



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

**Στυλιανός Κυριαζής**  
**Ορθοπαιδικός**

**Φασματοσκοπική μελέτη ασθενειών των  
οστών**

**Διδακτορική Διατριβή**

**Αθήνα, 2016**

**Αφιερώνεται στην οικογένειά μου**

## **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

Ι. Αναστασοπούλου, Επιβλέπουσα, Καθηγήτρια ΕΜΠ  
Π. Μπαλτόπουλος, Αν. Καθηγητής ΕΚΠΑ  
Μ. Κουή, καθηγήτρια ΕΜΠ

## **Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή**

Αναστασοπούλου Ιωάννα, Καθηγήτρια ΕΜΠ  
Θεοφανίδης Θεόφιλος, Ομ. Καθηγητής ΕΜΠ  
Κουή Μαρία, Καθηγήτρια ΕΜΠ  
Π. Μπαλτόπουλος, Αν. Καθηγητής ΕΚΠΑ  
Δημοτικάλη Δήμητρα, καθηγήτρια ΕΜΠ  
Μαυρογένης Ανδρέας, Επ. Καθηγητής, ΕΚΠΑ  
Ράλλης Μιχαήλ, Επ. Καθηγητής, ΕΚΠΑ

Η διατριβή εγκρίθηκε την 19<sup>η</sup> Οκτωβρίου 2016

*Η έγκριση της Διδακτορικής διατριβής από την Ανώτατη Σχολή Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ. Πολυτεχνείου δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα (Ν. 5343/1932, αρ.202).*

Αφιερώνεται στην οικογένειά μου

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στα πλαίσια των Επιστημονικών Ερευνών που πραγματεύεται το Εργαστήριο Ακτινοχημείας και Βιοφασματοσκοπίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Ευχαριστώ θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια Ιωάννα Αναστασοπούλου για την ανάθεση του θέματος και την συνεχή συμπαράσταση και καθοδήγηση σε όλη την διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Δρ. Θ. Θεοφανίδη, Ομότιμο Καθηγητή του ΕΜΠ, και Πανεπιστημίου Montreal, Επίτιμο Δρ του Πανεπιστημίου της Reims για τις συνεχείς συμβουλές και συμπαράσταση και εκπαίδευση στην βιοφασματοσκοπ.

Τον Δρ Θ. Κορμά, Δ/ντή της Α' Ορθοπαιδικής Κλινικής του Νοσοκομείου «Αγ Σάββας,», τον Καθηγητή. Παπαγγελόπουλο Δ/ντή της Α' Ορθοπαιδικής Κλινικής «ΠΓΝ ΑΤΤΙΚΟΝ» και Α. Μαυρογένη τον Επ. Καθηγητή Α' Ορθοπαιδικής Κλινικής «ΠΓΝ ΑΤΤΙΚΟΝ» για την διάθεση των δειγμάτων, τους ευχαριστώ ιδιαίτερα.

Επίσης ευχαριστώ την Δρ. Μ. Κυριακίδου και Β. Δρίτσα για την βοήθεια που παρείχαν κατά την εκτέλεση των πειραμάτων και την SEM ανάλυση των δειγμάτων.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Ερευνητές Δρ Δ. Τσιούρβα και Δρ. Ωρ. Σιδεράτου για την φιλοξενία και βοήθεια στο Εργαστήριο Οργανωμένων Υπερμοριακών Νανούλικών, όπου διεκπεραιώθηκε μεγάλο τμήμα της διατριβής.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b>	4
<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b>	12
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	14
<b>ABSTRACT</b>	16
<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	18
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1</b>	19
<b>1.1 ΟΣΤΙΤΗΣ ΙΣΤΟΣ</b>	19
<b>1.2 ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΟΣΤΟΥ</b>	19
1.2.1. Αδιαφοροποίητα κύτταρα	20
1.2.2. Οστεοβλάστες	20
1.2.3 Οστεοκύτταρα	22
1.2.4 Οστεοκλάστες	23
1.2.5 Κύτταρα επιφανείας	24
1.2.6 Μεσοκυττάρια ουσία	25
1.2.7. Ανόργανη ουσία	26
1.2.8 Οργανική φάση	27
<b>1.3 ΤΥΠΟΙ ΟΣΤΙΤΗ ΙΣΤΟΥ</b>	28
1.3.1 Φλοιώδες οστούν	29
1.3.2 Σπογγώδες οστό	31
<b>1.4 ΑΙΜΑΤΩΣΗ ΟΣΤΟΥ</b>	32
<b>1.5 ΟΣΤΙΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ</b>	35
1.5. 1 Αναπτυξιακή δυσπλασία του ισχίου	35
1.5.1. 1 Επιδημιολογία	36
1.5.1. 2 Παθογένεια	36
1.5.1. 3Κλινικά χαρακτηριστικά	36
1.5.1. 4 Διαγνωστικά ευρήματα	37
1.5.1. 5 Θεραπεία	38
1.5. 2 Δυσπλασία του ισχίου σε ενήλικες	38
1.5.2. 1 Παθογένεια	38
15.2. 2 Κατάταξη	38
1.5.2. 3 Κλινικά ευρήματα	39
1.5.2. 4 Ακτινολογικά ευρήματα	39
1.5.2. 5 Θεραπεία	40
<b>1.6 ΑΣΗΠΤΗ ΝΕΚΡΩΣΗ ΜΗΡΙΑΙΑΣ ΚΕΦΑΛΗΣ</b>	41
1.6. 1 Παθογένεια	41
1.6. 2 Επιδημιολογία	42
1.6. 3 Κλινική εικόνα	42
1.6. 4 Διαγνωστικές εξετάσεις	43

1.6. 5 Σταδιοποίηση	43
1.6. 6 Θεραπεία	44
<b>1. 7 ΕΚΤΟΠΗ ΟΣΤΕΟΠΟΙΗΣΗ</b>	45
1.7. 1 Παθογένεια	45
1.7. 2 Θεραπεία	46
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2</b>	47
<b>ΥΠΕΡΥΘΡΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ</b>	47
<b>2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	47
<b>2. 2 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΕ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ FOURIER (Fourier Transform Infrared, FT-IR)</b>	48
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3</b>	51
<b>3.1 ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ ΣΑΡΩΣΗΣ</b>	51
3. 1.1 Ιστορική αναδρομή	51
3.1. 2 Αρχές λειτουργίας	52
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4</b>	54
<b>4 ΠΕΡΙΘΛΑΣΙΜΕΤΡΟ ΑΚΤΙΝΩΝ Χ-</b>	54
<b>4.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ</b>	54
<b>4.2. ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ</b>	55
<b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	56
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5</b>	57
<b>5.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ</b>	57
4.1.1 Υλικά	57
4.1.1.a Λήψη δειγμάτων ανθρώπινου οστού	57
4.1.1.b Επεξεργασία των δειγμάτων	58
4.1.1.c. Προετοιμασία των δειγμάτων και συλλογή των δεδομένων	58
<b>5.1.2. Μέθοδοι</b>	59
4.1.2.a Μικροτόμος-Λήψη μικροτομών	59
4.1.2. β ATR-FT-IR φάσματα	59
4.1.2. γ Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM)	61
5.1.2.δ. περίθλαση ακτίνων X (XRD)	61
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	62
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6</b>	63
<b>6.1 FT-IR ΦΑΣΜΑΤΑ ΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΟΣΤΩΝ</b>	63
6.1.1 Σύγκριση μεταξύ φλοιώδους και σπογγώδους δυσπλαστικού οστού	72
6.1.2 FT-IR φάσματα χόνδρου ασθενών με δυσπλασία	75
6.1.3 SEM ανάλυση δυσπλαστικών οστών	80
<b>6.2. FT-IR ΦΑΣΜΑΤΑ ΟΣΤΩΝ ΑΣΘΕΝΟΥΣ ΜΕ ΑΓΚΥΛΟΠΟΙΗΤΙΚΗ ΣΠΟΝΔΥΛΙΤΙΔΑ</b>	87
<b>6.3 FT-IR ΦΑΣΜΑΤΑ ΟΣΤΕΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΜΑΛΑΚΩΝ ΙΣΤΩΝ</b>	88
<b>6.4 FT-IR ΦΑΣΜΑΤΑ ΟΣΤΩΝ ΑΠΟ ΧΑΛΑΡΩΣΗ ΟΛΙΚΗΣ</b>	95

<b>ΑΡΘΡΟΠΛΑΣΤΙΚΗΣ ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΓΟΝΑΤΟΣ ΚΑΙ ΙΣΧΙΟΥ</b>	
<b>6.5 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΦΑΣΜΑΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΜΕ ΡΕΥΜΑΤΟΕΙΔΗ ΑΡΘΡΙΤΙΔΑ ΚΑΙ ΑΡΘΡΙΤΙΔΑ</b>	97
<b>6.6 FT-IR ΦΑΣΜΑΤΑ ΟΣΤΕΟΝΕΚΡΩΤΙΚΩΝ ΟΣΤΩΝ</b>	99
<b>6.7 FT-IR ΦΑΣΜΑΤΑ ΟΣΤΩΝ ΑΣΘΕΝΟΥΣ ΜΕ ΣΥΓΓΕΝΕΣ ΕΞΑΡΘΡΗΜΑ</b>	103
<b>6.8 FT-IR ΦΑΣΜΑΤΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΟΣΤΩΝ</b>	106
<b>6.9 SEM-EDX ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΟΣΤΩΝ</b>	111
<b>6.10 XRD ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΟΣΤΩΝ</b>	113
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	114
<b>ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΤΗΉΡΕΥΝΑΣ</b>	116
 <b>ΣΧΗΜΑΤΑ</b>	
 <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1</b>	
<i>Σχήμα 1. 1 Χημικός τύπος βιολογικού υδροξυαπατίτη με τις δυνατές αντικαταστάσεις των κατιόντων και ανιόντων.</i>	26
 <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2</b>	
<i>Σχήμα 2. 1 Η υπέρυθρη περιοχή του υπερύθρου φάσματος. Όρια του εγγύς, μέσου και άπω υπερύθρου με τις αντίστοιχες ενέργειές τους.</i>	49
<i>Σχήμα 2. 2 Συμβολόμετρο Michelson. (Π = πηγή, M1 = κάτοπτρο μίξης, M1' = είδωλο του M1 όπως φαίνεται από τη θέση A, M2 = κινητό κάτοπτρο, B = διαιρέτης δέσμης (chopper) και A = αναλυτής</i>	49
 <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3</b>	
<i>Σχήμα 3. 1 Σχηματική παράσταση της αρχής λειτουργίας SEM. Φαίνονται τα βασικά τμήματα του οργάνου</i>	52
 <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4</b>	
<i>Σχήμα 4.1 Νόμος Bragg</i>	54
<i>Σχήμα 4.2 A; Αρχή λειτουργίας XRD. Το δείγμα τοποθετείται σε περιστρεφόμενο δίσκο και καταγράφονται οι συμβαλλόμενες ακτίνες X, B; γράφημα XRD και Γ; Συσκευή XRD</i>	55
 <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5</b>	
<i>Σχήμα 5. 1 Αρχή λειτουργίας ATR-FT-IR φασματοφωτομέτρου. Η υπέρυθρη ακτινοβολία προσπίπτει πάνω στο δείγμα μέσω ενός κρυστάλλου πολλαπλής ολικής ανάκλασης. Ο κρύσταλλος από αδάμαντα επιτρέπει την μείωση της δέσμης και επομένως την διακριτική ικανότητα.</i>	60
 <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6</b>	
<i>Σχήμα 6. 1 FT-IR φάσματα οστών 1; Υγιούς οστού και 2; Δυσπλαστικού οστού στην περιοχή του φάσματος</i>	63

