οι πολλαπλές ανακλάσεις της IR ακτινοβολίας στο δείγμα έχουν ως αποτέλεσμα να αυξάνουν τον λόγο του σήματος προς τον θόρυβο και, επομένως, να αυξάνει με αυτόν τον τρόπο η ένταση των ταινιών του φάσματος, ακόμη και για πολύ μικρές συγκεντρώσεις. [55]

Η ATR-FTIR φασματοσκοπία αποτελεί μία από τις σημαντικότερες μη καταστρεπτικές και πιο ευέλικτες μεθόδους, η οποία παρέχει φάσματα πολύ υψηλής ποιότητας για μία πολύ μεγάλη ποικιλία υλικών.[33] Βασικό πλεονέκτημα της τεχνικής ATR-FTIR είναι η απειροελάχιστη ποσότητα δείγματος που χρειάζεται, χωρίς να υπόκειται σε καμία επεξεργασία. Το γεγονός ότι δεν χρειάζεται ομογενοποίηση για τον σχηματισμό δισκίου του δείγματος με σκόνη KBr, καθιστά την τεχνική αυτή κατάλληλη για ανάλυση ιστορικών έργων, όπου απαγορεύεται η δειγματοληψία.[55]



Εικόνα 3.5: Σχηματική Αναπαράσταση της διαδρομής της δέσμης στην τεχνική ATR-FTIR.[37]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ ΣΑΡΩΣΗΣ (SEM)

4.1 Ιστορική Αναδρομή

Η ιστορία της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας άρχισε με το ανάπτυξη οπτικών ηλεκτρονίων. Το 1926, ο Busch μελέτησε την τροχιά φορτισμένων σωματιδίων σε αξονικά συμμετρικό ηλεκτρικό και μαγνητικό πεδίο και έδειξε ότι τέτοια πεδία θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ως φακοί σωματιδίων, που θέτουν τα θεμέλια του γεωμετρικού ηλεκτρονίου[38].

Το 1932, οι Knoll και Ruska προσπάθησαν να εκτιμήσουν το όριο ανάλυσης του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου[38]. Αντικατέστησαν το μήκος κύματος του φωτός με το μήκος κύματος των ηλεκτρονίων σε έναν επιταχυντή, αποδεικνύοντας ότι όταν δουλεύει κανείς σε υψηλή μεγέθυνση, είναι δυνατόν να υπάρξει καλύτερη ανάλυση από αυτήν του μικροσκοπίου φωτός[38].

Το πρώτο SEM αναπτύχθηκε και κατασκευάστηκε το 1942 από τον Zworykin, ο οποίος έφτασε στα 50 nm, νούμερο που θεωρείτο ακόμη χαμηλό για την απόδοση που θα μπορούσε να επιτευχθεί[38]. Το 1948 ο Oatley, βασισμένος στο SEM του Zworykin, ασχολήθηκε με τη βελτίωση του οργάνου. Εισήγαγε μη γραμμική ενίσχυση σήματος και βελτίωσε το σύστημα σάρωσης.

Στη συνέχεια, το 1960, ο Everhart και Thornley βελτίωσαν την κατεύθυνση των δευτερογενών ηλεκτρονίων και, το 1963, οι Pease και Nixon συνδύασαν όλες τις προηγούμενες βελτιώσεις, δημιουργώντας το πρώτο πρωτότυπο του SEM στην αγορά και το οποίο έφτανε μέχρι τα 10 nm. Τα SEM που χρησιμοποιούνται σήμερα δεν διαφέρουν πολύ από το πρωτότυπο αυτό[38].

4.2 Αρχή λειτουργίας SEM

Η Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) είναι μία από τις σύγχρονες σχετικές ποσοτικές ευέλικτες μεθόδους ανάλυσης της τοπικής μικροδομής δομής υλικών. Το Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης λειτουργεί με δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας. Αυτό του δίνει τη δυνατότητα να εστιάζει σε πολύ μικρότερη επιφάνεια υλικού[35,39]. Αποτελεί παραλλαγή του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και παρέχει ένα πολύτιμο συνδυασμό εικόνας υψηλής ανάλυσης, στοιχειακής ανάλυσης και πρόσφατα κρυσταλλογραφικής ανάλυσης της δομής του δείγματος. Η ανάλυση που δίνει φτάνει μέχρι τα 10 nm και κάτω ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε σκληρές επιφάνειες[29].

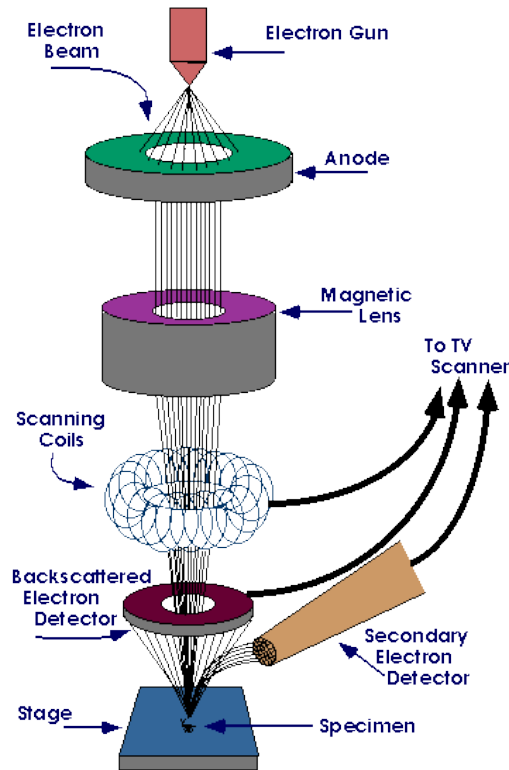
Η αρχή λειτουργίας του οργάνου βασίζεται στην αλληλεπίδραση της δέσμης των ηλεκτρονίων με το δείγμα. Τα άτομα του δείγματος, λόγω της απομάκρυνσης των ηλεκτρονίων, βρίσκονται σε διεγερμένη ενεργειακά κατάσταση και ηλεκτρόνια υψηλότερης ενεργειακής στάθμης καταλαμβάνουν την κενή στοιβάδα. Η μετάπτωση αυτή συνοδεύεται με εκπομπή ακτινών X (φωτονίων) ενέργειας ίσης με ενεργειακή διαφορά των δύο σταθμών. Η μονοχρωματική ενέργεια των εκπεμπόμενων ακτινών X καθορίζει το στοιχείο από όπου εκπέμπεται, επιτρέποντας έτσι τη χημική του ταυτοποίηση (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 τοπολογία[29].

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[29].

Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται είναι:

- **Ανιχνευτής ανασκεδαζόμενων ηλεκτρονίων:** Ημιαγωγός στερεάς κατάστασης σχήματος κυκλικού σχήματος.

- **Ανιχνευτής δευτερογενών ηλεκτρονίων:** «Συλλέκτης» αρνητικών ηλεκτρονίων-πλέγμα με θετικό δυναμικό (+100 V)
- **Ανιχνευτής ακτίνων X:** Κρύσταλλος πυριτίου-λιθίου ο οποίος μεταβάλλει την αντίστασή του ανάλογα με την απορρόφηση ακτίνων X



Εικόνα 4.1: Αρχή λειτουργίας SEM [40]

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 Δείγματα και Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την απομάκρυνση του αίματος και των προσμίξεων από τα δείγματα πριν την διεξαγωγή των πειραμάτων ATR-FTIR και SEM, ήταν υπεροξείδιο του υδρογόνου και ακετόνη. Παράλληλα, σε ορισμένες περιπτώσεις, χρησιμοποιήθηκε εξάνιο για απομάκρυνση των λιπόφιλων συστατικών των δειγμάτων.

Όπως προαναφέρθηκε, η τεχνική ATR-FTIR χρειάζεται απειροελάχιστη ποσότητα δείγματος για να δώσει ακριβή αποτελέσματα. Η ιδιαιτερότητα αυτή της μεθόδου βοήθησε στη λήψη δειγμάτων οστών μετεγχειρητικά από ασθενείς οι οποίοι έπασχαν από παθήσεις όπως οστεοπόρωση, σακχαρώδη διαβήτη τύπου II και κατάγματα. Τα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν είχαν απολυμανθεί καλά πριν την διεξαγωγή των πειραμάτων και έγινε χρήση παροχής υγρού αζώτου για την απομάκρυνση της υγρασίας.

5.2 Προετοιμασία δειγμάτων

Τα δείγματα, αμέσως μετά την επέμβαση, τοποθετούνται σε φορμόλη και φυλάγονται σε θερμοκρασία περίπου -8°C . Παρόλο που ακόμα και αν το οστό βρίσκεται σε αυτές τις συνθήκες για πολύ καιρό συντηρείται, η χρήση φρέσκων δειγμάτων για περιορισμό τυχαίων σφαλμάτων προτιμάται.

Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετούνται εναλλάξ για 10 min σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και 10 min σε ακετόνη για απομάκρυνση του αίματος και του περιβάλλοντος λίπους [1]. Τέλος τοποθετούνται σε φούρνο κενού για την απομάκρυνση του ελεύθερου νερού.



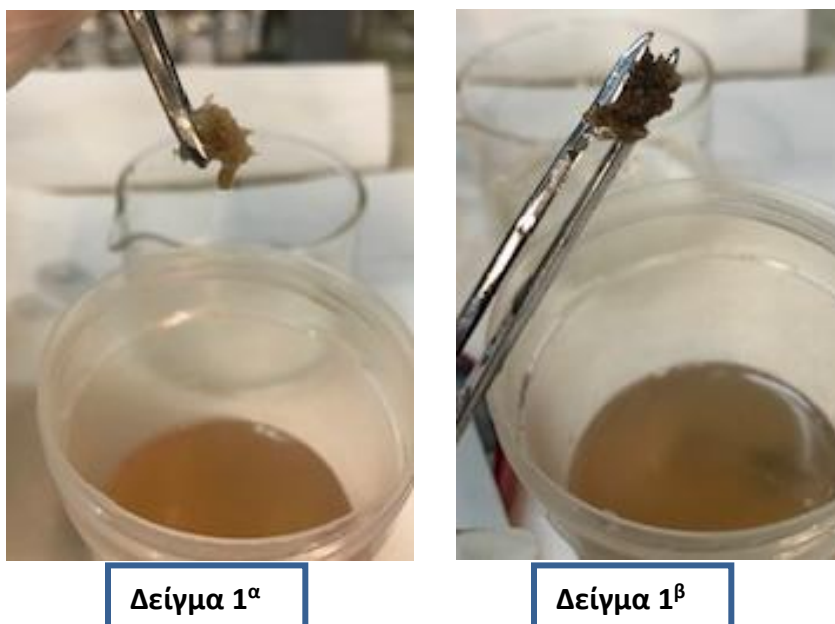
Εικόνα 5.1: Με την λαβίδα συγκρατείται μικρή ποσότητα δείγματος που χορηγήθηκε για την έρευνα. Τα δείγματα οστού τοποθετήθηκαν εναλλάξ σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και ακετόνη για την απομάκρυνση του αίματος.

5.3.1 Ιστορικό ασθενών

Για την κατανόηση της επίδρασης των παθήσεων στα οστά ενός ασθενούς, πολύ σημαντική ήταν η ύπαρξη ιατρικού ιστορικού των ασθενών από τους οποίους ελήφθησαν τα δείγματα, έτσι ώστε να καταστεί δυνατή η εξαγωγή συμπερασμάτων έχοντας λάβει υπόψιν τους πιθανούς παράγοντες. Ο συνολικός αριθμός δειγμάτων ήταν έξι (6).

Δείγμα 1: ασθενούς με ΣΔ τύπου II

- Η ασθενής, ηλικίας 81 ετών, έπασχε από ΣΔ τύπου II και ρύθμιζε το σάκχαρο του αίματος με μετφορμίνη. Προσήλθε στο Νοσοκομείο με υποκεφαλικό κάταγμα ισχίου. Κλινικά διαπιστώθηκε ότι εμφάνιζε οστεοπόρωση. Επειδή το δείγμα έδειχνε μακροσκοπικά ετερογένεια, για καλύτερη μελέτη χωρίστηκε σε δύο τμήματα, όπως φαίνεται στη Εικόνα 5.2.



Εικόνα 5.2: Το δείγμα 1 χωρίστηκε σε δύο περιοχές λόγω ετερογένειας. Το δείγμα 1^α υποδεικνύει την κίτρινη περιοχή του οστού και το 1^β τη σκούρα περιοχή

Δείγμα 2: Ασθενούς με οστεοπόρωση

Ασθενής, ηλικίας 69 ετών, προσήλθε για αρθροπάθεια ισχίου και υποβλήθηκε σε ολική αρθροπλαστική ισχίου. Κλινικά εμφάνιζε οστεοπόρωση χωρίς άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά.

Δείγμα 3: Ασθενούς με ΣΔ τύπου II

Ασθενής, ηλικίας 72 ετών, έπασχε από ΣΔ τύπου II και ρύθμιζε το σάκχαρο του αίματος με ινσουλίνη. Προσήλθε στο νοσοκομείο με κάταγμα ισχίου. Κλινικά διαπιστώθηκε ότι εμφάνιζε οστεοπόρωση.

Δείγμα 4: Ασθενούς με ΣΔ τύπου II

Ασθενής, ηλικίας 86 ετών, έπασχε από ΣΔ τύπου II και ρύθμιζε το σάκχαρο του αίματος με ινσουλίνη. Προσήλθε στο νοσοκομείο με κάταγμα ισχίου και κλινικά διαπιστώθηκε ότι έπασχε από οστεοπόρωση.

Δείγμα 5: Ασθενούς με μεταστατικό καρκίνο παχέος εντέρου

Ασθενής, ηλικίας 63 ετών, προσήλθε στο νοσοκομείο με παθολογικό κάταγμα ισχίου, που προήλθε από κάποια δυσλειτουργία των οστών και όχι από πτώση ή άλλη μηχανική επίδραση. Διαπιστώθηκε ότι έπασχε από μεταστατικό καρκίνο παχέος εντέρου.

Δείγμα 6: Ασθενούς με επιληπτικές κρίσεις

Ασθενής, ηλικίας 57 ετών, έπασχε από επιληπτικές κρίσεις και ήταν υπό αγωγή με αντιεπιληπτικά φάρμακα. Προσήλθε στο νοσοκομείο ως πολυτραυματίας λόγω πτώσης από μεγάλο ύψος.

5.3 Φάσματα ATR-FTIR

Τα φάσματα λήφθηκαν με φασματοφωτόμετρο NICOLET 6700, και κάθε φάσμα προήλθε από τον μέσο όρο 120 φασμάτων (scans) και διακριτική ικανότητα (Resolution) 4 cm^{-1} . Πλεονέκτημα του συγκεκριμένου φασματοφωτόμετρου ATR-FTIR είναι ότι το δείγμα δεν χρειάζεται επιπλέον επεξεργασία, όπως διαχωρισμό των συστατικών, αφαλάτωση ή βαφή. Τα φάσματα ATR-FTIR βασίζονται στις δονήσεις των μορίων χαρακτηριστικών ομάδων και βιολογικών μορίων. Όπως προαναφέρθηκε, η δέσμη υπέρυθρης ακτινοβολίας περνάει μέσω ενός κρυστάλλου διαμαντιού πάνω στο δείγμα, το οποίο είναι τοποθετημένο πάνω σε κρύσταλλο Zn-Se. Η γωνία πρόσπτωσης είναι συνήθως 45° και έτσι υπάρχουν πολλαπλές ανακλάσεις που πολλαπλασιάζουν τη συγκέντρωση του δείγματος[30].

Μετά από κάθε μέτρηση ο κρύσταλλος του φασματοφωτομέτρου καθαρίζονταν με οινόπνευμα, ώστε να απομακρυνθούν τα λιπαρά συστατικά του δείγματος και να μην καταστραφεί ο κρύσταλλος. Λαμβάνεται ένα αρχικό φάσμα της ατμόσφαιρας (background) το οποίο αφαιρείται αυτόματα από κάθε φάσμα των δειγμάτων. Το δείγμα πρέπει να έχει λεπτή τομή, ώστε η υπέρυθρη ακτινοβολία να το διαπερνά.



Εικόνα 5.3: Φασματοφωτόμετρο Nicolet 6700. Ινστιτούτο Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος.

5.4 SEM-EDAX

Η μικροσκοπική δομή των δειγμάτων μελετήθηκε με τη χρήση Ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης του οίκου FEI, Quanta 200, συνδεδεμένο με αναλυτή ακτινών-Χ ενεργειακής διασποράς- EDAX. Το εν λόγω SEM επιτυγχάνει μεγέθυνση μεγαλύτερη του 100.000x με διακριτική ικανότητα 6nm. Η πηγή ηλεκτρονίων του οργάνου αποτελείται από νήμα βολφασίου και διαθέτει δύο δειγματοφορείς των οποίων η κίνηση x,y,z ελέγχεται ηλεκτρονικά. Διαθέτει τρεις διαφορετικούς ανιχνευτές δευτερογενών ηλεκτρονίων: Everhart-Thornley (ETD), Large Field Detector(LFD), Gaseous Electron Detector (GED), έναν ανιχνευτή ανασκεδαζόμενων ηλεκτρονίων (Solid State Electron Detector, SSED) και ανιχνευτή ενεργειακής διασποράς ακτινών X (EDAX)[39].

Το πρόγραμμα επιτρέπει να παρακολουθούμε συγχρόνως:

- Την επιφάνεια του δείγματος.
- Την κατανομή των φάσεων από τον ανιχνευτή των ανασκεδαζόμενων ηλεκτρονίων.
- Την εικόνα μορφολογίας.
- Επιπλέον λήψη εικόνας του δείγματος μέσω εσωτερικής κάμερας [3].

Παράλληλα, με χρήση του λογισμικού EDAX-Genesis, υπάρχει δυνατότητα στοιχειακής ανάλυσης σε επιλεγμένη θέση του δείγματος. Τα αποτελέσματα της εξέτασης των δειγμάτων παρουσιάζονται με την απεικόνιση της μορφολογίας επιφάνειας καθώς και διάγραμμα της στοιχειακής ανάλυσης στο δεδομένο σημείο[30,41].

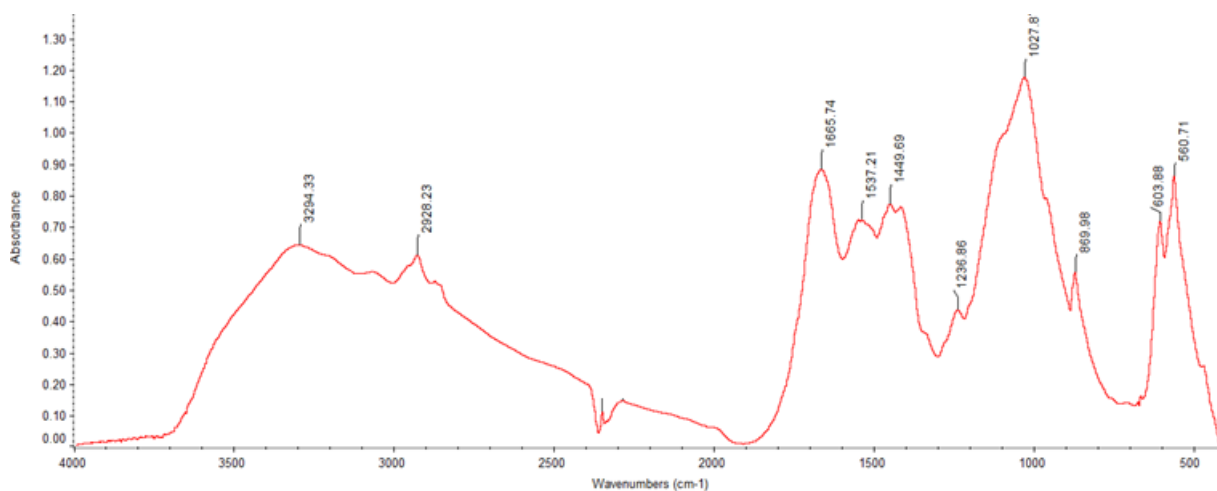
III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΜΕΛΕΤΗ ΦΑΣΜΑΤΩΝ ATR-FTIR

6.1 Φάσμα υγιούς οστού

Για να γίνει αντιληπτή η μεταβολή της μοριακής δομής των οστών λόγω της ασθένειας, θα πρέπει αρχικά να μελετηθεί η μοριακή δομή ενός υγιούς οστού. Στο Σχήμα 6.1 δίνεται το χαρακτηριστικό ATR-FTIR υγιούς οστού.



Σχήμα 6.1: ATR-FTIR φάσμα υγιές οστού.

Αρχικά, οι ταινίες που εμφανίζονται στις περιοχές $3600\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ οφείλονται στην παρουσία κρυσταλλικού νερού και ομάδων OH του υδροξυαπατίτη. Παράλληλα, η ταινία στα 2928 cm^{-1} οφείλεται σε συμμετρικές και αντισυμμετρικές δονήσεις νCH_2 , νCH_3 της οργανικής φάσης του οστού, δηλαδή κυρίως των λιπιδίων[1,42].

Στην περιοχή $2700\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ δεν υπάρχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον και γι' αυτό παραλείπεται από την ανάλυση. Η κορυφή που εμφανίζεται στα 1665 cm^{-1} οφείλεται στη δόνηση κάμψης Amide I των πρωτεϊνών σε διαμόρφωση α -έλικας. Συμμετέχει η ομάδα NH του πεπτιδικού δεσμού. Η ταινία αυτή βεβαιώνει ότι το κολλαγόνο έχει δομή α -έλικας.[42] Η κορυφή στα 1537 cm^{-1} αποδίδεται στη δόνηση των Amide II και οφείλεται κατά 60% στη

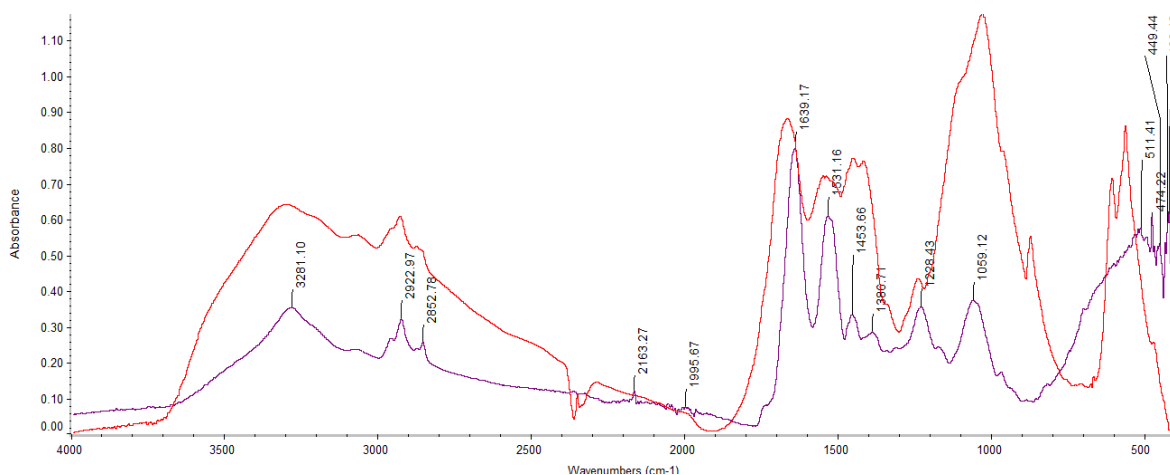
δόνηση κάμψης εντός επιπέδου (in plane) της ομάδας –NH και 40% στη δόνηση τάσης της ομάδας –CN. Η ταινία αυτή επιβεβαιώνει ότι τα Amide II έχουν δομή β-αναδίπλωσης [42,43].

Στη συνέχεια, η κορυφή στα 1449 cm^{-1} , οφείλεται στη δόνηση κάμψης CH_2 και την απορρόφηση ανθρακικών ιόντων CaCO_3 . Σε μικρότερους κυματαριθμούς, και συγκεκριμένα στην περιοχή $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$, παρατηρούνται οι κορυφές που συνδέονται με τις δονήσεις μορίων υδροξυαπατίτη[43]. Προχωρώντας προς μικρότερους κυματαριθμούς η κορυφή που παρατηρείται στα 1232 cm^{-1} αντιστοιχεί στις δονήσεις που οφείλονται στις ομάδες –OH των μορίων του υδροξυαπατίτη. Οι δονήσεις απορρόφησης των χαρακτηριστικών φωσφορικών ομάδων του υδροξυαπατίτη εμφανίζονται στην περιοχή $1200\text{-}500\text{ cm}^{-1}$. Διαπιστώνεται ότι οι δονήσεις τάσης της ομάδας $\text{v}_3\text{PO}_4^{3-}$ του στοιχειομετρικού υδροξυαπατίτη εμφανίζονται στα 1112 cm^{-1} , 1035 cm^{-1} , 1027 cm^{-1} και 961 cm^{-1} . Η κορυφή στα 875 cm^{-1} οφείλεται στη δόνηση τάσης των ανθρακικών ιόντων $\text{v}_2\text{CO}_3^{2-}$, όπου επικρατεί ο υδροξυαπατίτης τύπου B.[1,43].

6.2 Σύγκριση ATR-FTIR φασμάτων οστών ασθενών με υγιείς δότες.

A) Διαβητικοί ασθενείς

Αρχικά, συγκρίνεται το υγιές οστό με το δείγμα 1, το οποίο είναι οστεοπορωτικό οστό με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II. Όπως φαίνεται και από το σχήμα 6.2, υπάρχουν εμφανείς διαφορές μεταξύ των δύο οστών σε όλο το εύρος του φάσματος.