<b>Σχήμα 6. 2</b> FT-IR φάσματα οστών: <i>a</i> ; υγιούς οστού και <i>b</i> ; δυσπλαστικού οστού στην περιοχή 4000-400 $\text{cm}^{-1}$ .	67
<b>Σχήμα 6. 3</b> Δονήσεις των ατόμων τάσης και κάμψης στον πεπτιδικό δεσμό	68
<b>Σχήμα 6. 4</b> Τριπλή $\alpha$ -έλικα του κολλαγόνου, τυχαία περιέλιξη και οι χημικοί τύποι των αμινοξέων από τα τα οποία σχηματίζεται. <i>a</i> : προλίνη, <i>b</i> : υδροξυπρολίνη και <i>c</i> : γλυκίνη.	70
<b>Σχήμα 6. 5</b> FT-IR φάσματα δυσπλαστικού οστού: <i>a</i> ; Φλοιώδους και <i>b</i> ; Σπογγώδους στην περιοχή 4000-400 $\text{cm}^{-1}$	73
<b>Σχήμα 6. 6</b> Σχηματική παράσταση της δομής των μακρομορίων που σχηματίζουν μεμβράνες. Φαίνεται το υδρόφιλο και υδρόφοβο τμήμα των μορίων	74
<b>Σχήμα 6. 7</b> FT-IR φάσματα φλοιώδους, σπογγώδους οστού και του φάσματος μετά την αφαίρεσή τους στην περιοχή 4000-400 $\text{cm}^{-1}$ .	74
<b>Σχήμα 6. 8</b> FT-IR φάσματα φλοιώδους, σπογγώδους οστού και του φάσματος μετά την αφαίρεσή τους στην περιοχή 1200-800 $\text{cm}^{-1}$ .	75
<b>Σχήμα 6. 9</b> FT-IR φάσματα χόνδρων που λήφθηκαν από ασθενείς με δυσπλασία οστών στην περιοχή 4000-400 $\text{cm}^{-1}$ .	76
<b>Σχήμα 6. 10</b> FT-IR φάσμα ( <i>a</i> ) χόνδρου οστών με δυσπλασία και ( <i>b</i> ) deconvolution στην περιοχή 3600-3000 $\text{cm}^{-1}$ .	76
<b>Σχήμα 6. 11</b> Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των ομάδων NH και C=O των πεπτιδικών δεσμών.	77
<b>Σχήμα 6. 12</b> Χημικός τύπος των μονομερών διασακχαριτών τα οποία αποτελούν τον σκελετό των γλυκοζαμινογλυκανών του αρθρικού χόνδρου.	78
<b>Σχήμα 6. 13</b> Σχηματική παράσταση των αλυσιδωτών αντιδράσεων οξειδοαναγωγής που λαμβάνουν χώρα στον οργανισμό παρουσία μεταλλικών ιόντων	85
<b>Σχήμα 6. 14</b> FT-IR φάσματα σπογγώδους, υποχόνδριου και φλοιώδους οστού ασθενούς με δυσπλασία στην περιοχή 4000-400 $\text{cm}^{-1}$ .	85
<b>Σχήμα 6. 15</b> Deconvolution των FT-IR φασμάτων σπογγώδους, υποχόνδριου και φλοιώδους οστού ασθενούς με δυσπλασία στην περιοχή 3600-300 $\text{cm}^{-1}$ .	86
<b>Σχήμα 6. 16</b> FT-IR φάσματα οστών ασθενούς με αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα δεξιού ισχίου. <i>a</i> ; σπογγώδες, <i>b</i> ; υγιές και <i>c</i> ; Φλοιώδες οστό.	87
<b>Σχήμα 6. 17</b> FT-IR φάσματα: <i>a</i> ; έκτοπου οστού αριστερού ισχίου ασθενούς 31 έτους και <i>b</i> ; υγιούς οστού στην περιοχή 4000-400 $\text{cm}^{-1}$ .	89
<b>Σχήμα 6. 18</b> FT-IR φάσματα: <i>a</i> ; έκτοπου οστού αριστερού ισχίου ασθενούς 31 έτους και <i>b</i> ; Επασβεστωμένης αορτικής βαλβίδας στην περιοχή 4000-400 $\text{cm}^{-1}$ .	91
<b>Σχήμα 6. 19</b> FT-IR φάσματα: <i>a</i> ; υγιούς οστού, <i>b</i> έκτοπου οστού αριστερού ισχίου ασθενούς 31 έτους και <i>c</i> ; Επασβεστωμένης αορτικής βαλβίδας στην περιοχή 4000-400 $\text{cm}^{-1}$ .	92
<b>Σχήμα 6. 20</b> Καταβολισμός της ATP κατά την διάρκεια ισχαιμικού συμβάματος (Πισσαρίδη 2012)	92
<b>Σχήμα 6.21</b> XRD διάγραμμα έκτοπου οστού. Τονίζεται ο σχηματισμός μη βιολογικού υδροξυαπατίτη $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{OH}]$ και $\text{CaHPO}_4$ .	93
<b>Σχήμα 6. 22.</b> FT-IR φάσμα οστού από την περιοχή της χαλάρωσης της αρθροπλαστικής <i>a</i> και <i>b</i> μετά από απομάκρυνση των οργανικών	96



συστατικών

- Σχήμα 6. 23** FT-IR φάσματα οστών: *a*; Υγιές, *b*; με ρευματοειδή αρθρίτιδα και *c* με οσσοαρθρίτιδα στην περιοχή  $1800-700\text{ cm}^{-1}$ . 97
- Σχήμα 6. 24** FT-IR φάσμα οστού *a*; Υγιές *b*; Χόνδρος οστού με οστεονέκρωση και *c*; Υποχόνδριο νεκρωτικού οστού 100
- Σχήμα 6. 25** FT-IR φάσμα οστού δύο διαφορετικών ασθενών: *a*: με οστεονέκρωση και *b*: με οσσοαρθρίτιδα 102
- Σχήμα 6. 26** FT-IR φάσματα οστού ασθενούς με συγγενές εξάρθρημα: 1; Σπογγώδες, 2; Χόνδρος, 3; Σπογγώδες και 4; Φλοιώδες στην περιοχή  $4000-400\text{ cm}^{-1}$ . 103
- Σχήμα 6. 27** FT-IR φάσματα οστού ασθενούς με συγγενές εξάρθρημα στην περιοχή του φάσματος  $1800-400\text{ cm}^{-1}$ .  $\delta\text{CH}_2$  &  $\nu_3\text{CO}_3^{2-}$ , ανθρακικός απατίτης τύπου B 104
- Σχήμα 6. 28** FT-IR φάσματα οστού ασθενούς με συγγενές εξάρθρημα στην περιοχή του φάσματος των δονήσεων Amide I και Amide II στην περιοχή  $1800-1500\text{ cm}^{-1}$ . 105
- Σχήμα 6. 29** Δευτεροταγής δομή αμυλοειδούς τύπου πρωτεϊνών. A: αντιπαράλληλη διάταξη, B: παράλληλη διάταξη σε β-επίπεδα και Γ: Σχηματισμός β-έλικας 105
- Σχήμα 6. 30** FT-IR φάσματα *a*: καρκινικού οστού και *b*: υγιούς οστού 107
- Σχήμα 6. 31** FT-IR φάσματα από ασθενείς με διαφορετικές ασθένειες 108
- Σχήμα 6. 32** FT-IR φάσματα των περιοχών  $3000-2850\text{ cm}^{-1}$  και  $1800-1700\text{ cm}^{-1}$  όπου εμφανίζονται οι δονήσεις που χαρακτηρίζουν την συμπεριφορά των μεμβρανών και της υπεροξειδωσις, αντίστοιχα. 109
- Σχήμα 6. 33** Σχηματική παράσταση της επίδρασης του οξειδωτικού στρες στην παραγωγή συσσωματωμάτων 110
- Σχήμα 6. 34** SEM-EDX ανάλυση οστού από ασθενή με συγγενές εξάρθρημα. Ανιχνεύονται τα στοιχεία Mg, Al και Si, συστατικά σιλικόνης από εμφύτευμα. 112
- Σχήμα 6.35** XRD διαγράμματα *a*; σπογγώδους οστού από βραχίονα ασθενούς με μεταστατικό καρκίνο των οστών από πρωτοπαθή εστία μαστού και *b*; Υδροξυαπατίτης. 1:βιολογικός υδροξυαπατίτης  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ , 2; ανόργανος απατίτης  $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}]$  και 3;όξινο φωσφορικό ασβέστιο  $\text{CaHPO}_4$ . 113

## ΕΙΚΟΝΕΣ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

- Εικόνα 1. 1.** Οστικά κύτταρα: Οστεοβλάστες, οστεοκλάστες, οστεοκύτταρα. 21
- Εικόνα 1. 2.** SEM απεικόνιση οστεοκλάστη (Bronpe 1992) 24
- Εικόνα 1. 3** Δομή των πρωτογλυκανών (μονομερή και συσσωματώματα) 28
- Εικόνα 1. 4.** Σύστημα του Havers ή οστεώνας 29
- Εικόνα 1. 5.** Κανάλι του Volkmann 30
- Εικόνα 1. 6.** Αβερσιανά συστήματα, με απεικόνιση του προσανατολισμού των ινιδίων κολλαγόνου στα διαδοχικά οστικά πετάλια, 2. Εξωτερικά 31

κυκλοτερή οστικά πετάλια, με απεικόνιση του προσανατολισμού των ινιδίων κολλαγόνου στα διαδοχικά πετάλια, 3. Διάμεσα (interstitial) πετάλια, 4. Ίνες του Sharpey (συστατικό του περιοστέου), 5. Αιμοφόρα αγγεία, 6. Περιοστέο (αποτελείται από την εξωτερική ινώδη στιβάδα και την εσωτερική οστεογεννητική στιβάδα), 7. Κανάλι του Volkmann, 8. Αβερσιανό σύστημα σε οβελιαία διατομή, 9. Ενδόστέο, 10. Σπογγώδες οστό, με τις χαρακτηριστικές δοκίδες, 11. Εσωτερικά κυκλοτερή οστικά πετάλια, 12. Οστεώνας με τα χαρακτηριστικά οστεοκύτταρα μεταξύ των πεταλίων

<b>Εικόνα 1. 7</b> Οι φάσεις του κύκλου της οστικής αναμόρφωσης που παρατηρούνται στο (Α) σπογγώδες και (Β) φλοιώδες οστό του ενήλικα	32
<b>Εικόνα 1. 8</b> Τριχοειδή αγγεία οστού στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.	35
<b>Εικόνα 1. 9</b> Κλινικά σημεία Barlow και Ortolani.	37
<b>Εικόνα 1. 10</b> Ακτινολογικός έλεγχος για τη διάγνωση της νόσου	37
<b>Εικόνα 1. 11.</b> Ταξινόμηση δυσπλασίας ισχίου κατά Χαρτοφυλακίδη	39
<b>Εικόνα 1. 12</b> Σημείο crossover	40
<b>Εικόνα 1. 13</b> Οστεοτομία Ganz	41
<b>Εικόνα 1. 14</b> Μηνοειδές σημείο (crescent sign) σε ακτινογραφία ισχίου	43
<b>Εικόνα 1. 15 .</b> Σταδιοποίηση Ficat	44
<b>Εικόνα 1.16.</b> Έκτοπη οστεοποίηση ισχίου	45
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2</b>	
<b>Εικόνα 2. 1.</b> Η υπέρυθρη φασματοσκοπία διαδόθηκε ταχύτατα τις δεκαετίες 1850 και 1900.	47
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5</b>	
<b>Εικόνα 5. 1</b> Μικροτόμος Struers Minitom	59
<b>Εικόνα 5. 2.</b> Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Fei Co, The Netherlands.)	61
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6</b>	
<b>Εικόνα 6. 1</b> Χαρακτηριστική απεικόνιση με ακτίνες X δυσπλαστικού- εξαρθρωμένου ισχίου, με αποπλάτυνση της μηριαίας κεφαλής και βραχύ-διευρυμένο αυχένα.	67
<b>Εικόνα 6. 2</b> SEM μορφολογική απεικόνιση της αρχιτεκτονικής της επιφάνειας δυσπλαστικού οστού. Φαίνεται η καταστροφή της α-έλικας σε τυχαία περιέλιξη και ο σχηματισμός συσσωματωμάτων. Το βέλος δείχνει την θέση διακλαδούμενου πολυμερισμού. Κλίμακα 300 μm	81
<b>Εικόνα 6 3</b> ImageJ ανάλυση στην θέση του διακλαδούμενου δεσμού. Το βέλος δείχνει την θέση διακλαδούμενου δεσμού της Εικόνας 5.2.	82
<b>Εικόνα 6. 4</b> Α: SEM μορφολογία οστού με δυσπλασία. Η λευκή επιφάνεια είναι συσώρευση σιδήρου. Β: EDX ανάλυση της λευκής επιφάνειας	83
<b>Εικόνα 6. 5.</b> Ακτινογραφίες και αξονικές τομογραφίες αριστερού ισχίου ασθενούς 31 ετών, μετά από ρήξη ανευρύσματος της πρόσθιας αναστομωτικής αρτηρίας. Α Β C D	88
<b>Εικόνα 6. 6.</b> SEM μορφολογική απεικόνιση της επιφάνειας έκτοπου οστού. Α; γενική μορφολογία της επιφάνειας του έκτοπου οστού και τα σχηματισθέντα	94

ινίδια, B; Ο κύκλος δείχνει την εμφανή θέση παράπλευρου πολυμερισμού, C; ImageJ ανάλυσης στην θέση του παράπλευρου

- Εικόνα 6. 7** SEM μορφολογική απεικόνιση της επιφάνειας επασβεστωμένης αορτικής βαλβίδας. A; γενική μορφολογία των επιμεταλλώσεων και ινιδίων, B; Το βέλος δείχνει την θέση του παράπλευρου πολυμερισμού των πρωτεϊνών και το αποτέλεσμα της ImageJ ανάλυση και C; Θ θέση του διασταυρούμενου πολυμερισμού με την αντίστοιχη ImageJ ανάλυση. (Κλίμακα 300 μm, M200x)
- Εικόνα 6. 8.** Σχηματική παράσταση των παράλληλων β-επιπέδων τα οποία φέρουν τα υδρόφιλα τμήματα στο εσωτερικό τους (τερματικά N, C)
- Εικόνα 6. 9** SEM απεικόνιση της μορφολογίας του οστού ασθενούς με συγγενές εξάρθρημα του ισχίου
- Εικόνα 6. 10** SEM απεικόνιση οστού ασθενούς με μετάσταση από πρωτοπαθή εστία μαστού. Τα βέλη δείχνουν τα συσσωματώματα των αμυλοειδούς τύπου πρωτεϊνών

## ΠΙΝΑΚΕΣ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

- Πίνακας 1. 1** Ρύθμιση της λειτουργίας των οστικών κυττάρων 25
- Πίνακας 1. 2** Σταδιοποίηση άσηπτης νέκρωσης μηριαίας κεφαλής κατά Ficat. 44

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

- Πίνακας 5.1.** Χαρακτηριστικά των ασθενειών των ληφθέντων δειγμάτων από ασθενείς ηλικίας 31 έως 87 ετών 57

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

- Πίνακας 6. 1** Χαρακτηρισμός των δονήσεων των πεπτιδικών δεσμών 69
- Πίνακας 6. 2** Χαρακτηριστικές ταινίες απορρόφησης IR σε συνάρτηση με την διαμόρφωση της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών 69
- Πίνακας 6.3** Χαρακτηριστικές ταινίες απορρόφησης υγιούς και έκτοπου οστού 90

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Παρόλη την πρόοδο των διαγνωστικών μεθόδων είτε απεικονιστικών, είτε αιματολογικών δεν έχει ακόμη αποσαφηνισθεί σε πλειάδα ορθοπαιδικών παθήσεων η αιτία της βλάβης σε μοριακό επίπεδο. Παράδειγμα τέτοιων παθήσεων αποτελούν η έκτοπος οστεοποίηση, η δυσπλασία του ισχίου, η άσηπτος νέκρωση του ισχίου, οι οστεοβλαστικές και οστεολυτικές νεοπλασματικές βλάβες και άλλες παθήσεις. Οι ιατροί θεραπεύουν τις άνωθεν ασθένειες εμπειρικά και μη γνωρίζοντας το γενεσιουργό αίτιο.

Επιπλέον, καθώς τα βιοϋλικά αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της ορθοπαιδικής χειρουργικής, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η αλληλεπίδραση τους με τους περιβάλλοντες ιστούς, καθώς επίσης και η δυνατότητα μετανάστευσης στοιχείων τους σε απομακρυσμένες θέσεις. Η βιοσυμβατότητα των ορθοπαιδικών βιοϋλικών, είτε μεταλλικών, κεραμικών, ή πολυμερών αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την ευόδωση του σκοπού για τον οποίον χρησιμοποιούνται. Γνωστές χρήσεις των βιοϋλικών στην ορθοπαιδική είναι η οστεοσύνθεση καταγμάτων, η σταθεροποίηση της σπονδυλικής στήλης, η αντικατάσταση των αρθρώσεων (αρθροπλαστική), και η αποκατάσταση μαζικών οστικών ελλειμμάτων έπειτα από λοιμώξεις και νεοπλασματικές νόσους. Παρόλη την βελτίωση και εξέλιξη των βιοϋλικών, τόσο τα ίδια τα υλικά όσο και τα προϊόντα φθοράς τους αντιδρούν με τους ιστούς και προκαλούν τοπικές ή γενικευμένες (π.χ. αλλεργία στο Ni) αντιδράσεις, που επηρεάζουν αρνητικά το κλινικό αποτέλεσμα και την υγεία του ασθενούς. Είναι γνωστή η μετανάστευση ιόντων και σωματιδίων διάσπασης των βιοϋλικών μέσω των λεμφαγγείων και του αίματος, με άγνωστης έκτασης παρενεργειών στον ασθενή.

Ακόμα και σήμερα ο μεταβολισμός, η χημική σύνθεση και η γεωμετρία του οστού αποτελούν πεδίο έρευνας. Ιδιαίτερη σημασία θα έχει και η αποσαφήνιση της μεταβολής αυτών των παραμέτρων στην περίπτωση παθολογιών του οστού και αλληλεπίδρασής του με βιοϋλικά.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η μη καταστρεπτική φυσικοχημική μέθοδος της υπέρυθρης φασματοσκοπίας με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform

Infrared Spectroscopy, FT-IR). Η μέθοδος στηρίζεται στην αλληλεπίδραση της υπέρυθρης ακτινοβολίας με τα μόρια των οστών, η οποία διεγείρει τις συχνότητες ταλάντωσης των μορίων και εκφράζεται με την δημιουργία του υπέρυθρου φάσματος των χαρακτηριστικών ομάδων στις συχνότητες  $4000-400\text{ cm}^{-1}$ . Πλεονέκτημα της μεθόδου είναι:

1) η απαίτηση ελαχίστου υλικού για την ανάλυση, 2) η διενέργεια της μέτρησης σε φυσιολογικές συνθήκες, αφού δεν απαιτείται ούτε αφαλάτωση των οστών, ούτε αποπρωτεΐνωση, ούτε χρωματισμός των δειγμάτων όπως συμβαίνει στην συμβατική παθολογοανατομική εξέταση, 3) η ταχύτητα (μερικά λεπτά της ώρας) έναντι των άλλων διαγνωστικών μεθόδων και 4) η επαναληψιμότητα. Η μέθοδος επιτρέπει την μελέτη βιοπολυμερών και σύνθετων βιολογικών συστημάτων, όπως τα κύτταρα και οι ιστοί, ενώ παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για τις λειτουργικές ομάδες (π.χ.  $\text{NH}_2$ ,  $\text{C}=\text{O}$ ,  $-\text{OH}$ , κλπ) των πρωτεϊνών, DNA, RNA και τη διαμόρφωση των.

Το οστό είναι σύνθετο βιολογικό υλικό και αποτελείται από οργανικά και ανόργανα συστατικά. Η μελέτη των επιμεταλλωμένων (mineralized) ιστών, όπως του οστού, με την άνωθεν μέθοδο δεν χρειάζεται αφαλάτωση (demineralization), γίνεται σε ελάχιστο χρόνο και δίνει μία δυναμική εικόνα της εξέλιξης της βλάβης, καθιστώντας την ελπιδοφόρο για τη διάγνωση και θεραπεία των ασθενειών των οστών.

Σκοπός της εργασίας είναι η φασματοσκοπική μελέτη της μεταβολής της ανόργανης και οργανικής οστικής φάσης σε παθολογικές καταστάσεις των οστών. Επίσης συμπληρωματική διερεύνηση των βλαβών με μικροσκόπιο SEM παρέχει πρόσθετες πληροφορίες τόσο για την αλληλεπίδραση των βιοϋλικών με το εγγύς και άπω βιολογικό περιβάλλον όσο και για τις συνέπειες του αναπτυσσόμενου οξειδωτικού στρες.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι παθήσεις των παθήσεων των οστών και η θεραπεία τους σχετίζονται άμεσα με την γνώση των βλαβών που προκαλούν οι ασθένειες σε μοριακό επίπεδο των βιολογικών μορίων, ιστών και υγρών του σώματος. Μέχρι σήμερα, πολλές από τις ασθένειες δεν μπορούν να αντιμετωπιστούν μη επεμβατικά, επειδή δεν έχουν παρασκευασθεί φάρμακα τα οποία θα μπορούσαν να επιδιορθώσουν τις βλάβες. Δυστυχώς, μέχρι σήμερα, η συνήθης αντιμετώπιση των περισσότερων ασθενειών είναι η χειρουργική αφαίρεση του τμήματος του οστού που έχει φθαρεί. Η γνώση επομένως των βλαβών οι οποίες προκαλούνται από τις ασθένειες θα μπορούσε ενδεχομένως να οδηγήσει στην ανάπτυξη φαρμάκων και την εξέλιξη της μη επεμβατικής αντιμετώπισης αυτών των ασθενειών .

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν μη καταστρεπτικές μέθοδοι, όπως η υπέρυθρη φασματοσκοπία με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared, FT-IR) και ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) και περίθλαση ακτίνων X (XRD, X-Ray Diffraction).

Για την μελέτη λήφθηκαν δείγματα φλοιώδους και σπογγώδους οστού, καθώς και χόνδρου οστού από 42 ασθενείς ηλικίας 31 έως 87 ετών, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε χειρουργική αντιμετώπιση. Από αυτά 15 προήλθαν από ασθενείς με αναπτυξιακή δυσπλασία του ισχίου, 1 από αγκυλοποιητική αρθρίτιδα του ισχίου, 4 από έκτοπη οστεοποίηση του ισχίου, 3 λόγω οστεονέκρωσης της μηριαίας κεφαλής, 1 από ρευματοειδή αρθρίτιδα του γόνατος, 2 έπειτα από χαλάρωση ολικής αρθροπλαστικής γόνατος, 4 έπειτα από χαλάρωση ολικής αρθροπλαστικής ισχίου και 2 από ψωριασική αρθρίτιδα (ισχίου και γόνατος) και 10 καρκινικά. Τα δείγματα δεν υπέστησαν καμία επεξεργασία πέραν της αφαίρεσης των προσμίξεων αίματος και λιπαρών συστατικών του εξωτερικού περιβάλλοντος του οστού.

Τα υπέρυθρα φάσματα έδειξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των υγιών οστών και των οστών τα οποία προήλθαν από τα δείγματα των ασθενών. Οι μεταβολές ήταν συνάρτηση της ασθένειας αλλά και των συστατικών του εκάστοτε οστού. Γενικά διαπιστώθηκε ότι σε κάθε περίπτωση το οξειδωτικό στρες συμμετέχει σε κάποιο από τα στάδια της ανάπτυξης της ασθένειας. Κατά το οξειδωτικό στρες παράγονται ελεύθερες ρίζες (ROS, reactive oxygen species) οι οποίες οδηγούν σε υπεροξειδωση των λιπιδίων και φωσφολιπιδίων των μεμβρανών των κυττάρων και κατά συνέπεια στην καταστροφή των κυττάρων.

Από τις μειώσεις των εντάσεων και τις μετατοπίσεις των απορροφήσεων τάσης των ομάδων  $\nu\text{OH}$  και  $\nu\text{NH}$  στην περιοχή του φάσματος από  $4000\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$  φαίνεται ότι ο υδροξυαπατίτης χάνει τις ομάδες  $-\text{OH}$ , ενώ οι δεσμοί υδρογόνου οι οποίοι συγκρατούν την  $\alpha$ -έλικα των κολλαγονούχων πρωτεϊνών μεταβάλλουν την έντασή τους. Αυτό επιβεβαιώνεται από τις μετατοπίσεις των ταινιών των Amide I και Amide II των πρωτεϊνών προς μικρότερες συχνότητες στην περιοχή  $1700\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ , ως αποτέλεσμα της καταστροφής της  $\alpha$ -έλικας. Το φαινόμενο αυτό είναι περισσότερο έντονο στην περίπτωση των χόνδρων. Η ταινία περίπου στα  $3080\text{ cm}^{-1}$ , η οποία συνδέεται με την ολεφινική ομάδα ( $\nu=\text{CH}$ ) επιβεβαιώνει την επίδραση των ελευθέρων ριζών στα στάδια της ασθένειας.

Η αύξηση των εντάσεων των ταινιών των μεθυλ ( $\nu\text{CH}_3$ ) και μεθυλενομάδων ( $\nu\text{CH}_2$ ) στην περιοχή  $3000\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$  συνδέεται με την αύξηση του λιπόφιλου περιβάλλοντος, ως αποτέλεσμα της επίδρασης του οξειδωτικού στρες και τον σχηματισμό αμυλοειδών πρωτεϊνών.

Η ταινία στα  $1743\text{ cm}^{-1}$  η οποία αποδίδεται σε σχηματισμό αλδεϋδικών ομάδων συνδέεται με το οξειδωτικό στρες και επομένως με την φλεγμονή. Σε ασθενείς οι οποίοι εμφάνιζαν χρόνια φλεγμονή η ένταση της ταινίας είναι αρκετά υψηλή.

Τα υπέρυθρα φάσματα έδειξαν την καταστροφή του υδροξυαπατίτη των οστών και την μετατροπή του σε άλατα του φωσφορικού ασβεστίου, προσδίδοντας επομένως μεγαλύτερη σκληρότητα και ευθραυστότητα στο οστό. Η καταστροφή του βιολογικού υδροξυαπατίτη επιβεβαιώθηκε με XRD ανάλυση.

Οι SEM αναλύσεις έδειξαν την καταστροφή των πρωτεϊνών του οστού. Από την ανάλυση της εικόνας φάνηκαν οι θέσεις διασταυρούμενων (cross-link) και διακλαδούμενων (branch-link) πολυμερισμών. Οι θέσεις αυτές αποτελούν δραστικά σημεία σχηματισμού φωσφορικών αλάτων, τα οποία μειώνουν την αντοχή των οστών. Επίσης επιβεβαιώνουν την επίδραση των ελευθέρων ριζών.