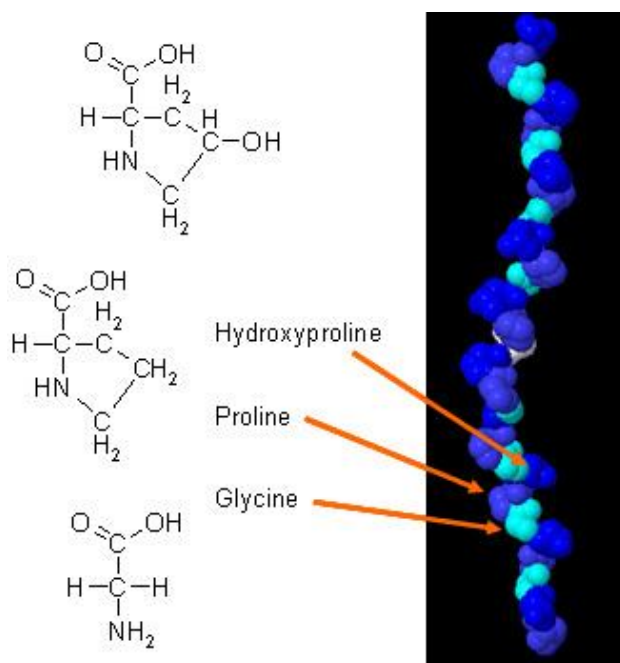
Σχήμα 6.2: Σύγκριση υγιούς οστού (κόκκινο) με δείγμα 1, οστεοπορωτικό οστό με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II.

Συγκεκριμένα, στην περιοχή του φάσματος μεταξύ $3300-3200\text{ cm}^{-1}$, οι ταινίες αποδίδονται στις δονήσεις τάσης των αμινομάδων (νNH). Στις υψηλότερες ενέργειες απαντώνται οι ελεύθερες τερματικές ομάδες NH των πρωτεϊνών, ενώ σε μικρότερους κυματαριθμούς απαντώνται οι αμινομάδες που σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου. Οι δεσμοί υδρογόνου μπορεί να είναι ενδομοριακοί ή διαμοριακοί μεταξύ άλλων μορίων των κυττάρων. Η ταινία που εμφανίζεται ως ώμος στα 3080 cm^{-1} εκφράζει την αντισυμμετρική δόνηση τάση εντός επιπέδου του ατόμου του υδρογόνου στο τερματικό άτομο άνθρακα, που συνδέεται με διπλό δεσμό με το γειτονικό του άτομο άνθρακα (ολεφινικός δεσμός, $\nu=\text{CH}_2$)[44].

Στην περιοχή $3600-2700\text{ cm}^{-1}$, το υγιές οστό εμφανίζει πιο έντονες ταινίες που οφείλονται σε κρυσταλλικό νερό και ομάδες $-\text{OH}$ του υδροξυαπατίτη. Στο δείγμα 1, οστεοπορωτικό οστό με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II, η ταινία έχει μικρότερη ένταση και

μεγαλύτερο εύρος, λόγω του ότι επικρατούν οι ταινίες των αμινομάδων και η οργανική φάση του οστού μειώνεται. Συγκεκριμένα, είναι γνωστό ότι το κολλαγόνο, περιέχει πεπτιδικούς δεσμούς, άρα οι αμινομάδες προέρχονται από τους δεσμούς –NH αυτών[42-44].

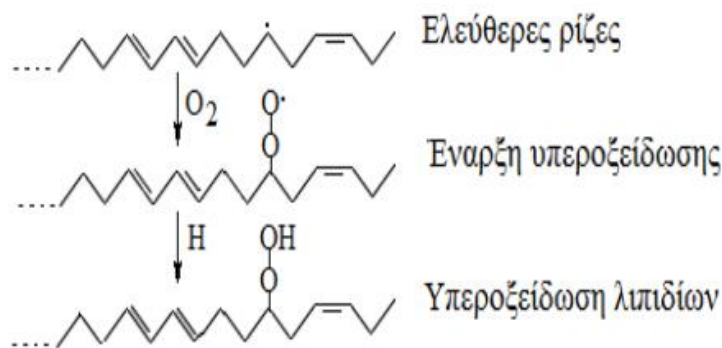
Οι ταινίες στα 2928 cm^{-1} των φασμάτων, οφείλονται στην αντισυμμετρική δόνηση τάσης της ομάδας –CH₂ κολλαγόνου, ενώ η συμμετρική δόνηση καταγράφεται περίπου στα 2852 cm^{-1} [40,42]. Σε αντίθεση με το φάσμα υγιούς οστού, στο οστεοπορωτικό δείγμα οι ταινίες αυτές υπάρχουν με μικρότερη ένταση και μεγαλύτερο εύρος. Το εύρος οφείλεται στην αύξηση των ομάδων υδροξυλίου στο σύστημα, λόγω της προσθήκης ελευθέρων ριζών υδροξυλίου στους διπλούς δεσμούς της οργανικής φάσης των οστών. Επομένως, καταγράφεται η αύξηση της οστεόλυσης στο δείγμα οστεοπορωτικού οστού[45].



Εικόνα 6.1: Χημική δομή κολλαγόνου. Υδροξυπρολίνη, προλίνη και γλυκίνη είναι τα τρία αμινοξέα του κολλαγόνου[46].

Σημαντικές διαφορές εμφανίζονται στην περιοχή 1800–1200 cm^{-1} , όπου καταγράφονται οι μεταβολές στη μοριακή δομή των ομάδων $-\text{C}=\text{O}$, Amide I, Amide II και Amide III. Στο οστό ασθενούς με ΣΔ τύπου II, η μικρή 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. Η εμφάνιση αυτής της ταινίας συνδέεται με το οξειδωτικό στρες, ή αλλιώς, υπεροξειδωση λιπιδίων με δράση ελευθέρων ριζών[42,44].

Το οξειδωτικό στρες είναι η υπερβολική συγκέντρωση ελευθέρων ριζών στα κύτταρα, που προκαλούν βλάβες στη λειτουργία των κυττάρων. Ορίζεται ως η διαφορά μεταξύ της αυξημένης παραγωγής και μειωμένης αποδόμησης ριζών οξυγόνου. [44]. Έχει αποδειχθεί ότι αντιδράσεις ελευθέρων ριζών στον ανθρώπινο οργανισμό κατά τη διάρκεια μεταβολικών αντιδράσεων ή οξειδωτικού στρες, καταστρέφουν σημαντικά βιολογικά μόρια. Λόγω του αερόβιου χαρακτήρα του ανθρώπινου οργανισμού, το οξυγόνο αντιδρά με τις ελεύθερες ρίζες λιπιδίων ή φωσφολιπιδίων των μεμβρανών, παράγοντας έτσι υπεροξυλ-ελεύθερες ρίζες και τελικά υπεροξειδία (COOH). Τέλος, οι υπεροξυλ-ελεύθερες ρίζες παράγουν αλδεϋδες που σύμφωνα με μελέτες, έχουν ανιχνευθεί και συσχετιστεί με την παρουσία καρκίνου[45].

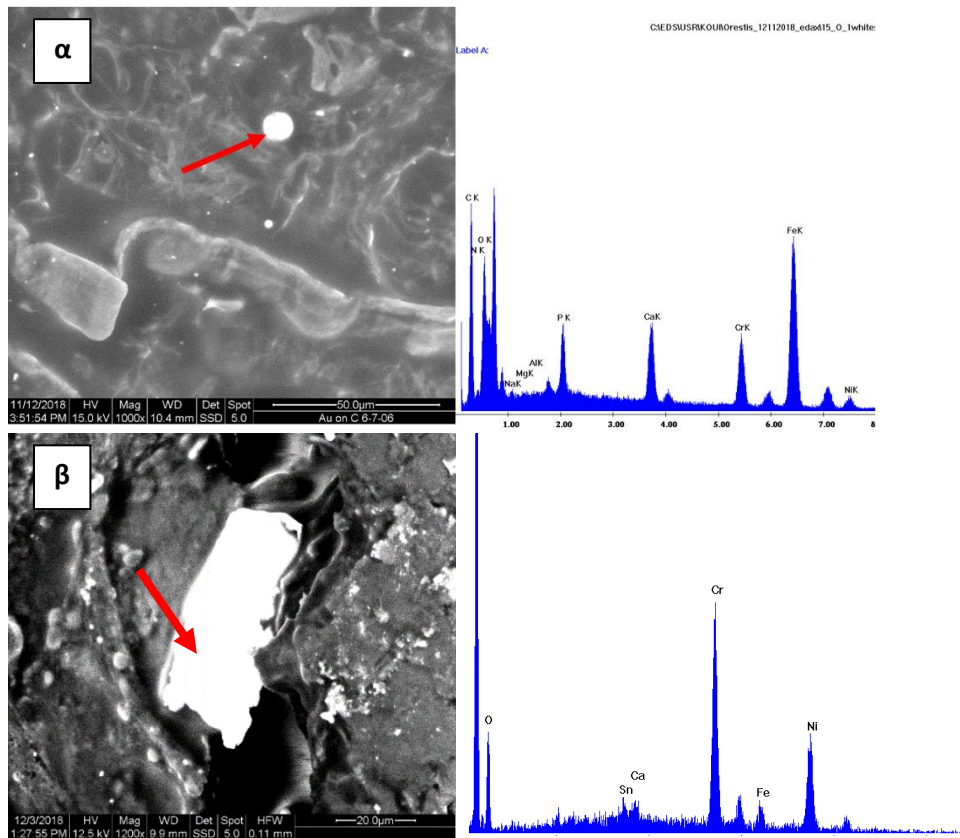


Εικόνα 6.2: Αντίδραση υπεροξυλ-ελευθέρων ριζών για παραγωγή αλδεϋδης ή κετόνης[45].

Μεταξύ των παραγόντων που ευνοούν την παραγωγή αυξημένων ριζών O_2 , βρίσκεται και η υπεργλυκαιμία, πληροφορία που δικαιολογεί την εμφάνιση της ταινίας 1742 cm^{-1} σε διαβητικό ασθενή. Όταν το οξειδωτικό στρες γίνει πιο έντονο, λειτουργεί

τοξικά, παρεμποδίζει το έργο του κυττάρου και είναι δυνατόν να προκαλέσει τον θάνατό του. Το επίπεδο του οξειδωτικού στρες σε κάθε οργανισμό, καθορίζεται κυρίως, από τον γενετικό κώδικα[43,44].

Ως ο σημαντικότερος οξειδωτικός παράγοντας έχει αναγνωριστεί το O_2 . Λόγω του ότι το O_2 είναι πιο δραστικό σε οργανικούς διαλύτες από ότι σε υδατικά διαλύματα, το O_2 που δημιουργείται στο λιπόφιλο εσωτερικό των μεμβρανών και στο οργανικό μέρος του οστίτη ιστού είναι πιο τοξικό. Το H_2O_2 μπορεί να δημιουργηθεί από το O_2 , είτε απευθείας είτε μέσω της δράσης ενζύμων. Άλλα μέταλλα μετάπτωσης, όπως ο χαλκός, το νικέλιο, ο άργυρος, ο μόλυβδος και το χρώμιο, έχουν επίσης την ικανότητα να καταλύουν τέτοιες αντιδράσεις και να διευκολύνουν τη δημιουργία δραστικών ελευθέρων ριζών[44].



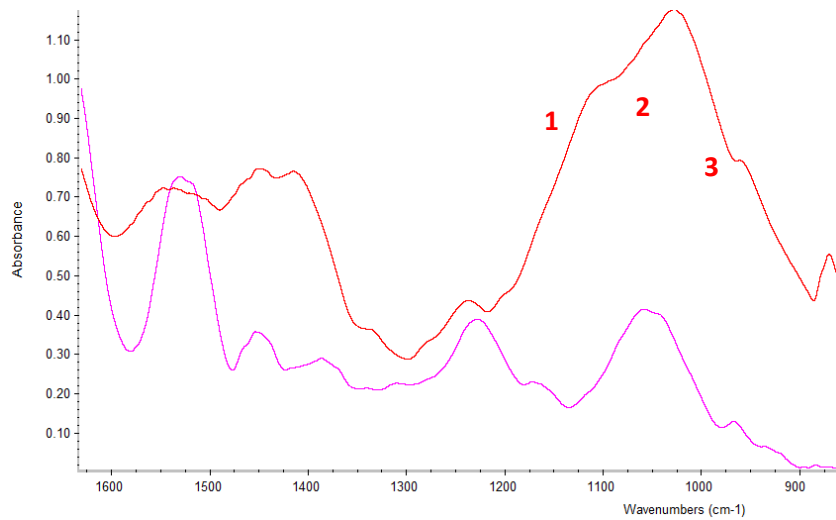
Εικόνα 6.3: Απεικονίσεις SEM σε συνδυασμό με στοιχειακή ανάλυση EDAX δειγμάτων 1(α) και 3(β)-οστεοπορωτικά δείγματα σακχαρώδους διαβήτη τύπου II. Η παρουσία Cr, Fe και Ni υποδεικνύουν επέμβαση εμφυτεύματος, αφού αποτελούν κλασικά στοιχεία που χρησιμοποιούνται σε τέτοιου είδους επεμβάσεις.