Η έκτοπη οστεοποίηση φαίνεται να μην είναι αποτέλεσμα της δράσης των οστεοβλαστών, αλλά της αδυναμίας λειτουργίας του ATP στον φυσιολογικό κύκλο λόγω ισχαιμικών επεισοδίων που επικρατούν στην περιοχή ανάπτυξης του οστού. Αυτό επιβεβαιώθηκε από την σύγκριση των φασμάτων έκτοπου οστού και επασβεστωμένης αορτικής βαλβίδας.

Τέλος, στον σχηματισμό των αμυλοειδών πρωτεϊνών αποδίδουμε την αντίσταση στην θεραπευτική αγωγή και ακτινοθεραπεία των οστών.

## ABSTRACT

The study of bone diseases and their treatment is directly related to the knowledge of the lesions that are induced at the molecular level of biological molecules, tissues and body fluids. To date there are no drugs that could repair the damage, and unfortunately the usual treatment of most diseases is surgical removal of the pathological bone segment. Knowing therefore the mechanism of disease could possibly lead to the development of the pharmaceutical treatment in cases where it could be applied.

In this study we used non-destructive methods such as infrared spectroscopy with Fourier transform (Fourier Transform Infrared, FT-IR) and scanning electron microscope (Scanning Electron Microscopy, SEM) and XRD (X-Ray Diffraction).

For the study were obtained cortical specimens, spongy and bone cartilage from 42 patients aged 31-87 years who underwent surgery. Of these 15 came from patients with developmental dysplasia of the hip, one with ankylosing arthritis of the hip, 4 of heterotopic ossification of the hip, 3 due to osteonecrosis of the femoral head, one from rheumatoid arthritis of the knee, 2 from total knee arthroplasty loosening, four from total hip arthroplasty loosening and two from psoriatic arthritis (hip and knee) and 10 cancerous. The samples were not undergone any preparation other than removal of fatty components of the bone and of the blood of the external surface of the bone.

Infrared spectra showed significant differences between healthy bones and bones which were derived from patient samples, as well as between different diseases. The changes observed were a combination of the mechanism of the disease and the individual components of the pathologic bone. In general it was found that in each case the oxidative stress is involved in any stage of the disease development. Under oxidative stress are produced free radicals (ROS, reactive oxygen species), which lead to lipid and phospholipid peroxidation of cell membranes and thus their destruction or death.

The reductions of intensities, the shifts of characteristic absorptions bands of  $\nu\text{OH}$  and  $\nu\text{NH}$  groups in the spectral region of  $4000\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$  show reduction of OH groups of hydroxyapatite and the hydrogen bonds that hold the alpha-helix of collagenous proteins alter their intensity, respectively. This is confirmed by the shift of the bands of the Amide I and Amide II proteins to shorter frequencies in the range  $1700\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ , as a result of destruction of the alpha-helix. This phenomenon is more pronounced in the case of



cartilage. The band at about  $3080\text{ cm}^{-1}$ , which is attributed to stretching vibrations of terminal olefinic ( $\nu=\text{CH}_2$ ) bonds, confirms the effect of free radicals during the disease progression.

The increasing intensity of the bands of methyl bands ( $\nu\text{CH}_3$ ) and methylene ( $\nu\text{CH}_2$ ) vibrations at the spectral region  $3000\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$  is found to be related to increasing of lipophilic environment, as a result of the effect of oxidative stress.

The band at  $1743\text{ cm}^{-1}$  that is attributable to aldehyde  $\nu\text{C}=\text{O}$  vibrations is associated with oxidative stress and therefore with inflammation. In patients who experienced chronic inflammation the intensity of this band is higher.

Infrared spectra showed the destruction of bone and hydroxyapatite converting to calcium phosphate salts, inducing greater hardness and brittleness in the bone. The destruction of the biological hydroxyapatite is confirmed by XRD analysis.

The SEM analysis of the surface architecture of bones showed the damaged proteins. Using Image J analysis it was possible to observe the cross-link and branch-link polymerization sites. These positions are the active sites of phosphate salts formation, which reduce bone strength. These observations confirm the effect of free radicals.

The heterotopic ossification does not appear to be a result of osteoblasts' activation, but due to ATP function failure in the normal cycle as a result to ischemic events prevailing in the bone growth area. This was confirmed by comparing the spectra of heterotopic bone and aortic valve calcification. This finding was confirmed by XRD analysis.

Finally, we consider that the formation of amyloid proteins is the cause of resistance to chemotherapy and bone radiotherapy.

# **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## 1. 1 ΟΣΤΙΤΗΣ ΙΣΤΟΣ

Τα οστά είναι ο στηρικτικός ιστός του ανθρωπίνου σώματος και χαρακτηρίζονται από ακαμψία και σκληρότητα. Συνδέονται μεταξύ τους με τις αρθρώσεις και σχηματίζουν το σκελετό (παθητικό κινητικό σύστημα) στον οποίο οφείλεται και το σχήμα του σώματος. Τα οστά θεωρούνται ως η μεταβολική αποθήκη των αλάτων, προστατεύουν τις ευαίσθητες ανατομικές δομές (π.χ κρανίο), παρέχουν μηχανική στήριξη (π.χ θώρακας) και επιτρέπουν την κίνηση ή μετακίνηση του σώματος. Ανάλογα με τη μορφολογία τους τα οστά διακρίνονται σε μακρά ή επιμήκη, σε βραχέα και σε πλατιά. Τα επιμήκη αποτελούνται από το σώμα ή διάφυση και δύο πιο ογκώδη άκρα, τις επιφύσεις, με τις αρθρικές επιφάνειες των οποίων συνδέονται τα γειτονικά οστά. Τα βραχέα οστά έχουν σχήμα κυβικό, είναι μικρά, συνήθως έχουν πολλές αρθρικές επιφάνειες και απαντώνται κυρίως στον καρπό και τον ταρσό. Τα πλατιά οστά συμμετέχουν στο σχηματισμό κοιλοτήτων του σώματος. Δομικός ιστός των οστών είναι ο οστίτης ιστός (Aerssens et al 1994).

## 1. 2 ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΟΣΤΟΥ

Ο οστίτης ιστός είναι μια μορφή του συνδετικού ιστού. Αποτελείται από ειδικού τύπου οστικά κύτταρα και μεσοκυττάρια ουσία. Χαρακτηριστικό γνώρισμα του οστίτη ιστού είναι ο εμποτισμός της μεσοκυττάριας ουσίας του με ανόργανα συστατικά, γεγονός που προσδίδει στον ιστό μεγάλη σκληρότητα και αντοχή, μεγάλο βαθμό εντάσεως και δυνάμεως συμπίεσης αλλά και μικρού βαθμού ελαστικότητα με σχετικά μικρό ειδικό βάρος έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η καλύτερη δυνατή σχέση αντοχής και οικονομίας υλικού κατασκευής. Παρά τη σκληρότητά του και τη μεγάλη του περιεκτικότητα σε ανόργανα συστατικά, ο οστίτης ιστός είναι ένας ζωντανός ιστός ο οποίος σε όλη την διάρκεια της ζωής εμφανίζει έντονο μεταβολισμό, συνεχή απορρόφηση και δημιουργία νέου οστίτη ιστού και διαρκή προσαρμογή του μεγέθους και του σχήματός του ανάλογα με τις δυνάμεις που ασκούνται και τις μηχανικές συνθήκες λειτουργίας του οστού

(Buckwalter & Cooper 1984).

Ο οστίτης ιστός αποτελείται κατά 35% από οργανικά υλικά (κύτταρα, θεμέλια ουσία, ινίδια κολλαγόνου) και κατά 65% από ανόργανα υλικά. Τα ανόργανα υλικά που εμποτίζουν τη θεμέλια ουσία είναι: το φωσφορικό ασβέστιο (80-90%) που βρίσκεται με τη μορφή κρυστάλλων υδροξυαπατίτη (μήκους 20-40 nm και πάχους 2-3 nm), το ανθρακικό ασβέστιο (8-10%), το φθοριούχο και το χλωριούχο ασβέστιο (0,5%), το φωσφορικό μαγνήσιο (1 -2%) και τα αλκαλικά άλατα (2%) (Buckwalter et al 1996).

Ο οστίτης ιστός αποτελείται από τέσσερεις τύπους οστικών κυττάρων (bone cells), τα αδιαφοροποίητα μεσεγχοματικά κύτταρα (stem cells), τους οστεοβλάστες (osteoblasts), τα οστεοκύτταρα (osteocytes) και τους οστεοκλάστες (osteoclasts), οι οποίοι πιθανότατα αποτελούν διάφορα λειτουργικά στάδια του ίδιου τύπου οστικού κυττάρου και από αποτιτανωμένη μεσοκυττάρια ουσία (Clarke 2008, Marks & Popoff 1988).

## **1.2. 1 Αδιαφοροποίητα κύτταρα**

Τα αδιαφοροποίητα κύτταρα (μικρά, μονοπύρρηνα και με λίγα οργανίδια) ευρίσκονται στα κανάλια των οστών, στο ενδόστεο και το περίστεο, και αν δεχθούν κατάλληλο ερέθισμα διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες. Παρόμοια κύτταρα, που μπορούν να παράγουν οστό, βρίσκονται και σε άλλους ιστούς.

## **1.2. 2 Οστεοβλάστες**

Τα οστεοπαραγωγά κύτταρα είναι οι οστεοβλάστες και τα οστεοκύτταρα (Εικόνα 1.1). Αν και έχουν την ίδια καταγωγή διαφέρουν τόσο ως προς τη θέση που βρίσκονται όσο και στη λειτουργία. Οι οστεοβλάστες επάγουν την παραγωγή οστού μέσω του οργανικού ικριώματος. Παράγουν τα οργανικά στοιχεία της οστέινης ουσίας (κολλαγόνο τύπου I, βλεννοπολυσακχαρίτες), είναι ευαίσθητοι στην παραθορμόνη (PTH) και εκκρίνουν οστεοκαλσίνη (osteocalcin) και οστική σιαλοπρωτεΐνη (bone sialoprotein). Στην οστέινη ουσία εναποθέτουν επιπλέον άλατα του ασβεστίου μέσω ειδικού ενζύμου, της αλκαλικής φωσφατάσης, την οποία περιέχουν σε αφθονία στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής τους μεμβράνης (Buck & Dumanian 2012).

Οι οστεοβλάστες βρίσκονται είτε στην επιφάνεια του οστού, όπου εμφανίζονται πιο

ώριμοι και μεταβολικά δραστικοί, είτε ως “εγκλωβισμένα” μέσα στο ικρίωμα κύτταρα οι οποίοι είναι λιγότερο μεταβολικά ενεργοί, αλλά έτοιμοι να ενεργοποιηθούν έπειτα από βλάβη στην επιφάνεια. Στη διάρκεια της ενεργού παραγωγής οστέινης ουσίας εμφανίζουν κυβοειδές σχήμα, έντονα βασεόφιλο κυτταρόπλασμα και επιθηλιακή διάταξη επάνω στις ελεύθερες επιφάνειες του αναπτυσσόμενου οστίτη ιστού. Στις πιο ανενεργείς φάσεις τους εμφανίζονται πιο αποπλατυσμένοι και λιγότερο βασεόφιλοι.



*Εικόνα 1. 1. Οστικά κύτταρα: Οστεοβλάστες, οστεοκλάστες, οστεοκύτταρα.  
(<http://microanatomy.net/>)*

Ενώνονται μεταξύ τους με λεπτές και κοντές κυτταροπλασματικές αποφυάδες που διακρίνονται καλύτερα μετά την μετατροπή των οστεοβλαστών σε οστεοκύτταρα και τον εγκλεισμό τους στη μεσοκυττάρια οστέινη ουσία. Οι οστεοβλάστες μικροσκοπικά εμφανίζουν πυρήνα, αναπτυγμένη συσκευή Golgi και εκτεταμένο κοκκώδες ενδοπλασματικό δίκτυο. Εμφανίζουν πολικότητα και έτσι ο πυρήνας βρίσκεται στον ένα πόλο του κυττάρου ενώ το προϊόν έκκρισης αποβάλλεται από τον άλλο πόλο του κυττάρου. Το προϊόν αυτό είναι προστάδιο της θεμέλιας ουσίας του οστίτη ιστού, περιβάλλει αμέσως τους οστεοβλάστες, δεν είναι ακόμα αποτιτανωμένο και ονομάζεται οστεοειδές (osteoid) (Buckwalter et al 1996).

Οι οστεοβλάστες προέρχονται κατά την εξωμήτριο ζωή από ελαφρά διαφοροποιημένα πρόδρομα μεσεγχυματογενή κύτταρα (οστεοπρογονικά κύτταρα, osteoprogenitor cells), με πλούσιο ενδοπλασματικό δίκτυο, οργανίδια Golgi και πολλά μιτοχόνδρια, που βρίσκονται στην ελεύθερη εξωτερική επιφάνεια των οστών και

συγκεκριμένα στην εσωτερική στοιβάδα του περιostίου καθώς και στο ενδόστεο. Τα παραπάνω κύτταρα ενεργοποιούνται και διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες και οστεοκλάστες κατά τη διάρκεια της διάπλασης και αύξησης των οστών αλλά και κάτω από ειδικές συνθήκες όπως τα κατάγματα. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη διαφοροποίηση αυτή βρίσκονται υπό ενεργό έρευνα, είναι ποικίλοι και περιλαμβάνουν τις οστεομορφογενετικές πρωτεΐνες (bone morphogenetic proteins - BMPs), αυξητικούς παράγοντες, κυτοκίνες, ιντερλευκίνες, ινσουλινομορφους αυξητικούς παράγοντες (insulin-like growth factors), τον αιμοπεταλιακό αυξητικό παράγοντα (platelet-derived growth factor) κ.ά. (Buckwalter & Cooper 1987). Η οστεοβλαστική δραστηριότητα αναστέλλεται από τον παράγοντα νέκρωσης των όγκων TNF- $\alpha$  και από τα αντισηπτικά υπεροξείδιο του υδρογόνου, την ιωδιούχο ποβιδόνη (betadine) και από τη βακιτρακίνη.

### 1.2. 3 Οστεοκύτταρα

Τα οστεοκύτταρα αποτελούν το 90% των κυττάρων του ώριμου οστού. Είναι στην ουσία πρώην οστεοβλάστες που εγκλωβίστηκαν στο επιμεταλλωμένο οστό. Έχουν υψηλή αναλογία πυρήνα σε σχέση με κυτταρόπλασμα, έχουν μακριές προσεκβολές του κυτταροπλάσματος (τους μικροσωληνίσκους), είναι λιγότερο ενεργοί από τους οστεοβλάστες και παίζουν κυρίαρχο ρόλο στην συγκέντρωση του εξωκυττάριου ασβεστίου και φωσφόρου. Διεγείρονται άμεσα από την καλσιτονίνη και αναστέλλονται από την παραθορμόνη (Rocheffort et al 2010).

Το μέγεθος του οστεοκυττάρου εξαρτάται από το μέγεθος του οστεοβλάστη από τον οποίο διαφοροποιήθηκε (Marotti 1996). Τα οστεοκύτταρα καταλαμβάνουν τελείως τις οστικές κοιλότητες και έχουν σχήμα αποπλατυσμένο, μεγαλύτερη αναλογία πυρήνα προς κυτταρόπλασμα σε σχέση με τους οστεοβλάστες, ελαφρά βασεόφιλο κυτταρόπλασμα με άφθονα κοκκία γλυκογόνου και σημαντικά ανεπτυγμένα οργανίδια - κυρίως τα νεαρά οστεοκύτταρα.<sup>7</sup>

Από τα οστεοκύτταρα εκφύονται πολυάριθμες λεπτές αποφυάδες που διεισδύουν μέσα στα οστικά σωληνάρια όπου έρχονται σε επαφή με τις αποφυάδες γειτονικών οστεοκυττάρων με χασματοσυνδέσεις (gap junctions). Λεπτότερες και μακρύτερες αποφυάδες (αγγειακές αποφυάδες - vascular dendrites) φέρνουν σε επαφή τα οστεοκύτταρα με τους οστεοβλάστες της περιφέρειας των σωλήνων του Havers, που με την σειρά τους επικοινωνούν με τα επιθηλιακά κύτταρα των αγγείων μέσω αποφυάδων και

συνδετικών κυττάρων, stromal cells, (Marotti 1996). Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατή η επικοινωνία μεταξύ των οστεοκυττάρων και η αντίδρασή τους σε ορμονικά ερεθίσματα που διαβιβάζονται μόνο στα οστεοκύτταρα που γειτνιάζουν άμεσα με τα αιμοφόρα αγγεία (Bonewald 2011).

Είναι πλέον γνωστό ότι τα μηχανικά ερεθίσματα που ασκούνται στο οστό γίνονται αντιληπτά πρώτα από τα οστεοκύτταρα που με τη σειρά τους ρυθμίζουν αντίστοιχα το σχηματισμό ή την απορρόφηση οστού (Marotti 1996). Τα οστεοκύτταρα φαίνεται ότι έχουν σημαντικό ρόλο στο συνολικό μεταβολισμό του οστίτη ιστού, στη συντήρηση της οστέινης ουσίας αλλά και στην κινητοποίηση του ασβεστίου και την άμεση ανταλλαγή του μεταξύ οστίτη ιστού και αίματος.<sup>5</sup>

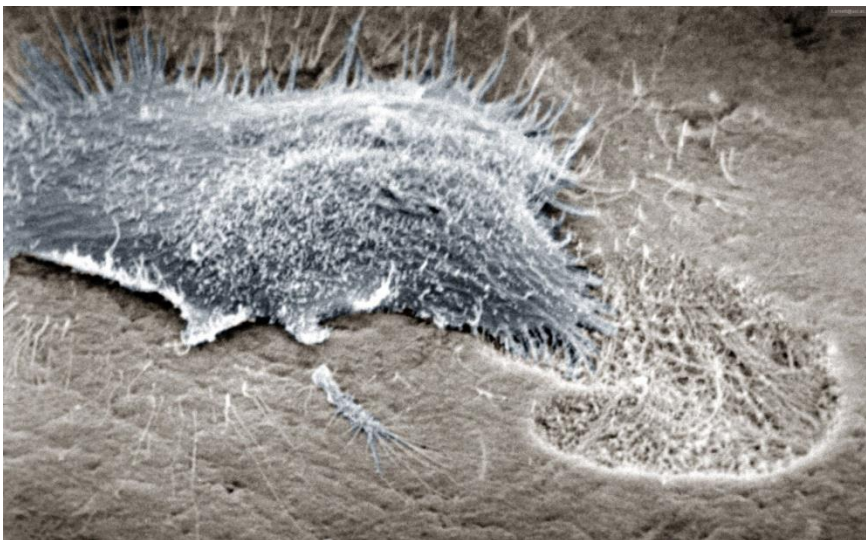
#### 1.2. 4 Οστεοκλάστες

Οι οστεοκλάστες είναι πολυπύρηννα γιγαντοκύτταρα με διάμετρο 20-100 μm, ποικίλο σχήμα και περιέχουν 5-50 πυρήνες. Είναι κύτταρα απαραίτητα τόσο κατά τη φυσιολογική οστική απορρόφηση στο κανονικό οστό, όσο και κατά τη δημιουργία οστεολυτικών βλαβών στο πολλαπλούν μυέλωμα και στην μεταστατική νόσο, χωρίς όμως ο μηχανισμός τους να είναι ξεκάθαρος. Βρίσκονται στις περιοχές που συντελείται απορρόφηση οστού και συνήθως μέσα σε σκαφοειδή κοιλώματα της ελεύθερης επιφάνειας της οστέινης ουσίας που ονομάζονται βοθρία του Howship (Howship's lacunae). Έχουν σαφή πολικότητα, πολλαπλές συσκευές Golgi, μεγάλο αριθμό μιτοχονδρίων και λυσοσωμάτων ενώ το κυτταρόπλασμα είναι βασεόφιλο στους νεαρούς οστεοκλάστες και οξεόφιλο στους ώριμους. Η κυτταρική τους μεμβράνη παρουσιάζει πολλές λεπτές πτυχωσείς στα σημεία που έρχεται σε επαφή με την οστέινη ουσία ώστε να αυξήσει την ενεργό λειτουργική επιφάνεια των οστεοκλαστών, ο ρόλος των οποίων είναι η διάβρωση και η απορρόφηση της οστέινης ουσίας μέσω της έκκρισης όξινης φωσφατάσης και άλλων υδρολυτικών ενζύμων. Ο οστεοκλάστης συνδέεται με το οστό μέσω πρωτεϊνών “αγκυρών” (integrins), οι οποίες επίσης απομονώνουν επαρκώς και την κοιλότητα δράσης-απορρόφησης. Μέσω της καρβονικής ανυδράσης ο οστεοκλάστης παράγει ιόντα υδρογόνου με αποτέλεσμα να μειώνεται το pH στην κοιλότητα του Howship, να αυξάνεται η διαλυτότητα των κρυστάλλων του υδροξυαπατίτη και τελικά να αποδομείται ο οργανικός σκελετός, μέσω πρωτεολυτικής διάλυσης από τη δράση του πρωτεολυτικού ενζύμου καθεψίνη (Clarke 2008).

Οι οστεοκλάστες, όπως και τα μακροφάγα κύτταρα του αίματος, σχηματίζονται από τη συγχώνευση μονοπύρηνων κυττάρων που προέρχονται από πολυδύναμα προγονικά κύτταρα του μυελού των οστών. Πιστεύεται μάλιστα ότι τα μονοπύρηνα αυτά κύτταρα είναι οστεοβλάστες και ότι είναι δυνατό σε στιγμή έντονης παραγωγής οστίτη ιστού να διαχωριστεί το κυτταρόπλασμα των οστεοκλαστών και να σχηματίσει και πάλι μονοπύρηνα κύτταρα με τα λειτουργικά χαρακτηριστικά των οστεοβλαστών (Del Fattore et al 2012). Θεωρείται ότι οι οστεοβλάστες και τα καρκινικά κύτταρα παράγουν την κυτοκίνη RANKL η οποία συνδέεται με τους υποδοχείς των οστεοκλαστών, διεγείρει την ωρίμανσή τους σε ώριμους οστεοκλάστες, αυξάνει την απορρόφηση του οστού και αναστέλλεται από την οστεοπροτογερίνη η οποία συνδέεται με το RANKL. Οι οστεοκλάστες φέρουν υποδοχείς για την καλσιτονίνη, η οποία συνδεόμενη αναστέλλει τη δράση τους. Αντίθετα η ιντερλευκίνη 1, μία κυτοκίνη εκκρινόμενη από φλεγμονή και όγκους διεγείρει και ευοδώνει τη δράση τους (Bronner 1992).

### 1.2. 5 Κύτταρα επιφανείας

Είναι πρώην οστεοβλάστες, ανενεργείς, οι οποίοι είναι αποπλατυσμένοι και συνδεόμενοι επικαλύπτουν σαν φάκελος τα οστά. Η Εικόνα 1.2 δίνει την μορφολογία του οστεοβλάστη, όπως λήφθηκε από τον Bronne με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Bronne 1992).



**Εικόνα 1. 2.** SEM απεικόνιση οστεοκλάστη (Bronne 1992).



Στον Πίνακα 1.1 δίνονται συνοπτικά ο τύπος του κυττάρου, οι υποδοχείς τους και η βιολογική δράση.

**Πίνακας 1. 1** Ρύθμιση της λειτουργίας των οστικών κυττάρων

Τύπος κυττάρου	Υποδοχέας	Δράση
Οστεοβλάστες	Παραθορμόνη	Απελευθερώνει ένα δεύτερο αγγελιοφόρο, ο οποίος διεγείρει την οστεοκλαστική δράση
	1,25 (OH) <sub>2</sub> βιταμίνη D3	Διεγείρει τη σύνθεση της αλκαλικής φωσφατάσης και την παραγωγή συγκεκριμένων οστικών πρωτεϊνών, όπως της οστεοκαλσίνης
	Γλυκοκορτικοειδή	Αναστέλλουν τη σύνθεση DNA και της παραγωγής κολλαγόνου, καθώς και γενικότερα την σύνθεση πρωτεϊνών από τους οστεοβλάστες
	Προσταγλανδίνες	Ενεργοποιούν την αδενυλκυκλάση και διεγείρουν την οστική απορρόφηση
	Οιστρογόνα	Έχουν αναβολική δράση (οστική παραγωγή) και αντικαταβολική (αποτρέπουν την οστική απορρόφηση)
Οστεοκλάστες	Καλσιτονίνη	Αναστέλλει τη δράση των οστεοκλαστών, μειώνοντας έτσι την οστικά απορρόφηση

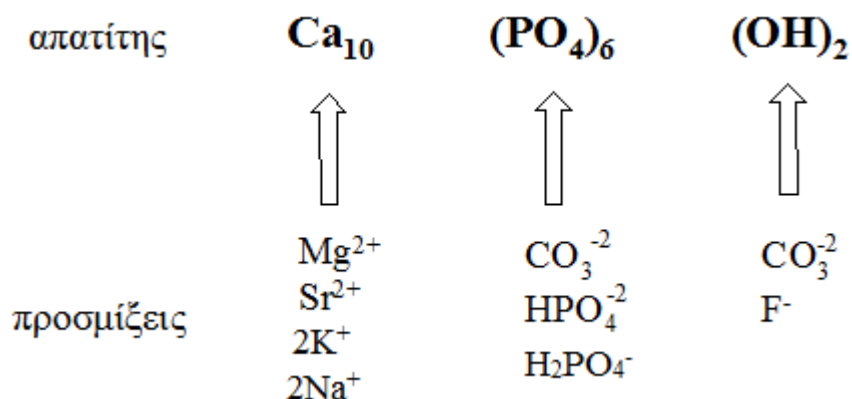
## 1.2. 6 Μεσοκυττάρια ουσία

Η μεσοκυττάρια ουσία του οστίτη ιστού (bone matrix) αποτελείται κατά 60-70% από ανόργανη θεμέλια ουσία που έχει εμποτιστεί με ανόργανα άλατα, κατά 5 - 8% από νερό ενώ το υπόλοιπο είναι ίνες κολλαγόνου (οργανική ουσία).