Η παρουσία οξειδωτικών παραγόντων στο δείγμα επιβεβαιώνεται από τις απεικονίσεις SEM και στοιχειακή ανάλυση EDAX. Όπως φαίνεται στην εικόνα 6.3.α, οστεοπορωτικού δείγματος με ΣΔ τύπου II, η λευκή περιοχή του οστού αποτελείται από μεγάλο ποσοστό O_2 αλλά και άλλων μετάλλων, μεταξύ των οποίων και Fe και Cr. Το ίδιο συμβαίνει και με το δείγμα 3, εικόνα 6.3β, το οποίο προέρχεται από ασθενή που πάσχει από τις ίδιες νόσους (οστεοπόρωση και σακχαρώδης διαβήτης τύπου II).

Περαιτέρω, στην περίπτωση του υγιούς οστού, η κορυφή των Amide I βρίσκεται στα 1665 cm^{-1} και αποδίδεται στην παρουσία της πεπτιδικής ομάδας NH πρωτεϊνών. Στην ταινία αυτή συμμετέχει η δόνηση τάσης $\nu\text{C-N}$ και κάμψης $\delta\text{N-H}$ εντός επιπέδου και είναι συνδυασμός της δόνησης τάσης της ομάδας C=O και της ομάδας N-H . Υποδηλώνει ότι η δευτεροταγής δομή του κολλαγόνου βρίσκεται σε διαμόρφωση α -έλικας[1,44]. Από τις μετατοπίσεις των ταινιών στο δείγμα ΣΔ τύπου II που αποδίδονται στις ομάδες Amide I προς μικρότερους κυματαριθμούς, διαπιστώνεται ότι μειώνεται το λιπόφιλο περιβάλλον, ενώ επικρατεί η β -διαμόρφωση με αντιπαράλληλη αναδίπλωση[44].

Η ταινία στα 1531 cm^{-1} αποδίδεται στις δονήσεις των ομάδων Amide II, ενώ οι ομάδες Amide III βρίσκονται στα 1228 cm^{-1} . Οι ταινίες αυτές υπερκαλύπτονται κυρίως σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη, από τις ταινίες των σακχάρων. Επίσης, στο δείγμα ΣΔ τύπου II, εμφανίζεται έντονη ταινία στα 1454 cm^{-1} . Η ταινία αυτή οφείλεται τόσο στις δονήσεις κάμψης των ομάδων CH_2 , όσο και στη δόνηση νCO_3^{2-} των ανθρακικών ιόντων[44].

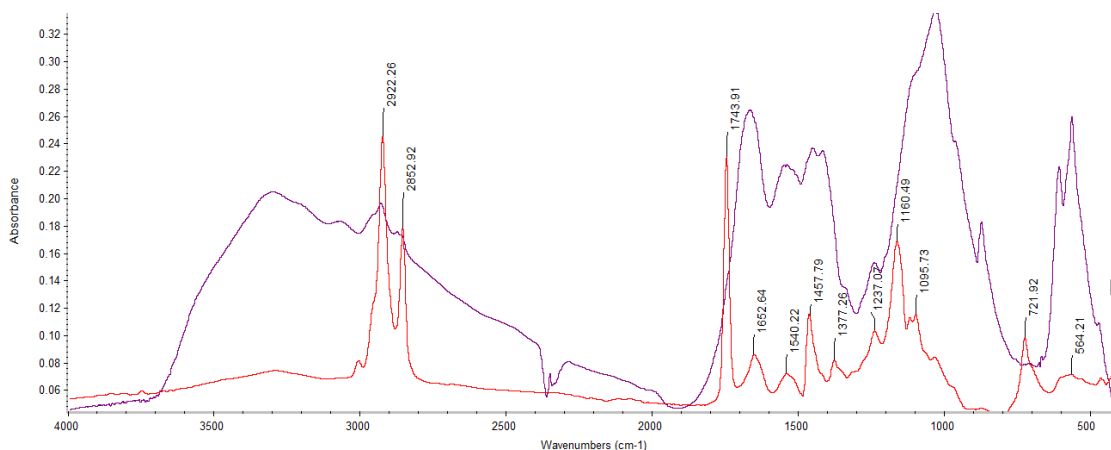
Τα σάκχαρα εμφανίζουν στο φάσμα ATR-FTIR τις χαρακτηριστικές ταινίες στις ίδιες περιοχές με τις αντίστοιχες ταινίες του υδροξυαπατίτη. Παρ' όλα αυτά η μορφή των ταινιών διαφέρει σημαντικά, ιδιαίτερα στην περιοχή $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 6.3 το οστό εμφανίζει τριπλή ταινία με μέγιστο περίπου στα 1080 cm^{-1} . Στο φάσμα του διαβητικού ασθενούς παρατηρείται εξάλειψη των ώμων και μετατόπιση του μεγίστου σε μεγαλύτερους κυματαριθμούς [44].



Σχήμα 6.3: Σύγκριση υγιούς οστού (κόκκινο) με οστεοπωρωτικό οστό ασθενούς που έπασχε από σακχαρώδη διαβήτη (μωβ). Οι τρεις ώμοι του υγιούς οστού δεν συνυπάρχουν στο δείγμα, ομολογώντας την παρουσία σακχαρώδους διαβήτη.

B) Ασθενείς με καρκίνο

Στη συνέχεια, συγκρίνεται το υγιές οστό με το δείγμα 5. Ο ασθενής πάσχει από μεταστατικό καρκίνο παχέος εντέρου και οστεοπόρωση, η οποία όμως είναι αποτέλεσμα του καρκίνου.



Σχήμα 6.4: Δείγμα ασθενούς με καρκίνο (κόκκινο) σε σύγκριση με δείγμα υγιούς οστού.

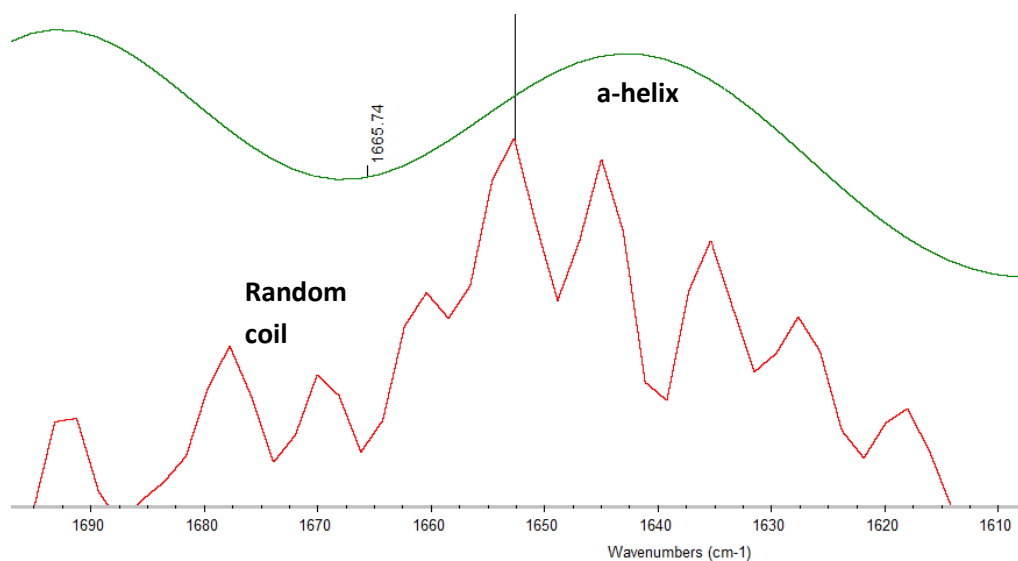
Οι ταινίες στην περιοχή $3500-3100\text{ cm}^{-1}$, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 6.4, στην οποία εμφανίζονται οι δονήσεις νOH υδροξυπατιτή στο υγιές οστό, στο καρκινικό δείγμα έχουν σχεδόν εξαλειφθεί. Στο καρκινικό δείγμα οι δονήσεις τάσης των νNH ομάδων κολλαγόνου στα 3300 cm^{-1} μετατοπίζονται σε μικρότερους κυματαριθμούς (3275 cm^{-1}), ως αποτέλεσμα της μεταβολής της δομής των πρωτεϊνών που προκαλεί η ασθένεια. Η πλατιά ταινία στα 3060 cm^{-1} , αποδίδεται στη δόνηση νCH τερματικής ολεφινικού τύπου (νC=CH₂) ομάδας[45,49,50].

Μεγάλη μεταβολή εμφανίζουν οι δονήσεις των συμμετρικών και αντισυμμετρικών ομάδων CH₃ και CH₂ (ν_{αs}CH₃ στα 2966 cm^{-1} , ν_σCH₃ στα 2881 cm^{-1} , ν_{αs}CH₂ στα 2922 cm^{-1} και ν_σCH₂ στα 2852 cm^{-1}). Η αύξηση της έντασης των κορυφών στο καρκινικό δείγμα, υποδεικνύει υπεροξείδωση λιπιδίων. Υπάρχει αλλαγή στο περιβάλλον των κυττάρων, το οποίο γίνεται πιο λιπόφιλο και υποδηλώνει το σπάσιμο της δομής των λιποπρωτεϊνών, μείωση της ανθρακικής αλυσίδας και απασβέστωση (demineralization) του οστού[42,45]. Σε αυτή την περιοχή, το καρκινικό οστό εμφανίζει κορυφές υψηλότερης έντασης από τις κορυφές του υγιούς δείγματος. Η αύξηση αυτή, παρατηρήθηκε σε διαβητικούς και υπερουριχαιμικούς ασθενείς, επιβεβαιώνοντας τη μείωση του υδρόφοβου περιβάλλοντος, ως αποτέλεσμα της σχάσης του μήκους της ανθρακικής αλυσίδας των λιπιδίων και πρωτεϊνών, αλλά και της μεταβολής της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών[44].

Σημαντικές διαφορές παρουσιάζονται στην περιοχή $1800-1500\text{ cm}^{-1}$ του φάσματος, που χαρακτηρίζει κυρίως τη δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών. Το ιστορικό του ασθενούς με καρκίνο επιβεβαιώνεται από την ταινία στα 1743 cm^{-1} του καρκινικού δείγματος η οποία υποδηλώνει οξειδωτικό στρες. Όπως αναφέρθηκε, η υπεροξείδωση λιπιδίων με τη συμμετοχή ελευθέρων ριζών και η παρουσία αλδεϋδών έχει συνδεθεί αδρά από την ιατρική κοινότητα με τον καρκίνο, ονομάζοντας τους “cancer-makers” [45].

Στην περιοχή $1700-1500\text{ cm}^{-1}$ όπου 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 1665 cm^{-1} μετατοπίζεται προς μικρότερους κυματαριθμούς, στα 1652 cm^{-1} , υποδεικνύοντας μεταβολή 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 ταινία του

πεπτιδικού δεσμού (Amide II) βρίσκεται στα 1531 cm^{-1} και αποδίδεται στο κολλαγόνο με διαμόρφωση α -έλικας [47]. Η μετατόπιση της ταινίας στα 1537 cm^{-1} στο καρκινικό οστό, υποδηλώνει ότι οι πρωτεΐνες αποκτούν τυχαία σπειροειδή διαμόρφωση, μεταβάλλοντας τη δομή του κολλαγόνου και του υδροξυαπατίτη.[1,45].



Σχήμα 6.5: Σύγκριση δευτεροταγούς δομής πρωτεϊνών σε υγιές οστό (πράσινο) και σε καρκινικό δείγμα (κόκκινο)[47].

Μεγάλες διαφορές παρατηρούνται στις περιοχές $1500\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ όπου εμφανίζονται ταινίες τα οργανικά και ανόργανα συστατικά του οστού. Λόγω του ότι ο μεταστατικός καρκίνος του ασθενούς έχει προκαλέσει οστεοπόρωση, τα συστατικά αυτά είναι μειωμένης έντασης στο καρκινικό οστό. Η κορυφή 1418 cm^{-1} προκύπτει από τη δόνηση τάσης των ανθρακικών ιόντων του οστού $\nu_3(\text{CO}_2-3)$ δείχνοντας ότι ο ανθρακικός απατίτης είναι τύπου A. Η δραματική μείωση της έντασής της, υποδηλώνει την αντικατάσταση των φωσφορικών ομάδων του υδροξυαπατίτη με νCO_3^{2-} οδηγώντας το οστό στην πλήρη απασβέστωσή του[45].

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 στο φάσμα υγιούς οστού στα 1240 cm^{-1} μειώνεται σε ένταση και μετατοπίζεται στα 1237 cm^{-1} στο καρκινικό οστό. Η μεταβολή αυτή οφείλεται στη μείωση της συγκέντρωσης των χαρακτηριστικών ομάδων των Amide III [44,47].

Έντονες μεταβολές παρατηρούνται στην περιοχή $1200-900\text{ cm}^{-1}$, όπου εμφανίζονται οι ταινίες συμμετρικών και αντισυμμετρικών δονήσεων τάσης φωσφορικών ομάδων $\nu_3\text{PO}_3^{4-}$ στα 1035 cm^{-1} και 1027 cm^{-1} . Στο καρκινικό οστό, οι ταινίες αυτές σχεδόν εξαφανίζονται και συμπερασματικά το οστό δεν αποτελείται από βιολογικό υδροξυαπατίτη αλλά από άμορφο βιολογικό υδροξυαπατίτη[47,48]. Η μείωση του βιολογικού υδροξυαπατίτη οφείλεται στην καταστροφή της οργανικής μάζας που συγκρατεί τους κρυστάλλους του υδροξυαπατίτη. Η μεταβολή της δομής των φωσφορικών αλάτων και του μεγέθους των κρυστάλλων υδροξυαπατίτη γίνεται σταδιακά όσο προχωράει η απασβέστωση των οστών. Βιβλιογραφικά, το φαινόμενο αυτό είναι ανάλογο του ιστορικού του ασθενούς και του σταδίου της ασθένειας[48,51].

Στην περιοχή $600-400\text{ cm}^{-1}$ απεικονίζονται οι χαρακτηριστικές ταινίες που οφείλονται στις δονήσεις των φωσφορικών ιόντων του υδροξυαπατίτη. Από τις κορυφές του φάσματος του υγιούς οστού, οι ταινίες στα 604 cm^{-1} και στα 560 cm^{-1} αποδίδονται στην τριπλά εκφυλισμένη δόνηση τάσης $\nu_4(\text{O}-\text{P}-\text{O})$. Στο δείγμα καρκινικού οστού όμως, οι ταινίες που εμφανίζονται μεταξύ 700 cm^{-1} και 400 cm^{-1} δεν μπορούν να αποδοθούν σε μετατοπίσεις των ταινιών του υδροξυαπατίτη αλλά σε θειόλες (ομάδες C-S των S-S των θειολών). Οι θειούχες βάσεις των πρωτεϊνών που βρίσκονται κυρίως στα οστά (κυστεΐνη και γλουτοθειόλες GSH) έχουν οξειδωθεί[44].

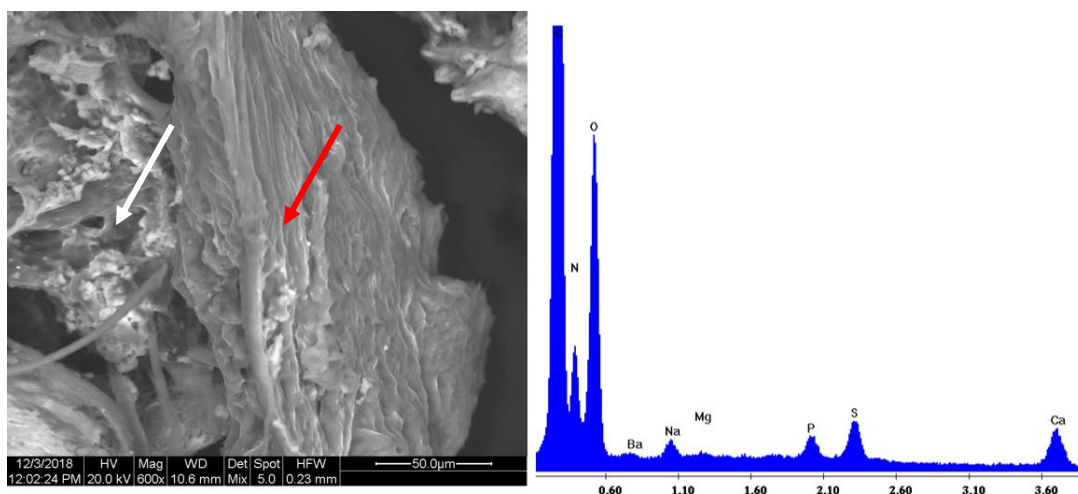
Οι γλουταθειόλες, οι οποίες αποτελούν φυσική προστασία του ανθρώπινου οργανισμού, είναι από τις πρώτες που οξειδώνονται κατά το οξειδωτικό στρες. Είναι γνωστό ότι είτε αντιδρούν με ελεύθερες ρίζες υδροξυλίων ή δρουν σαν δότες Υδρογόνου για να αποκαταστήσουν τη ζημιά που έχουν υποστεί τα βιολογικά μόρια[50].

Την παρουσία μεταστατικού καρκίνου επιβεβαιώνει περαιτέρω και η ανάλυση SEM του δείγματος. Όσον αφορά την ανάλυση EDAX, η παρουσία οξυγόνου υποδηλώνει την δράση ελευθέρων ριζών στο δείγμα, γεγονός που επιβεβαιώνεται από τα αποτελέσματα. Ταυτόχρονα, η παρουσία θείου μπορεί να εξηγηθεί από το ATR-FTIR φάσμα στην περιοχή $721-400\text{ cm}^{-1}$. Στο επισημασμένο σημείο της εικόνας 6.4, διακρίνεται μια σπασμένη αμυλοειδής πρωτεΐνη. Αυτό επιβεβαιώνει τα φάσματα, αφού η παρουσία αμυλοειδών έχει συνδεθεί με την ανάπτυξη καρκίνου[45,47-49].

Συγκεκριμένα, η μείωση της έντασης και η αύξηση του πλάτους της ταινίας στα 1510 cm^{-1} , η οποία αποδίδεται στην ταινία κάμψης των Amide II, αποτελείται από πρωτεΐνες του

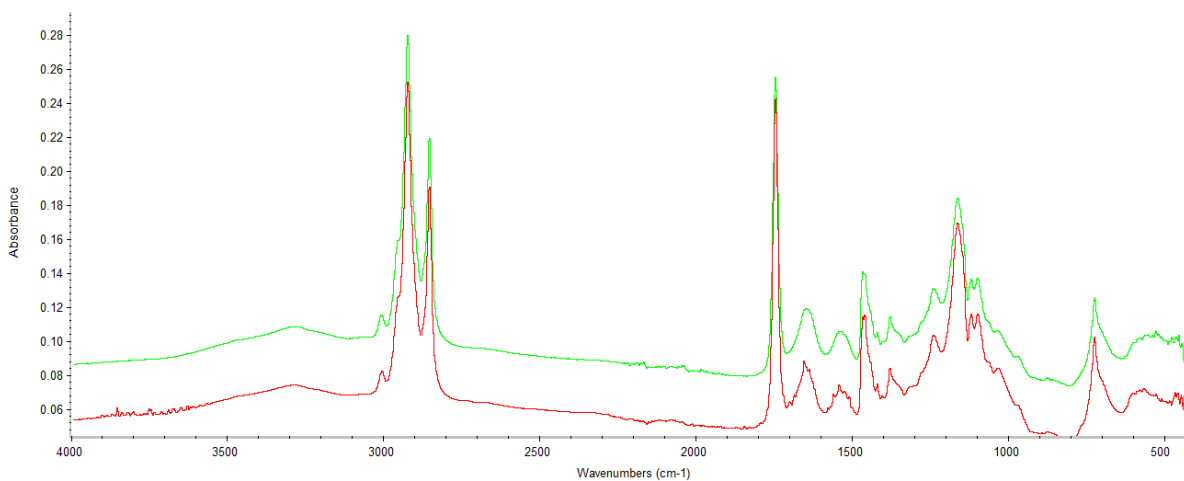
κυττάρου και πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους αμυλοειδούς τύπου, ως προϊόντα της σχάσης των πρωτεϊνών και σακχάρων, λόγω της ασθένειας[45,47].

Ο σχηματισμός αμυλοειδών πρωτεϊνών ευνοείται από τις αντιδράσεις ελευθέρων ριζών κατά την εξέλιξη της ασθένειας. Παράλληλα, ενισχύει την παραδοχή ότι κατά την ανάπτυξη του καρκίνου παράγονται ελεύθερες ρίζες, οι οποίες οδηγούν σε προϊόντα σχάσης των αλυσίδων των πρωτεϊνών. Τα θραύσματα των πρωτεϊνών αντιδρούν με τα παραγόμενα σάκχαρα σχηματίζοντας τελικά πολυμερή αμυλοειδούς τύπου. Για τον λόγο αυτό, η πρωτοταγής δομή (αλληλουχία βάσεων) των αμυλοειδών πρωτεϊνών δεν είναι σταθερή, αλλά τυχαία. Οι αμυλοειδούς τύπου πρωτεΐνες σχηματίζονται σε πολλές ασθένειες, όπως ν. Parkinson και ν. Alzheimer[45,47,49].



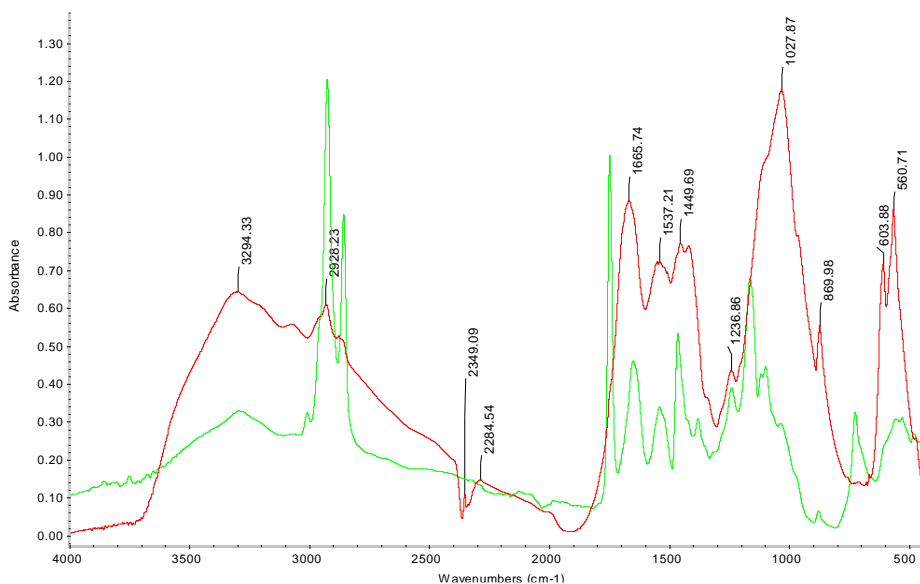
Εικόνα 6.4: Απεικόνιση SEM και ανάλυση EDAX δείγματος 5(καρκινικό). Το άσπρο βέλος δείχνει περιοχή χαμηλής οστικής πυκνότητας λόγω της οστεοπόρωσης ενώ το κόκκινο βέλος δείχνει σπασμένη αμυλοειδή πρωτεΐνη.

Στο οστεοπορωτικό δείγμα 2, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το δείγμα αυτό δεν ήταν απλώς οστεοπορωτικό, αλλά καρκινικό. Συγκρίνοντας το δείγμα 2 με το καρκινικό δείγμα 5, το μοτίβο των ταινιών είναι ταυτόσημο(Σχήμα 6.6). Αυτό σημαίνει ότι η οστεοπόρωση ήταν απλώς μια επίπτωση του καρκίνου στο δείγμα 2, εκφυλίζοντας τον οστίτη ιστό, ενώ στην ουσία δεν ήταν η αρχική νόσος που επηρέασε τον ασθενή.

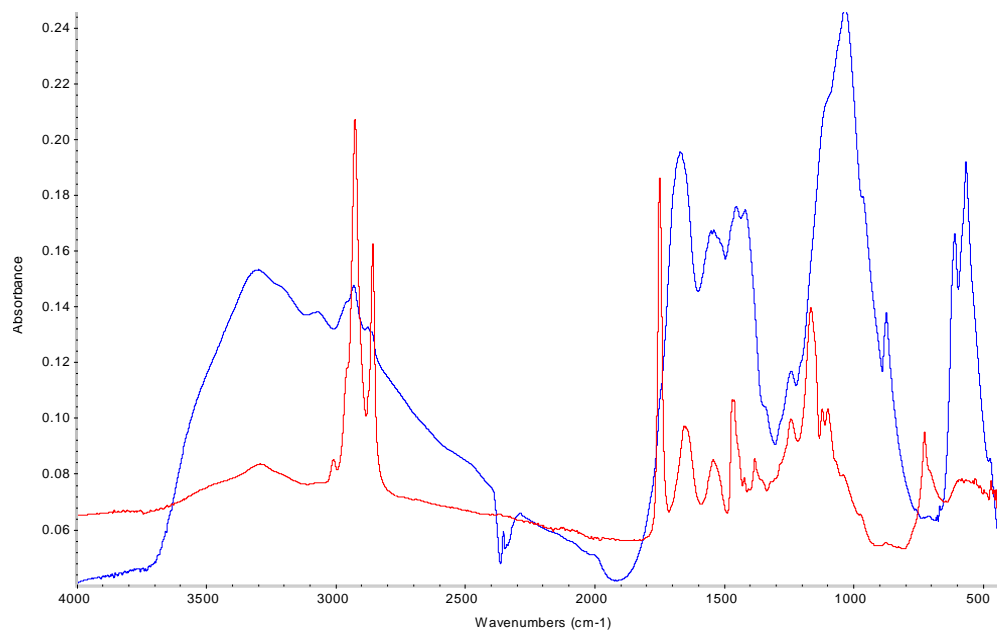


Σχήμα 6.6: Σύγκριση του υπό διερεύνηση οστεοπωρωτικού δείγματος (πράσινο) σε σύγκριση με δείγμα ασθενούς με καρκίνο (κόκκινο). Τα δύο φάσματα είναι σχεδόν ταυτόσημα.