## 1.2. 7 Ανόργανη ουσία

Η ανόργανη οστική φάση (bone mineral) αποτελεί το 60% του ξηρού βάρους του οστού. Αποτελείται από βιολογικό απατίτη,  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ , με μειωμένη περιεκτικότητα σε ασβέστιο και υδροξύλια, ενώ περιέχει σημαντικές ποσότητες ανθρακικών, φωσφορικών και όξινων φωσφορικών ομάδων, επίσης συχνά ανευρίσκονται ιόντα μαγνησίου, καλίου, φθορίου και κιτρικά (citrate) (Koch et al 1995). Αποτελούν το 60% του ξηρού βάρους και αποτελούνται κυρίως από υδροξυαπατίτη και φωσφορικό ασβέστιο. Οι κρύσταλλοι υδροξυαπατίτη περιέχουν επίσης προσμίξεις και αντικαταστάσεις από ανθρακικά άλατα, υδροξείδιο, νάτριο, φθόριο, στρόντιο κ.ά. που αντανακλούν το διαιτητικό ιστορικό, την κατάσταση υγείας, τη θέση του ιστού και την ηλικία.<sup>5</sup>

Οι κρύσταλλοι του οστικού βιολογικού απατίτη είναι σχετικά μικροί (200-400 Å σε μέγιστη διάμετρο), συγκρινόμενοι με τους κρυστάλλους του απατίτη που ανευρίσκονται στα δόντια και στους γεωλογικούς απατίτες. Αυτό το μικρό μέγεθος των οστικών κρυστάλλων διευκολύνει την ενσωμάτωση και απορρόφηση των εξωγενών ιόντων καθώς και την αποσύνθεση του οστικού ανόργανου τμήματος (mineral) στο όξινο περιβάλλον που δημιουργείται από τους οστεοκλάστες κατά τη διάρκεια του οστικού ανασχηματισμού (remodelling). Το μικρό μέγεθος των οστικών κρυστάλλων παρέχει τέλος μηχανική σταθερότητα και αντοχή στο σύμπλεγμα ανόργανη μάζα-κολλαγόνο.

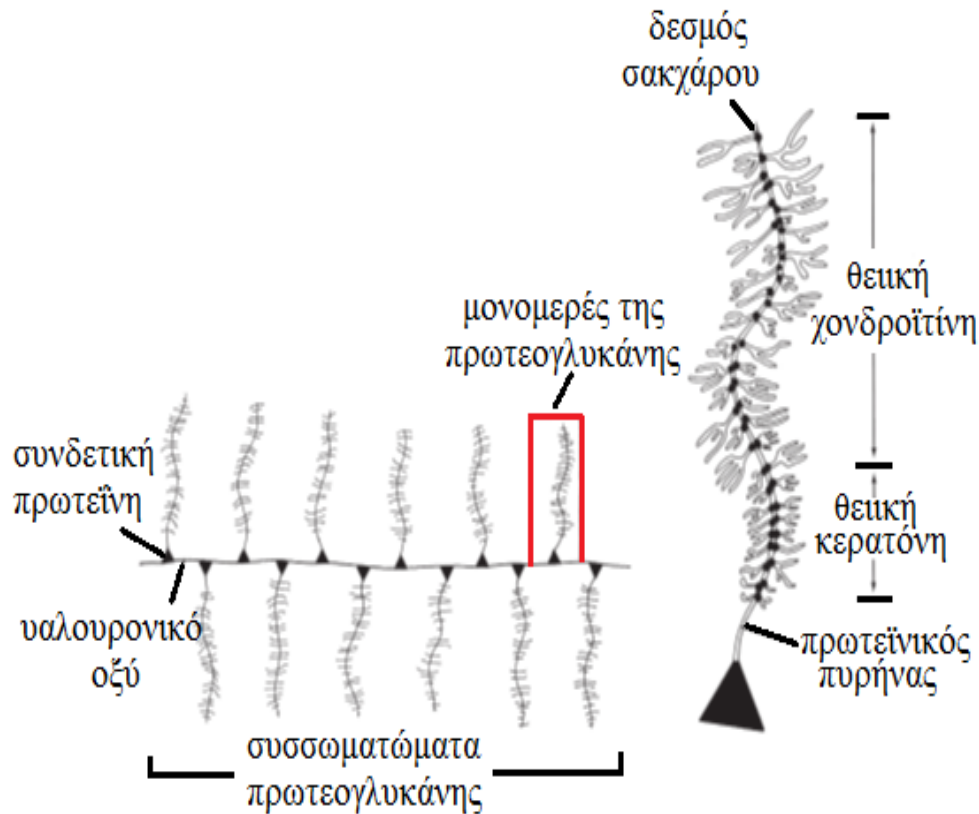


**Σχήμα 1. 1** Χημικός τύπος βιολογικού υδροξυαπατίτη με τις δυνατές αντικαταστάσεις των κατιόντων και ανιόντων (Πετρά 2003)

## 1.2. 8. Οργανική φάση

Τα οργανικά συστατικά ανέρχονται στο 40% του ξηρού βάρους του οστού και αποτελούνται από:

- **Κολλαγόνο**, το οποίο αποτελεί το 90% των οργανικών στοιχείων, είναι κυρίως τύπου I και εμφανίζει κενές ζώνες ανάμεσα στα μόρια των ινιδίων του. Επίσης εμφανίζει πόρους ανάμεσα στα παράλληλα μόρια των ινιδίων του. Η επιμετάλλωση (μεταλλική εναπόθεση ή επασβέστωση) γίνεται ακριβώς μέσα σε αυτά τα κενά και τους πόρους. Οι διασταυρούμενοι δεσμοί που αναπτύσσονται ανάμεσα στα μόριά του μειώνουν τη διαλυτότητα και αυξάνουν την δύναμη τάσης των μορίων του. Σχηματίζεται από την αλληλουχία κυρίως των αμινοξέων προλίνη, υδροξυπρολίνη και γλυκίνη. Τα αμινοξέα σχηματίζουν τριπλή έλικα από μία α2 και δύο α1 αλυσίδες. Απαιτούνται τέσσερα αμινοξέα για να σχηματισθεί ένα ινίδιο Τα ινίδια κολλαγόνου έχουν διάμετρο 50-70 nm και παίζουν σπουδαίο ρόλο στη δομή του οστού και στις μηχανικές και βιοχημικές του ιδιότητες, καθώς προσφέρουν αντοχή στην τάση ελκυσμού. Η φορά και η σύνταξη των ινιδίων δεν είναι τυχαία αλλά καθορισμένη. Μέσα στην μεσοκυττάρια ουσία βρίσκονται μικρές φακοειδείς κοιλότητες, οι οστικές κοιλότητες (lacunae) οι οποίες συνδέονται και επικοινωνούν μεταξύ τους με πολυάριθμα, λεπτότατα και διακλαδιζόμενα οστικά σωληνάκια (canaliculi). Τα εσωτερικά τοιχώματα των οστικών κοιλοτήτων και σωληναρίων καλύπτονται από ένα λεπτό στρώμα μη αποτιτανωμένης θεμέλιας ουσίας στην οποία υπάρχουν κολλαγόνα μικροϊνίδια (Teti 2011).
- **Πρωτεογλυκάνες:** Σχηματίζονται από μόρια γλυκοζαμινογλυκανών (θειϊκή-4-χονδροϊτίνη, θειϊκή-6-χονδροϊτίνη και θειϊκή κερατάνη) τα οποία συνδέονται με ενεργές θέσεις πρωτεϊνών. Τα συσσωματώματα πρωτεογλυκανών μοιάζουν με ψύκτρες καθαρισμού δοκιμαστικών σωλήνων, όπου ο πρωτεϊνικός πυρήνας και το μακρομόριο του υαλουρονικού οξέος είναι το στέλεχος και οι ακτινωτές αλυσίδες των γλυκοζαμινογλυκανών είναι οι τρίχες της ψύκτρας (Εικόνα 1.3). Τα συσσωματώματα πρωτεογλυκανών μπορεί να έχουν μήκος έως 4 μm. Οι πρωτεογλυκάνες συμβάλλουν στην αντοχή σε δυνάμεις πίεσης και αναστέλλουν την επιμετάλλωση



**Εικόνα 1.3** Μονομερή και συσσωματώματα πρωτογλυκανών (Μαυρογένης 2016).

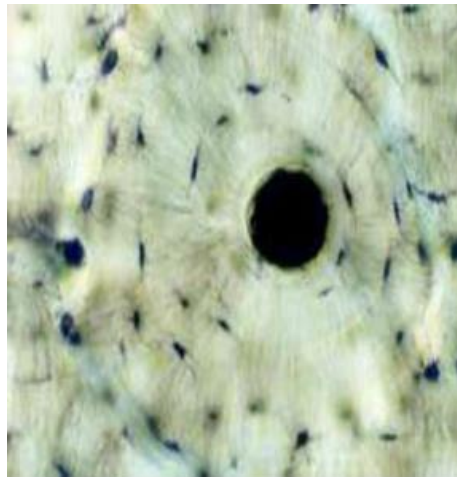
- **Μη κολλαγονικές πρωτεΐνες:** Αποτελούν το 10% του οργανικού τμήματος του οστού και παράγονται κυρίως από τους οστεοβλάστες. Προωθούν την επιμετάλλωση και το σχηματισμό του οστού. Διακρίνονται σε συγκολλητικές (φιμπρονεκτίνη, θρομβοσπονδίνη, οστεοπονδίνη, οστική σιαλοπρωτεΐνη), σε  $\gamma$  – καρβοξυλιωμένες πρωτεΐνες (οστεοκαλσίνη, BGP), σε γλυκοπρωτεΐνες (οστεονεκτίνη, BM-40), σε αυξητικούς παράγοντες (TGF- $\beta$ , IGF-1) και τους αναστολείς τους καθώς και σε πρωτεΐνες που προσροφώνται από την κυκλοφορία.

### 1.3. ΤΥΠΟΙ ΟΣΤΙΤΗ ΙΣΤΟΥ

Ο οστίτης ιστός ανάλογα με τον τρόπο με τον οποίο διατάσσονται τα κολλαγόνα ινίδια στη μεσοκυττάρια ουσία διακρίνεται σε ινώδη και πεταλιώδες φλοιώδες ή σπογγώδες.

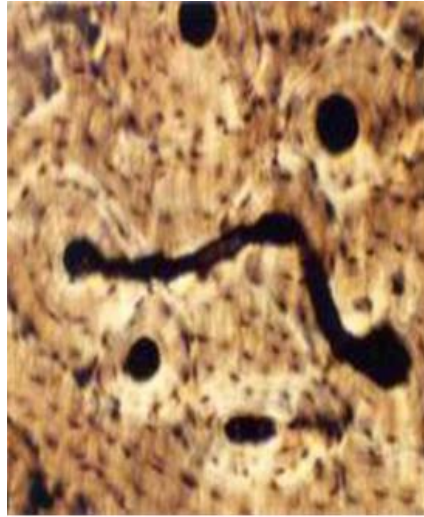
### 1.3. 1. Φλοιώδες οστό

Αποτελεί το 80 % του σκελετού και αποτελείται από πακτωμένους οστεώνες σε στενή διαμόρφωση, που αποκαλούνται αβερσιανά συστήματα (σύστημα Havers). Κάθε σύστημα του Havers αποτελείται από ένα κεντρικό σωλήνα, το σωλήνα του Havers (Haversian canal) και από 4-20 ομόκεντρα οστεΐνα πετάλια γύρω από το σωλήνα (Εικόνα 1.4). Η περιφέρεια του οστεώνα αφορίζεται από μια λεπτή ζώνη (cement line). Οι σωλήνες του Havers έχουν τη φορά του επιμήκη άξονα του οστού, κυλινδρικό σχήμα με διάμετρο 20-110  $\mu\text{m}$  και περιέχουν 1-2 λεπτότατα αιμοφόρα αγγεία (συχνά και νεύρα), το τοίχωμα των οποίων ομοιάζει σε δομή με αυτό των λεμφικών τριχοειδών αγγείων και παίζει σημαντικό ρόλο στην ανταλλαγή ιόντων ασβεστίου και φωσφόρου από και προς το οστό. Συνδέονται μεταξύ τους με τα κανάλια του Volkmann τα οποία εμπεριέχουν αρτηρίδια, φλεβίδια, τριχοειδή, νεύρα και πιθανότητα λεμφαγγεία (Clarke 2008).



*Εικόνα 1. 4. Σύστημα του Havers ή οστεώνας  
(Microanatomy Web Atlas <http://microanatomy.net/>)*

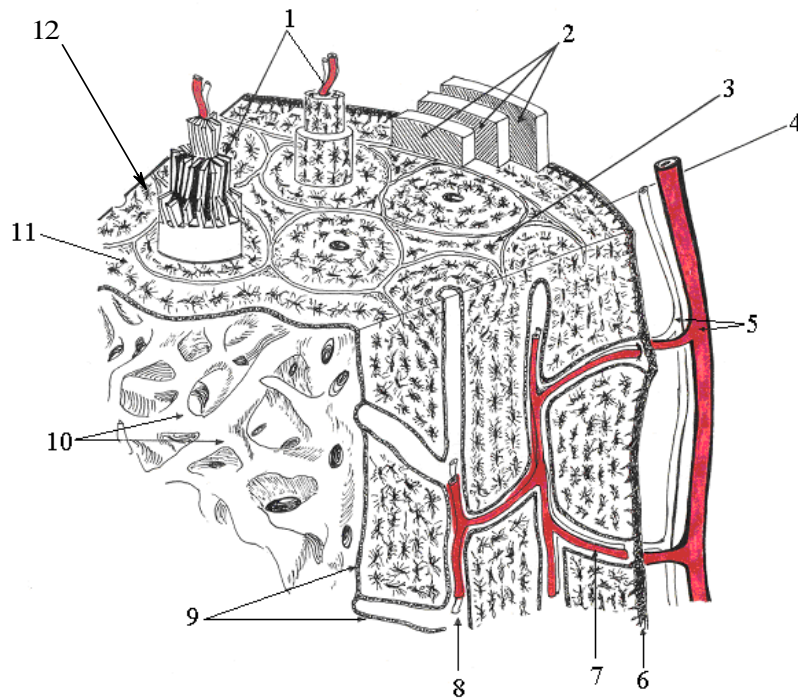
Οι σωλήνες του Havers επικοινωνούν μεταξύ τους, με την ελεύθερη επιφάνεια του οστού και με το μυελικό σωλήνα διαμέσου των σωλήνων του Volkmann (Volkmann's canals) που έχουν λοξή ή εγκάρσια φορά σε σχέση με τους σωλήνες του Havers, περιέχουν δε περιστικά αιμοφόρα αγγεία και κλάδους της τροφοφόρου αρτηρίας του οστού, τα οποία αναστομώνονται με τα αγγεία των σωλήνων του Havers (Εικόνα 1.5).



*Εικόνα 1. 5. Κανάλι του Volkmann*  
(*Microanatomy Web Atlas <http://microanatomy.net/>*)

Τα κολλαγόνα ινίδια του κάθε οστέινου πεταλίου πορεύονται μάλλον σπειροειδώς γύρω από τον επιμήκη άξονα του σωλήνα του Havers, η φορά τους όμως σε ένα οποιοδήποτε επίπεδο δεν είναι ίδια με εκείνη του προηγούμενου ή του επόμενου πεταλίου (Clarke 2008).

Μεταξύ των οστέινων πεταλίων των παραπάνω συστημάτων, όπως και μεταξύ των δοκίδων της σπογγώδους ουσίας των οστών, υπάρχουν οι οστικές κοιλότητες, που περιέχουν τα οστεοκύτταρα και από τις οποίες ξεκινούν ακτινωτά διατεταγμένα και αναστομωμένα οστικά σωληνάκια, που φέρουν σε επικοινωνία όλες τις οστικές κοιλότητες. Σχηματίζεται έτσι ένα πολύπλοκο, συνεχόμενο ενδοστικό σύστημα σωληναρίων που συνδέει τα οστικά κύτταρα με τους πλησιέστερους περιαγγειακούς χώρους. Η ιδιόμορφη σωληνωτή διάταξη των οστέινων πεταλίων της συμπαγούς ουσίας και η λειτουργικά καθορισμένη φορά των οστέινων δοκίδων της σπογγώδους ουσίας συμπίπτει με τη φορά δράσης των μέγιστων μηχανικών φορτίων, παρέχοντας στο οστό τη μεγαλύτερη στηρικτική ικανότητα και αντοχή με το μικρότερο δυνατό βάρος, εξασφαλίζοντας έτσι μεγάλη οικονομία ύλης. Ουσιαστικά, το φλοιώδες και το σπογγώδες οστό είναι δύο τύποι οστίτη ιστού με διαφορετική αρχιτεκτονική αλλά ίδια λειτουργία που υφίστανται διαρκή μεταβολή ανάλογα με την δράση των εφαρμοζόμενων συμπιεστικών ή διατμητικών δυνάμεων (Datta et al 2008).



**Εικόνα 1. 6.** Αβερσιανά συστήματα, με απεικόνιση του προσανατολισμού των ινιδίων κολλαγόνου στα διαδοχικά οστικά πετάλια, 2. Εξωτερικά κυκλοτερή οστικά πετάλια, με απεικόνιση του προσανατολισμού των ινιδίων κολλαγόνου στα διαδοχικά πετάλια, 3. Διάμεσα (interstitial) πετάλια, 4. Ίνες του Sharpey (συστατικό του περιοστίου), 5. Αιμοφόρα αγγεία, 6. Περίοστεο (αποτελείται από την εξωτερική ινώδη στιβάδα και την εσωτερική οστεογεννητική στιβάδα), 7. Κανάλι του Volkmann, 8. Αβερσιανό σύστημα σε οβελιαία διατομή, 9. Ενδόστεο, 10. Σπογγώδες οστό, με τις χαρακτηριστικές δοκίδες, 11. Εσωτερικά κυκλοτερή οστικά πετάλια, 12. Οστεώνας με τα χαρακτηριστικά οστεοκύτταρα μεταξύ των πεταλίων

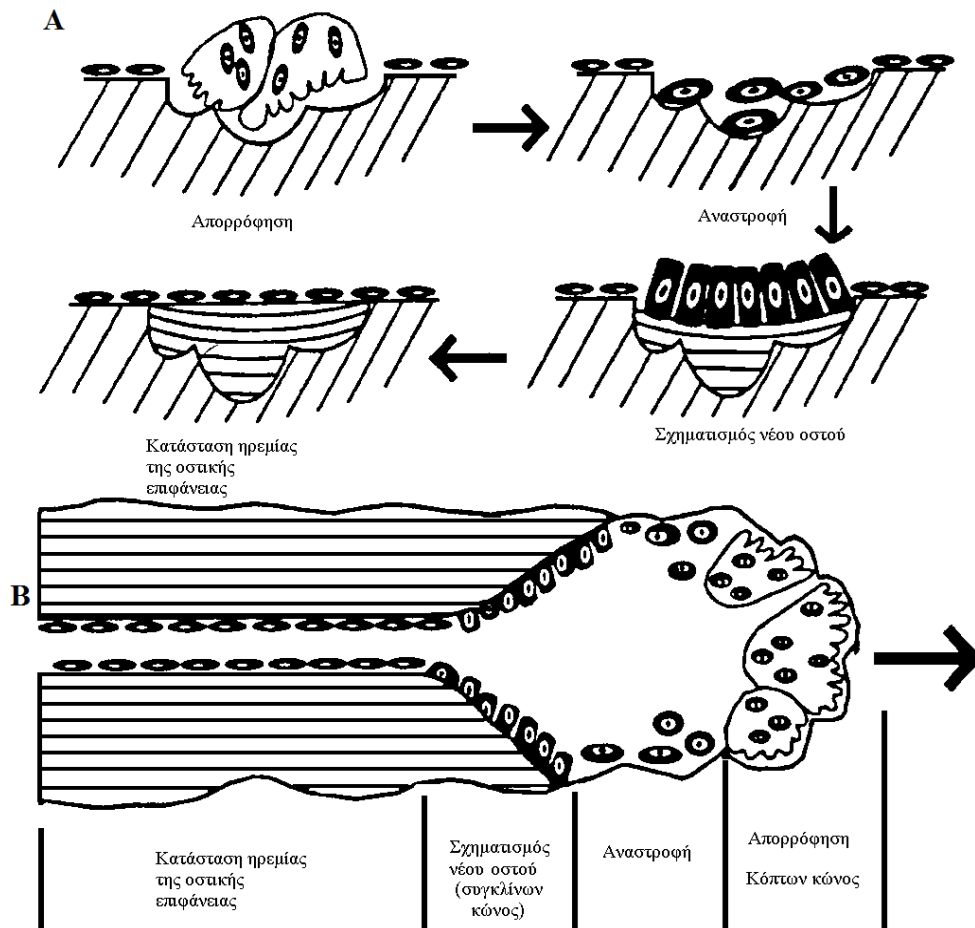
Η διατροφή του οστού προωθείται μέσω της ενδοστικής κυκλοφορίας, η οποία αποτελείται από τα κανάλια και από τους μικροσωληνίσκους (προσεκβολές των οστικών κυττάρων). Το φλοιώδες οστό έχει μικρό ρυθμό οστικής εναλλαγής, αυξημένο συντελεστή ελαστικότητας Young και αυξημένη σκληρότητα.

### 1.3. 2 Σπογγώδες οστό

Είναι λιγότερο πυκνό και με μικρότερο συντελεστή ελαστικότητας Young ως προς το φλοιώδες οστό. Τα οστέινα πετάλια ενώνονται μεταξύ τους και σχηματίζουν δοκίδες (trabeculae) που έχουν ποικίλες κατευθύνσεις. Οι δοκίδες χιάζονται με άλλες και σχηματίζουν μικρούς, ακαθόριστους χώρους, τις μυελοκυψέλες, που πληρούνται από μυελό των οστών. Η διεύθυνση και η φορά των ισχυρότερων κυρίως δοκίδων είναι



παράλληλη με τις τροχιές των μέγιστων τάσεων που ασκούνται πάνω στο οστό, αυξάνοντας με τον τρόπο αυτό τις μηχανικές αντοχές του. Το σπογγώδες οστό παρουσιάζει μεγαλύτερο ρυθμό οστικής εναλλαγής σε διαμόρφωση δοκίδων σύμφωνα με το νόμο του Wolff.



*Εικόνα 1. 7 Οι φάσεις του κύκλου της οστικής αναμόρφωσης που παρατηρούνται στο (Α) σπογγώδες και (Β) φλοιώδες οστό του ενήλικα*

## 1. 4 ΑΙΜΑΤΩΣΗ ΟΣΤΟΥ

Το οστό λαμβάνει το 5% με 10% της καρδιακής αιματικής παροχής. Οι διαφύσεις και οι μεταφύσεις των μακρών αυλοειδών οστών έχουν τρεις πηγες αιμάτωσης: τις τροφοφόρες αρτηρίες, τις αρτηρίες που εισέρχονται στις επιφύσεις και τις μεταφύσεις και τις αρτηρίες του περιosteού (Whiteside et al 1988).

- **Τροφοφόρος αρτηρία:** Αποτελεί παρακλάδι της συστηματικής αιμάτωσης του οργανισμού. Διατρέχει τον φλοιό της διάφυσης και μέσω του τροφοφόρου τμήματος



διέρχεται το μυελικό κανάλι και διακλαδίζεται σε ανιούσες και κατιούσες αρτηρίες. Οι επιπλέον διακλαδώσεις σε αρτηριόλια στον ενδόστεο οστικό φλοιό προμηθεύει τουλάχιστον τα δύο τρίτα του ώριμου διαφυσιακού φλοιού διά των αβερσιανών συστημάτων. Εμφανίζει αυξημένη πίεση παροχής.

- **Μεταφυσιακό-επιφυσιακό σύστημα:** Αυτό το σύστημα εξορμάται από πλέγματα αγγείων περίξ των αρθρώσεων (π.χ. Αρτηρίες γόνατος)
- **Σύστημα αρτηριών περιστέου:** Αποτελείται κυρίως από τριχοειδή, τα οποία παρέχουν με αίμα το έξω ένα τρίτο του ώριμου διαφυσιακού οστού. Έχει μειωμένη πίεση ροής.