Στα σχήματα 6.7 και 6.8, συγκρίνονται τα δείγμα 3 και 4 με το υγιές δείγμα. Τα δείγμα 3 και 4, προέρχονται και τα δύο από ασθενείς με ιστορικό ΣΔ τύπου II και οστεοπόρωση.



Σχήμα 6.7: Φάσματα υγιούς οστού (κόκκινο) και δείγματος 3, σακχαρώδους διαβήτη και οστεοπόρωσης (πράσινο).



Σχήμα 6.8: Φάσματα υγιούς οστού (μπλε) και δείγματος ασθενούς με σακχαρώδη διαβήτη και οστεοπόρωση (κόκκινο)

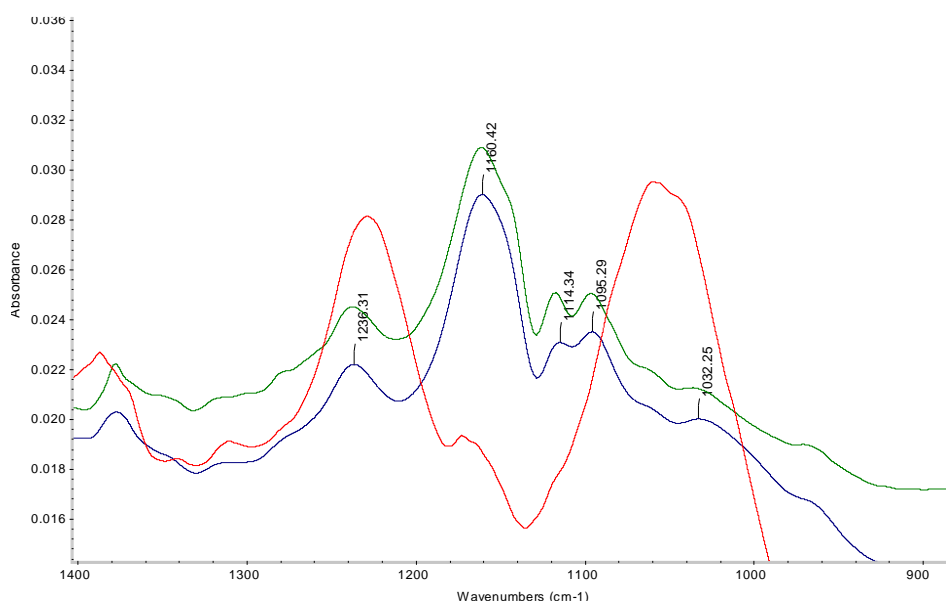
Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι και οι δύο ασθενείς ήταν υπό αγωγή με ινσουλίνη.

Και στις δύο περιπτώσεις, στην περιοχή $3600\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$, το υγιές οστό εμφανίζει πιο έντονες ταινίες που οφείλονται στις δονήσεις τάσεις των ομάδων νOH του υδροξυαπατίτη και νNH των πρωτεϊνών. Παρατηρείται ότι στα φάσματα των ασθενών οι εντάσεις των ταινιών των δονήσεων τάσης των νOH ομάδων του υδροξυαπατίτη μειώνονται. Η μείωση αυτή αποδίδεται στη μείωση της οστικής μάζας των οστών.

Στην περιοχή $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ των οστεοπορωτικών δειγμάτων των ασθενών, η ένταση των ταινιών των συμμετρικών και αντισυμμετρικών δονήσεων τάσης των μεθυλενομάδων αυξάνεται σημαντικά. Η μεταβολή αυτή συνδέεται με την αύξηση οργανικής μάζας και του λιπόφιλου περιβάλλοντος. Παρατηρήθηκε ότι σε ασθενείς με υψηλότερα επίπεδα σακχάρου και ουρικού οξέος στο αίμα, η μεταβολή αυτή ήταν ακόμα μεγαλύτερη. Παράλληλα, στα 3068 cm^{-1} , παρουσιάζεται τερματικός ολεφινικός δεσμός ($\nu=\text{CH}$) ο οποίος υποδεικνύει την αλληλεπίδραση μεμβρανών λιπιδίων και φωσφολιπιδίων με ελεύθερες ρίζες ως αποτέλεσμα οξειδωτικού στρες[50]. Σε συνδυασμό με την ταινία στα

1743 cm^{-1} , όπου τα φάσματα των δειγμάτων 3 και 4 ΣΔ τύπου II και οστεοπόρωσης εμφανίζουν μεγάλη ένταση, φανερώνεται η παρουσία ελευθέρων ριζών και υπεροξείδωση λιπιδίων. Σε αυτό το σημείο υπάρχει πραγματική βλάβη λόγω της νόσου[45].

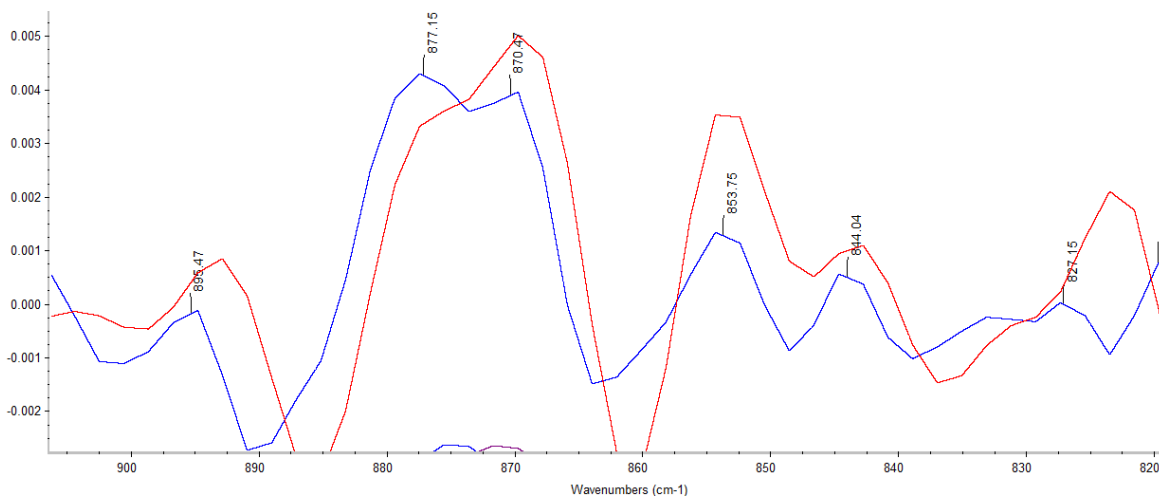
Αξιοσημείωτη παρατήρηση, αποτελεί το αυξημένο ουρικό οξύ που εμφανίζεται και στους δύο ασθενείς. Η αύξηση των εντάσεων των ταινιών στην περιοχή 3000-2800 cm^{-1} παρατηρείται συνήθως σε ασθενείς με υψηλότερα επίπεδα σακχάρου και ουρικού οξέος και επιβεβαιώνει τη σχάση του μήκους της ανθρακικής αλυσίδας των λιπιδίων και πρωτεϊνών και τη μεταβολή της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών[44].



Σημα 6.9: Δείγμα 1 (κόκκινο- ασθενής ηλικίας 81 ετών, έπασχε από ΣΔ τύπου II και ρύθμιζε το σάκχαρο του αίματος με μετφορμίνη), δείγμα 3 (μπλε- ασθενής ηλικίας 72 ετών, έπασχε από ΣΔ τύπου II και ρύθμιζε το σάκχαρο του αίματος με ινσουλίνη) και δείγμα 4 (πράσινο- ασθενής ηλικίας 86 ετών, έπασχε από ΣΔ τύπου II και ρύθμιζε το σάκχαρο του αίματος με ινσουλίνη. Στην ταινία 1160 cm^{-1} φαίνεται ολοκάθαρα η απουσία ουρικού οξέος στο δείγμα 1, το οποίο είναι υπό αγωγή με μετφορμίνη σε αντίθεση με τα δείγματα 3 και 4 που λόγω παρουσίας ινσουλίνης έχουν αυξημένο ουρικό οξύ [52].

Η παρουσία ινσουλίνης λόγω της φαρμακευτικής αγωγής του ασθενούς αυξάνει το ουρικό οξύ στον οργανισμό. Με τη σύγκριση της περιοχής $1100-1200\text{ cm}^{-1}$ των δειγμάτων 3 και 4, δηλαδή του δείγματος οστεοπόρωσης και ΣΔ τύπου II υπό αγωγή με *ινσουλίνη*, σε σχέση με το οστεοπορωτικό δείγμα ΣΔ τύπου II υπό αγωγή με *μετφορμίνη*, επιβεβαιώνεται η συσχέτιση ουρικού οξέος με ινσουλίνη όπως εκφράζεται ξεκάθαρα και στο σχήμα 6.9 στην περιοχή 1160 cm^{-1} [52].

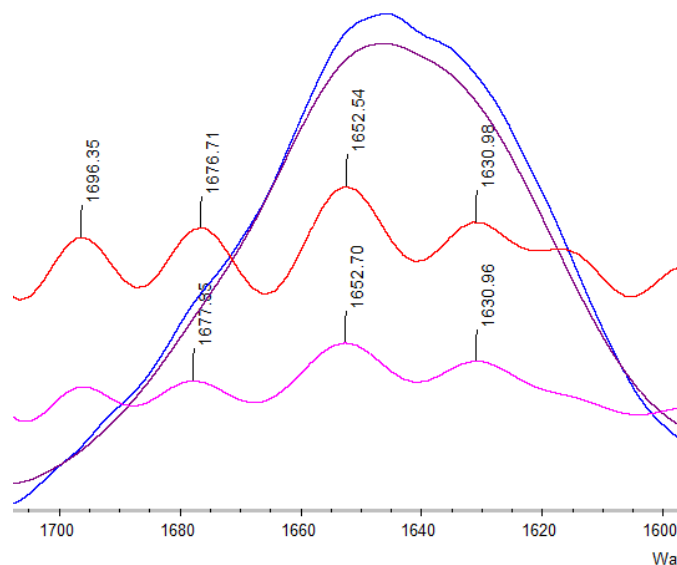
Μελετώντας τα φάσματα με μεγαλύτερη προσοχή, παρατηρείται ότι στην περιοχή 870 cm^{-1} , όπως φαίνεται το Σχήμα 6.10, το οστεοπορωτικό δείγμα 3 σακχαρώδους διαβήτη έχει μειωμένη ένταση σε σύγκριση με το οστεοπορωτικό δείγμα 4 σακχαρώδους διαβήτη. Η περιοχή αυτή υποδηλώνει την παρουσία του αμινοξέος τυροσίνη στον οργανισμό, η οποία εμφανίζεται σε φάσματα ATR-FTIR καρκινικών δειγμάτων. Συμπερασματικά, το δείγμα 3, λόγω αυξημένης παρουσίας τυροσίνης, είναι καρκινικό. Η αυξημένη συγκέντρωση ουρικού οξέος στο δείγμα εξηγεί μεν από την παρουσία ινσουλίνης αλλά ταυτόχρονα, στο καρκίνο δείγμα, δημιουργείται τοπικά ουρικό οξύ όπως και σε οποιοδήποτε σημείο όπου υπάρχει θάνατος κυττάρων[53].



Σχήμα 6.10: Σύγκριση περιοχής $860-880\text{ cm}^{-1}$ των δειγμάτων από ασθενείς που πάσχουν από οστεοπόρωση και σακχαρώδη διαβήτη Τύπου II, δείγματα 3 (κόκκινο) και 4 (μπλε).

Την παρουσία καρκίνου, επιβεβαιώνει το σχήμα 6.11, το οποίο παρουσιάζει τη σύγκριση των φασμάτων των δειγμάτων 3 και 4, οστεοπορωτικών δειγμάτων με ΣΔ τύπου

II, με τη μέθοδο deconvolution στο πρόγραμμα OMNIC. Σε αυτό το σημείο υποδηλώνεται η επίδραση της ασθένειας στη δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών, μεταβάλλοντάς την α-έλικα σε τυχαία περιέλιξη όταν η ασθένεια βρίσκεται σε προχωρημένο στάδιο. Η μεταβολή αυτή καταλήγει σε σχηματισμό ινιδίων και αμυλοειδών πρωτεϊνών[45,47-50].

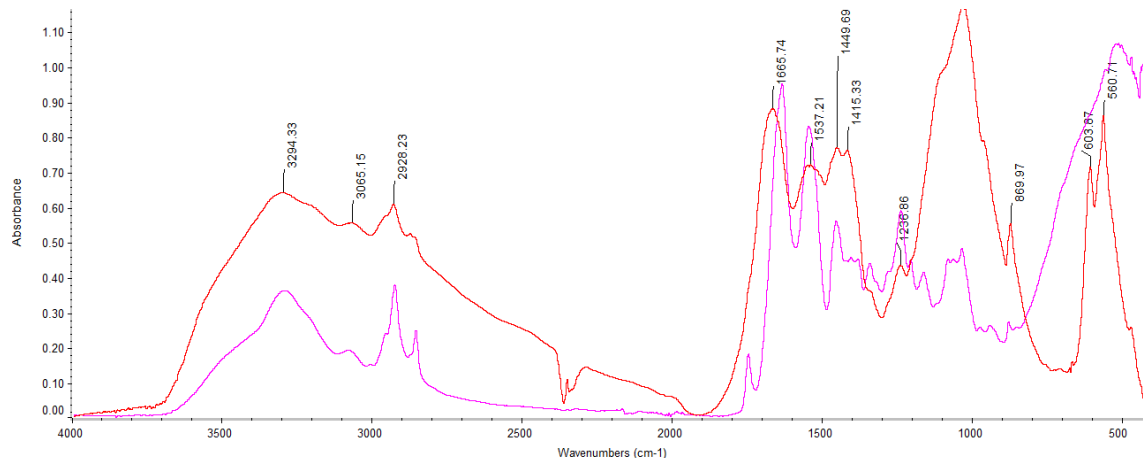


Σχημα 6.11: Δείγμα από ασθενή με οστεοπόρωση και καρκίνο, δείγμα 3 (κόκκινο) και δείγμα ασθενούς με σακχαρώδη διαβήτη Τύπου II και οστεοπόρωση, δείγμα 4 (μοβ). Το κόκκινο φάσμα δείχνει τη χαρακτηριστική διαμόρφωση των αμυλοειδών πρωτεϊνών σε φάσματα ATR-FTIR.

Γ) Επιληπτικός Ασθενής

Στο δείγμα 6, που λήφθηκε από επιληπτικό ασθενή, εμφανίστηκαν εξαιρετικά ενδιαφέρουσες μεταβολές.

Η ταινία 3294 cm^{-1} εμφανίζεται με χαμηλότερη ένταση από το φάσμα ATR-FTIR του υγιούς οστού, υποδηλώνοντας την μείωση της συγκέντρωσης των ομάδων -NH των πρωτεϊνών και την μείωση της οργανικής φάσης του οστού.



Σχήμα 6.12: Σύγκριση υγιούς οστού (κόκκινο) με οστό επιληπτικού ασθενή (μωβ).

Το δείγμα παρουσιάζει και πάλι οξειδωτικό στρες στα 1742 cm^{-1} υποδεικνύοντας δράση ελευθέρων ριζών. Βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν αυτή τη μεταβολή κάνοντας λόγο για σύνδεση των επιληπτικών κρίσεων με το οξειδωτικό στρες.

Το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) σε σχέση με άλλα οργανικά συστήματα είναι πιο ευαίσθητο στη δράση οξειδωτικών ουσιών, όπως τις ελεύθερες ρίζες. Αυτό συμβαίνει λόγω του ότι ο εγκέφαλος χρησιμοποιεί υψηλότερη ποσότητα οξυγόνου σε σύγκριση με άλλα ζωτικά όργανα. Περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις πολυακόρεστων λιπαρών οξέων επιρρεπών σε υπεροξείδωση και είναι πλούσιος σε μέταλλα, όπως σίδηρος, που ευνοεί τον σχηματισμό ριζών υδροξυλίου. Η παρατεταμένη δραστηριότητα επιληπτικών κρίσεων, οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών και η οξείδωση αυτών συμβάλλει στην εγκεφαλική βλάβη που προκαλείται από τις κρίσεις[54].

Στην περιοχή δόνησης κάμψης των CH_2 και της απορρόφηση ανθρακικών ιόντων CaCO_3 , συγκεκριμένα στην ταινία στα 1449 cm^{-1} , παρατηρείται μετατόπιση της ταινίας σε μικρότερους κυματαριθμούς σε σχέση με το υγιές οστό. Ταυτόχρονα στην περιοχή $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ στο φάσμα του επιληπτικού ασθενή, παρατηρούνται οι ταινίες που συνδέονται με τις δονήσεις μορίων υδροξυαπατίτη. Επίσης, ταινίες των δονήσεων τάσης των φωσφορικών ομάδων υδροξυαπατίτη ($1106, 1027$ και 965 cm^{-1}) στο δείγμα έχουν πολύ μειωμένη ένταση και σχεδόν εξαφανίζονται, ως αποτέλεσμα της οστεοπόρωσης που προκαλεί η ασθένεια.

Τα ευρήματα συμβαδίζουν με τη θεωρία. Μελέτες έχουν δείξει ότι η επιληψία και τα επιληπτικά φάρμακα συνδέονται με την ανάπτυξη μεταβολικής νόσου των οστών[55]. Εδώ περιλαμβάνεται η οστεομαλακία, η οστεοπόρωση, η ραχίτιδα, η νόσος Paget's κ.ά[56]. Επομένως, οι φωσφορικές ομάδες υδροξυαπατίτη έχουν μειωμένη ένταση λόγω οστεόλυσης. Στην περιοχή 1100-1300 cm^{-1} , όπου βρίσκονται οι τρεις ώμοι που συνυπάρχουν στο υγιές οστό, το οστό του επιληπτικού ασθενή παρουσιάζεται πιο κρυσταλλικό επειδή υπάρχει μικρότερο ανόργανο περιεχόμενο. Συμπερασματικά, στον επιληπτικό ασθενή εμφανίζεται οστεοπόρωση αλλά δεν είναι γνωστό πόσο ενισχύθηκε από τα επιληπτικά φάρμακα.

Τέλος, στις περιοχές 500-600 cm^{-1} , όπου στο υγιές οστό παρατηρούνται οι ταινίες που αποδίδονται στην παρουσία υδροξυαπατίτη, στο οστό επιληπτικού ασθενή εμφανίζονται ταινίες μεγαλύτερης έντασης που οφείλονται σε δεσμούς S-S θειολών. Η μεταβολή αυτή υποδεικνύει ότι η άμυνα του οργανισμού στον επιληπτικό ασθενή είναι αποδυναμωμένη. [54-56]

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία, εφαρμόστηκαν οι μέθοδοι της Υπέρυθρης Φασματοσκοπίας μετασχηματισμού Fourier με Αποσβένουσα Ολική Ανάκλαση (Attenuated Total Reflectance- Fourier Transform Infrared Spectroscopy, ATR- FTIR) και του Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σάρωσης (Scanning Electron Microscope, SEM) για τη διερεύνηση της επίδρασης διαφόρων ασθενειών στα οστά.

Από τη σύγκριση των φασμάτων σε δείγματα υγιούς οστού και οστών από ασθενείς προέκυψαν σημαντικές μεταβολές στη μοριακή δομή των οστών, οι οποίες παρουσιάζονται, αρχικά, με την αλλαγή της δομής των κολλαγονούχων πρωτεϊνών από α-έλικα σε τυχαία ελικοειδή περιέλιξη.

Από τα πειραματικά αποτελέσματα προέκυψαν τα παρακάτω:

1. Στην περίπτωση των διαβητικών ασθενών

➤ Παρατηρήθηκε μείωση της έντασης των ταινιών και αύξηση του εύρους τους στην περιοχή $3600-2700\text{ cm}^{-1}$, υποδεικνύοντας την παρουσία των αμινομάδων και τη μείωση της οργανικής φάσης του οστού.

➤ Η ταινία στα 1744 cm^{-1} αποδίδεται στις δονήσεις τάσης της ομάδας του καρβονυλίου $\nu\text{C}=\text{O}$, αλδεϋδικού ($-\text{CHO}$) και κετονικού (CO) χαρακτήρα και προκύπτει από την επίδραση των ελευθέρων ριζών.

➤ Παρατηρήθηκε μετατόπιση της ταινίας Amide II, από τα 1650 cm^{-1} στα 1665 cm^{-1} υποδεικνύοντας την αλλαγή της δευτεροταγούς δομής του κολλαγόνου από α-έλικα σε β-διαμόρφωση με αντιπαράλληλη αναδίπλωση, ενώ μειώνεται το λιπόφιλο περιβάλλον.

➤ Τα σάκχαρα παρουσιάζουν μεν τις χαρακτηριστικές ταινίες στις ίδιες περιοχές με τις αντίστοιχες ταινίες του υδροξυαπατίτη, στα $1200-900\text{ cm}^{-1}$, έχοντας δε διαφορετική μορφή. Χαρακτηριστική στο υγιές δείγμα είναι η τριπλή ταινία που εμφανίζεται με μέγιστο περίπου στα 1080 cm^{-1} . Στο φάσμα του διαβητικού ασθενούς

παρατηρείται εξάλειψη των ώμων και μετατόπιση του μεγίστου προς μεγαλύτερους κυματαριθμούς.

➤ Παρατηρήθηκε ότι οι ασθενείς υπό αγωγή με ινσουλίνη είχαν αυξημένο ουρικό οξύ στον οργανισμό σε αντίθεση με τον ασθενή υπό αγωγή με μετφορμίνη, λόγω της παρουσίας της ταινίας στα 1160 cm^{-1} .

2. Στην περίπτωση των καρκινοπαθών

➤ Η ταινία που αντιστοιχεί σε δονήσεις τάσεις των νNH ομάδων του κολλαγόνου, 3300 cm^{-1} , μετατοπίζεται σε μικρότερους κυματαριθμούς (3275 cm^{-1}), ως αποτέλεσμα της μεταβολής της δομής των πρωτεϊνών που προκαλεί η ασθένεια.

➤ Η αυξημένη ένταση της ταινίας που αποδίδεται στην τυροσίνη, στα 870 cm^{-1} καθώς και η τοπική ανάπτυξη ουρικού οξέος μαρτυρούν την παρουσία της ασθένειας.

➤ Παρατηρήθηκε και συνδέθηκε η παρουσία αμυλοειδών πρωτεϊνών και καρκίνου.

3. Στην περίπτωση των επιληπτικών ασθενών

➤ Παρατηρήθηκε ότι η ασθένεια προκάλεσε οστεοπόρωση ενώ μελέτες επιβεβαιώνουν τη θεωρία ότι η επιληψία συνδέεται με την ανάπτυξη μεταβολικής νόσου των οστών. Συγκεκριμένα η κορυφή στα 1449 cm^{-1} που οφείλεται στη δόνηση κάμψης CH_2 και την απορρόφηση ανθρακικών ιόντων CaCO_3 , μετατοπίζεται σε μικρότερους κυματαριθμούς και παρουσιάζει μειωμένη ένταση.

➤ Στην περιοχή $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ παρατηρούνται οι κορυφές που συνδέονται με τις δονήσεις μορίων υδροξυαπατίτη. Στην περιοχή αυτή μειώνεται δραστικά η ένταση των κορυφών που συνδέονται με τον υδροξυαπατίτη, ως αποτέλεσμα της οστεοπόρωσης που προκαλεί η ασθένεια.

Οι απεικονίσεις SEM, επιβεβαίωσαν τα φάσματα ATR-FTIR που ελήφθησαν. Σε οστεοπορωτικά φάσματα, οι απεικονίσεις SEM έδειξαν περιοχές μειωμένης οστικής

πυκνότητας, ενώ σε καρκινικά δείγματα φάνηκαν αμυλοειδείς πρωτεΐνες, χαρακτηριστικές της παρουσίας καρκίνου.

Από τα παραπάνω, συμπεραίνεται ότι η υπέρυθη φασματοσκοπία σε συνδυασμό με την ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης μπορεί να δώσει σημαντικές πληροφορίες για τις προκύπτουσες ασθένειες μέσω της μεταβολής της μοριακής δομής των οστών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Μ. Πετρά, «Μελέτη της εξέλιξης και γήρανσης των οστών με υπέρυθρη φασματοσκοπία και μικρο – φασματοσκοπία. Σύγκριση με παθολογικά οστά και υποκατάστατα οστών» Διδακτορική Διατριβή υποβληθείσα στο Τμήμα Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ, Αθήνα 2003.
- [2] A. Rigutti - A. G. Andruilli, *Atlante di Anatomia*, Milano: Suasetta, 2000. [Ελληνικός τίτλος, «Ανατομία», *Σκελετός και μύες*, Επιμέλεια: Παπούλια Ελένη, Μετάφραση: Παπαζαχαρίας Ηλίας].
- [3] A. Boskey - R. Mendelsohn, “Infrared Analysis of Bone in Health and Disease,” *Journal of Biomed Optics*, 10:3 (2005).
- [4] J. R. Cameron - J. G. Skofronick - R. M. Grant, *Φυσική του ανθρώπινου σώματος*, Αθήνα: Παρισιάνος, 2001
- [5] H. Nancy - W. Wendy - L. Kathryn, *Kinesiology: Scientific Basis of Human Motion*, McGraw-Hill Education, 12 edition, 2011.
- [6] A. L. Kierzenbaum, - L. L. Tres, *Ιστολογία με στοιχεία κυτταρικής Βιολογίας. Εισαγωγή στην ιστοπαθολογία*, Cyprus: Broken Hill Publishers, 2013.
- [7] W. Traub - K. A. Piez, “The Chemistry and Structure of Collagen,” *Advances in Protein Chemistry*, 1971, 243–352.
- [8] Μ. Κοντογιάννη, *Ο πιθανός ρόλος ορμονών του λιπώδους ιστού (Λεπτίνης και αντιπονεκτίνης) στην οστεοπενία περιμμηνοπαυσιακών γυναικών*, Διδακτορική Διατριβή υποβληθείσα στο Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής του Χαροκοπέιου Πανεπιστημίου, Αθήνα 2004.
- [9] https://www.teachpe.com/anatomy/bone_structure.php [last accessed 18/5/19]
- [10] R. B. Martin - D. B. Burr, *Skeletal Tissue Mechanics*, New York: Springer, 1998.
- [11] P. J. Marie, “Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast differentiation,” *Gene* 316 (2003) 23-32.
- [12] <https://slideplayer.gr/slide/12178385/> [last accessed 18/5/19]
- [13] Πάπουτσου Χρυστάλλα, *Αλλαγές στην οστική μάζα μετά από διατροφική παρέμβαση σε μεταεμμηνοπαυσιακές γυναίκες*, Μεταπτυχιακή Διατριβή υποβληθείσα στο Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής του Χαροκοπέιου Πανεπιστημίου, Αθήνα.

- [14] Π. Αθανασίου - Ι. Κώστογλου-Αθανασίου, «Οστεοπόρωση. Η Σιωπηλή Νόσος», *Η Ιατρική Σήμερα*, 53, 33-41
- [15] P. G. Robey - A. L. Boskey, “The Biochemistry of Bone,” in R. Feldman - J. Kelsey (Eds), *Osteoporosis*, Academic Press, 1996, 95-183.
- [16] Ν. Κατσίκη - Φ. Ηλιάδης - Α. Ζαντίδης - Τ. Διδάγγελος, «Σακχαρώδης Διαβήτης: Διάγνωση και Ταξινόμηση», *Ελληνικά Διαβητολογικά Χρονικά* 23:1 (2010) 78-86.
- [17] M. Lawrence - Stephen Tierney Jr. - J. Mcphee - M. A. Papadakis, “Diabetes Mellitus and Hypoglycemia,” *Current Medical Diagnosis and Treatment*, 2005, 1157-1196.
- [18] W. R. Rowley - C. Bezold - Y. Arikan - E. Byrne - S. Krohe, “Diabetes 2030: Insights from Yesterday, Today, and Future Trends,” *Population Health Management*, 20:1 (2017) 6-12.
- [19] Φαινέκος, *Διάγνωση και ταξινόμηση του σακχαρώδη διαβήτη και της δυσανεξίας στη γλυκόζη*, Εντατική Εκπαίδευση στην ενδοκρινολογία: 12^{ος} Κύκλος-Σακχαρώδης Διαβήτης, 2009
- [20] Ε. Λιόρδα - Φ. Ηλιάδης - Τ. Διδάγγελος - Α. Χατζητόλιος, «Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2 και άσκηση», *Ελληνικά Διαβητολογικά Χρονικά* 27:4 (2014) 210-220.
- [21] Μ. Τζιομάκης - Ι. Γ. Γιώβος, «Σακχαρώδης Διαβήτης και Οστεοπόρωση», *Ελληνικά Διαβητολογικά Χρονικά* 27:2 (2014) 98-110.
- [22] Β. Γροσομανίδης - Μ. Ζούκα - Δ. Βασιλάκος, «Ορθοπαιδικές Κακώσεις», *Θέματα Αναισθησιολογίας και εντατικής Ιατρικής*, Τόμος 12, Τεύχος 24/21, 2002.
- [23] R. McRae - M. Esser, [Γενική Επιμέλεια: Σουκάκος Παναγιώτης] *Κλινική Αντιμετώπιση Καταγμάτων-Μέρος Α: Γενικές Αρχές*, 2007.
- [24] Α. Μπανούση, «Οστεοσυνθέσεις: Η εξέλιξη στη χειρουργική Αντιμετώπιση του κατάγματος», *Περιεγχειρητική Νοσηλευτικής ΣΥ.Δ.ΝΟ.Χ*, Τεύχος 1^ο, 2011
- [25] Α. Μαυρογέννης - Ι. Χατζηκομνηνός - Δ. Κορρές, *Βασικές τεχνικές στην ορθοπαιδική Χειρουργική: Κατάγματα*, 2^η έκδοση, 2010.
- [26] C. D. Yfantis - D. K. Yfantis - J. Anastasopoulou - T. Theophanides - M. Staiger, “New Magnesium Alloys for bone tissue Engineering: in vitro corrosion testing,” *WSEAS Transactions on Environment and Development* 2:8 (2006) 1110-1115.
- [27] Reliable Cancer Therapy, «Ορθοκολικός Καρκίνος: Ένας οδηγός για ασθενείς», *European Society For Mecial Oncology*, 1 (2013).

- [28] N. C. Thomas, “The Early History of Spectroscopy,” *Journal of Chemical Education*, 68:8 (1991).
- [29] Α. Πισσαρίδη, *Φασματοσκοπική Μελέτη ιστών και Βιοϋλικών*, Διδακτορική Διατριβή υποβληθείσα στο Τμήμα Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ, Αθήνα 2012.
- [30] D. A. Skoog - F. J. Holler - S. R. Grouch, *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης*, 6^η έκδοση, Αθήνα 2007.
- [31] Ε. Καλδούδη, «Το φως: χαρακτηριστικά, παραγωγή, αλληλεπίδραση [8]», *Η φυσική της ζωής* [ηλεκτρ. βιβλ.] Αθήνα: Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, 2015.
- [32] <https://www.edmundoptics.com/resources/application-notes/optics/the-correct-material-for-infrared-applications/> [last accessed 18/5/19]
- [33] Μ. Κουή, - Ε. Χειλάκου - Π. Θεοδωρακέας, - Β. Δρίτσα, - Ν. Αβδελίδης, *Μη καταστρεπτικές και φασματοσκοπικές μέθοδοι εξέτασης των υλικών*, Αθήνα: Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, 2015.
- [34] *Υπέρυθρη Φασματοσκοπία*, Εργαστήριο Ανόργανης Χημείας Ι, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων Τμήμα Χημείας, 2013.
- [35] Ε. Χειλακού, *Η Εφαρμογή των Φασματοσκοπικών και Μη Καταστρεπτικών Μεθόδων στο χαρακτηρισμό, τον έλεγχο της φθοράς και τη συντήρηση – αποκατάσταση ιστορικών έργων*, Διδακτορική Διατριβή υποβληθείσα στο Τμήμα Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ, Αθήνα 2011.
- [36] Βαλαβάνη Ευαγγελία, «Διερεύνηση Ταυτοποίησης των Πιγμάτων και της Εφαρμογής τους σε Πίνακες Ζωγραφικής του Θεόφилου Χατζημιχαήλ με Μη Καταστρεπτικές Μεθόδους» [Διπλωματική Εργασία], Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Τομέας ΙΙΙ Επιστήμης και Τεχνικής των Υλικών, Αθήνα, 2016
- [37] <http://chemists.princeton.edu/bernasek/atr-ftir> [Last accessed 13/9/19]
- [38] A. Bogner - P.-H. Journeau - G. Thollet - D. Basset - C. Gauthierm, “A history of scanning electron microscopy developments: Towards “wet-STEM” imaging,” *Science Direct, Micron* 38 (2007) 390-401.
- [39] Μ. Όξενκιουν-Πετροπούλου - Α. Παππά, *Φυσικές Μέθοδοι Ανάλυσης Εργαστηριακές Ασκήσεις*, 3η Έκδοση, Αθήνα: ΕΜΠ, 2009.

- [40] <https://www.abidibo.net/projects/doc/physics/sem/> [last accessed 18/5/19]
- [41] I. Mamarelis - K.Pissarifi - V. Dritsa - P. Kotileas - V. Tsiligiris - V. Tzilalis - J. Anastassopoulou, “Oxidative Stress and Atherogenesis. An FTIR Study,” *In Vivo* 24:6 (2010) 883-888.
- [42] V. Dritsa - K. Pissaridi - E. Koutoulakis - I. Mamarelis - C. Kotoulas - J. Anastassopoulou, “An Infrared spectroscopic study of aortic valve. A possible mechanism of calcification and the role of magnesium salts,” *In Vivo*, 84 (2014) 91-98.
- [43] Μ. Πετρά - Τ. Θεολόγης - Σ. Μιχαηλίδης - Ι. Αναστασοπούλου - Θ. Θεοφανίδης, «Μελέτη της σύστασης και δομής παιδικού οστού με μικρο-υπέρυθρη φασματοσκοπία (micro-FTIR)», *Οστόν*, 13, 2002.
- [44] Ι. Μαμαρέλης - Π. Κοτιλέας - Β. Τσιλιγγίρης - Β. Τζιλιάλης - Κ. Πισσαρίδη - Β. Δρίτσα - Ι. Αναστασοπούλου, Υπεροξειδωση των Καρωτίδων Αρτηριών Κατά το Οξειδωτικό Στρες. FTIR Φασματοσκοπική Μελέτη. *Ελληνική Καρδιολογική Επιθεώρηση*, 52 (2011) 117-123.
- [45] J. Anastassopoulou - M. Kyriakidou - S. Kyriazis - T.H. Kormas - F. Mavrogenis - V. Dritsa - P. Kolovou - T. Theophanides, *An FTIR Spectroscopic Study of Metastatic Cancerous Bone*, In *Infrared Spectroscopy-Anharmonicity of Biomolecules, Crosslinking of Biopolymers, Food Quality and Medical Applications* (Ed. T. Theophanides), InTech, Europa, 2015, 89-100.
- [46] https://proteopedia.org/wiki/index.php/Collagen_Structure_%26_Function [last accessed 18/5/19]
- [47] J. Anastassopoulou - M. Kyriakidou - S. Kyriazis - V. Dritsa - T. Kormas T., “Protein folding and cancer,” *Anticancer Res*, 34:10 (2014) 5806-5709.
- [48] M. Petra - J. Anastassopoulou - T. Theologis - T. Theophanides, “Synchrotron micro-FTIR spectroscopic evaluation of normal paediatric human bone,” *Journal of Mol Structure*, 78 (2005) 101-110.
- [49] J. Anastassopoulou - P. Kolovou - A. Mavrogenis, “Bone and Cancer. A synchrotron micro- infrared study,” *Metal Ions Biol. Medic.* 10 (2008) 210-213.
- [50] J. Anastassopoulou - M. Kyriakidou - S. Kyriazis - A. F. Mavrogenis - V. Mamareli - I. Mamarelis - M. Petra - E. Malesiou - C. Kotoulas - P. Kolovou - E. Koutoulakis - A.

- Markouizou - T. Theophanides, "Oxidative stress in ageing and disease development studied by FTIR spectroscopy," *Mechanisms of Ageing and Development*, 2017.
- [51] J. Anastassopoulou - M. Kyriakidou - A. E. Mavrogenis - P. J. Papagelopoulos - T. Theophanides, "Demineralization of bones due to breast cancer metastasis: An Infrared study," *Met. Ions Biol. Med.*, 2011
- [52] A. Gill - S. Kukreja - N. Malhotra - N. Chhabra, "Correlation of the Serum Insulin and the Serum Uric Acid Levels with the Glycated Haemoglobin Levels in the Patients of Type 2 Diabetes Mellitus," *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 7:7 (2013) 1295-1297.
- [53] A. Yiu - M. Van Hemelrijck - H. Garmo - L. Holmberg - H. Malmström - M. Lambe - N. Hammar - G. Walldius - I. Jungner - W. Wulaningsih, "Circulating uric acid levels and subsequent development of cancer in 493,281 individuals: findings from the AMORIS Study," *Oncotarget*, 8 (2017) 42332-42342.
- [54] E.-J. Shin - J. H. Jeong - Y. H. Chung - W.-K. Kim - K.-H. Ko - J.-H. Bach - J.-S. Hong - Y. Yoneda - H.-C. Kim, "Role of oxidative stress in epileptic seizures," *Neurochemistry International*, 59:2 (2011) 122-137.
- [55] H. R. Cock, "Bone Health in Epilepsy," *Epilepsy*, 2015.
- [56] J. E. Adams, "Metabolic Bone Disease," *IDKD*, (2005) 90-103.