Οι τροφοφόρες αρτηρίες εισέρχονται λοξά από συγκεκριμένο τμήμα της διάφυσης και διαχωρίζονται ενδοαυλικά σε δυο κλάδους τον ανιόντα και τον κατιόντα που αρδεύουν την μυελική κοιλότητα με διαδοχικές διακλαδώσεις μέχρι τα ελικοειδή αρτηρίδια στην ζώνη του ενδοστέου. Οι ανιόντες και κατιόντες αυτοί κλάδοι αναστομώνονται με κλάδους των μεταφυσιακών και περιστικών αρτηριών, όπου οι μεν πρώτες προέρχονται από κλάδους παρακειμένων μεγάλων αγγείων οι δε δεύτερες από τις προσφύσεις τενόντων, συνδέσμων και μεσοστέων υμένων και σχηματίζουν το αρτηριακό σύστημα του μυελού των οστών. Οι τελικοί κλάδοι αυτών των αναστομώνσεων στον φλοιό είναι τα τριχοειδή αρτηρίδια των οστεώνων (σύστημα Havers). Το σύστημα αυτό έχει, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, φυγόκεντρο ροή αίματος και αιματώνει το μεγαλύτερο μέρος του φλοιού των οστών που καλύπτεται από περίοστεο (Whiteside et al 1983, Shim 1968).

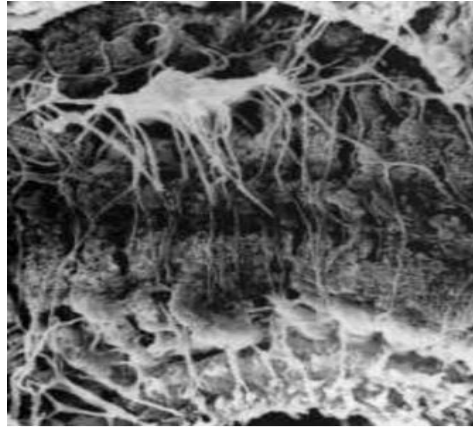
Αυτός ο τύπος αιμάτωσης αλλάζει σε περιοχές της επιφάνειας του οστού όπου υπάρχουν προσφύσεις τενόντων, συνδέσμων και μεσοστέων μεμβρανών. Εκεί τα περιστικά αγγεία αιματώνουν το εξωτερικό ένα τρίτο του φλοιού. Στα σπογγώδη οστά η αιμάτωση είναι ανάλογη με αυτή των μεταφύσεων. Οι αρτηρίες διαπερνούν το λεπτό κέλυφος του φλοιού και διακλαδίζονται εντός του οστού. Τα τελικά τριχοειδή επικάθονται των λεπτών οστεοδοκίδων, ενώ στις πλέον πεπαχυμένες παρατηρείται τριχοειδικός σχηματισμός ανάλογος του οστεώνα του φλοιώδους οστού. Το περίοστεο επίσης έχει ένα πυκνό αγγειακό δίκτυο που εφάπτεται της εξωτερικής ινώδους στιβάδας του (Whiteside et al 1983, Shim 1968, Oni & Gregg 1990). Οι αναστομώνσεις του δικτύου αυτού συνδέονται με τα μικροαγγειακά πλέγματα των μυών και με τα πλέγματα των βαθύτερων στιβάδων του περιστέου. Στα παιδιά τα μικροαγγειακά συστήματα των εν τω βάθει στιβάδων του περιστέου είναι ιδιαίτερα αναπτυγμένα, διατιτραίνουν τον φλοιό και συνδέονται με το αγγειακό σύστημα του μυελού των οστών. Το περίοστεο έχει υποδοχείς ιδιοδεκτικής

αισθητικότητας οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την τοπική ρύθμιση της μικροκυκλοφορίας. Σε μεγαλύτερη ηλικία, τα αγγεία του περιostίου ελαττώνονται σε αριθμό και η συμβολή τους στην αιμάτωση του φλοιού περιορίζεται (Whiteside et al 1983).

Αν, μετά από κάκωση, ένα οστό στερηθεί την παροχή αίματος από την τροφοφόρο αρτηρία του μπορεί να επιζήσει μόνο εάν διατηρούνται ακέραιες οι αναστομώσεις με το δίκτυο του περιostίου. Αν το οστό έχει υποστεί βλάβη της τροφοφόρου αρτηρίας και ταυτόχρονα έχει αποκολληθεί σε μεγάλη έκταση από το περιostίο, τότε η ανάπτυξη ολικής ή μερικής ισχαιμίας είναι βέβαια. Εάν μετά από μια κάκωση ή από μια υποπεριοστική χειρουργική παρασκευή το περιostίο αποκολληθεί από την επιφάνεια του φλοιού, συνεχίζει να παραμένει λειτουργικά δραστήριο, μόνο όταν δεν έχει διαταραχθεί η αγγειακή του σύνδεση με τους μύες. Η αποκόλληση του περιostίου από την επιφάνεια του φλοιού μπορεί να προκαλέσει περιορισμένη τοπική νέκρωση του φλοιού λόγω διαταραχής της φλεβικής απαγωγής του αίματος του φλοιού. Γίνεται φανερό ότι τα μακρά αυλοειδή οστά έχουν μια διπλή αιμάτωση, από το αγγειακό σύστημα του μυελού και του περιostίου (Oni & Gregg 1990, Strachan et al 1990).

Παρά το γεγονός ότι κατά την ενήλικη ζωή η παροχή αίματος είναι φυγόκεντρος και το ενδομυελικό σύστημα υπερτερεί, σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις και τραυματισμούς των ιστών του μυοσκελετικού συστήματος είναι δυνατόν η ροή αυτή μέσω των αναστομωτικών δικτύων να αναστραφεί παροδικά και να μην προκληθεί τελικά νέκρωση των ιστών. Έτσι, για παράδειγμα, περιορισμένη κυκλοτερής αποκόλληση του περιostίου δεν μειώνει την ροή αίματος στα μεσαία στρώματα του διαφυσιικού φλοιώδους οστού. Φαίνεται λοιπόν ότι υπάρχει η λειτουργική δυνατότητα το οστού να λάβει την μεγαλύτερη ποσότητα αίματος που χρειάζεται από το ένα ή και τα δυο συστήματα ανάλογα με τις τοπικές συνθήκες παθολογίας ή κάκωσης που επικρατούν (Strachan et al 1990).

Η αγγειακή παροχή αίματος στις επιφύσεις είναι λιγότερο πυκνή και πιο ευαίσθητη σε κακώσεις από αυτή των αγγειακών συστημάτων που προαναφέραμε. Οι επιφυσιακές και μεταφυσιακές αρτηρίες διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο στην αγγείωση της αντίστοιχης περιοχής αλλά και στη λειτουργία του συζευκτικού χόνδρου. Κατά την διάρκεια της ανάπτυξης ελάχιστα επιφυσιακά ή μεταφυσιακά αγγεία διαπερνούν την επιφυσιική πλάκα και έτσι η επίφυση βασίζεται για αιματική παροχή μόνο στα διατιτραίνοντα επιφυσιακά αγγεία.



**Εικόνα 1. 8** Τριχοειδή αγγεία οστού στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.  
(*Microanatomy Web Atlas <http://microanatomy.net/>*)

Μετά την ολοκλήρωση της ανάπτυξης, περιορισμένος αριθμός επιφυσιακών και μεταφυσιακών αγγείων διαπερνούν την περιοχή της επιφυσιακής πλάκας και αναστομώνονται. Η λειτουργική επάρκεια των αναστομώνσεων αυτών αμφισβητείται και στην πράξη η ροή αίματος στην επίφυση δεν μπορεί να αναπληρωθεί μετά από κάκωση των επιφυσιακών αγγείων. Αυτή η λειτουργική ανεπάρκεια είναι εν μέρει υπεύθυνη για τα προβλήματα νέκρωσης που παρουσιάζουν τα κατάγματα της κεφαλής του μηριαίου, του σκαφοειδούς, της κεφαλής του δεύτερου μεταταρσίου και της πρόσθιας αρθρικής επιφανείας του έξω επικονδύλου του βραχιονίου οστού (Herndon & Aufranc 1972).

## 1. 5 ΟΣΤΙΚΗ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

Αναφέρονται παρακάτω οι συνήθεις παθολογικές καταστάσεις των οστών που έγιναν και αντικείμενο έρευνας με την υπέρυθρη φασματοσκοπία και το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης στην παρούσα διατριβή.

### 1.5. 1 Αναπτυξιακή δυσπλασία του ισχίου

Η πάθηση αυτή παλαιότερα ονομαζόταν συγγενής δυσπλασία του ισχίου. Περιλαμβάνει ένα ευρύ φάσμα ανωμαλιών του ισχίου του νεογέννητου, όπου η κοτύλη, του εγγύς μηριαίο και ο θύλακος είναι παθολογικά. Μπορεί να συμβεί ενδομήτρια, κατά τον τοκετό ή μετά τον τοκετό και περιλαμβάνει τη δυσπλασία, το υπεξάρθρημα και το

εξάρθρωμα του ισχίου.

### **1.5.1. 1 Επιδημιολογία**

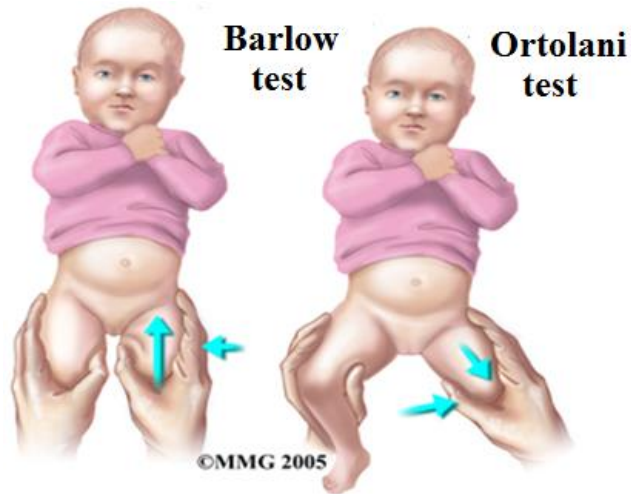
Η αναπτυξιακή δυσπλασία του ισχίου είναι η πιο κοινή ορθοπαιδική πάθηση των νεογνών. Η συχνότητα της δυσπλασίας είναι 1 : 100 γεννήσεις και του εξαρθήματος είναι 1 : 1000 γεννήσεις. Συσχετίζεται με παθήσεις που οφείλονται επίσης σε κακή ενδομήτρια θέση, όπως το ραιβόκρανο (20 % των περιπτώσεων) και η προσαγωγή του πρώτου μεταταρσίου (10%), καθώς και σε κάποιες περιπτώσεις με παθολογικά ποσοστά κολλαγόνου III. Η πάθηση παρατηρείται συχνότερα στο αριστερό ισχίο (67% των περιπτώσεων), στα κορίτσια (85%), στα νεογνά με ένα θετικό οικογενειακό ιστορικό (>20%), σε μητέρες με αυξημένες τιμές οιστρογόνων και σε ισχιακή προβολή κατά των τοκετό (30% με 50%).

### **1.5.1. 2 Παθογένεια**

Η αιτιολογία της νόσου είναι πολυπαραγοντική και μπορεί να οφείλεται σε μεγάλη συνδεσμική χαλάρωση, σε αυξημένη πρόσθια κλίση της μηριαίας κεφαλής, σε αυξημένη πρόσθια κλίση της κοτύλης και σε κακή ενδομήτρια θέση του εμβρύου. Στους επιβαρυντικούς παράγοντες συμπεριλαμβάνονται η ισχιακή προβολή κατά τον τοκετό, το θετικό οικογενειακό ιστορικό, το θήλυ φύλο και η πρωτότοκος κύηση. Ιδιαίτερα η έλλειψη επαρκούς ενδομήτριου χώρου στην πρωτότοκο κύηση σχετίζεται με αυξημένα ποσοστά αναπτυξιακής δυσπλασίας του ισχίου.

### **1.5.1. 3 Κλινικά χαρακτηριστικά**

Στα κλινικά σημεία περιλαμβάνονται τα θετικά σημεία Barlow και Ortolani, με βάση τα οποία η κεφαλή του μηριαίου είναι εξαρθρώσιμη ή ανατάξιμη. Η ανισοσκελία αναδεικνύεται με το θετικό σημείο Galeazzi. Ταυτόχρονα παρατηρείται μειωμένη απαγωγή του ισχίου και αυξημένες δερματικές πτυχές στο γλουτό.



**Εικόνα 1. 9** Κλινικά σημεία Barlow και Ortolani.

#### 1.5.1. 4 Διαγνωστικά ευρήματα

Η ακτινογραφία λεκάνης – ισχίων είναι χρήσιμη μετά την ηλικία των 4 μηνών αφού εμφανιστεί ο πυρήνας οστέωσης της μηριαίας κεφαλής



**Εικόνα 1. 10** Ακτινολογικός έλεγχος για τη διάγνωση της νόσου  
([www.orthobullets.com](http://www.orthobullets.com)).

Η τοποθέτηση των ακτινολογικών γραμμών Hilgenreiner, Perkins και Shenton καθορίζει την ακτινολογική διάγνωση της νόσου. Το υπερηχογράφημα ισχίων εκτιμά τη δυσπλασία της κοτύλης και το εξάρθημα του ισχίου πριν την εμφάνιση του πυρήνα

οστέωσης της μηριαίας κεφαλής.

### **1.5.1. 5 Θεραπεία**

Αν αφηθεί χωρίς θεραπεία οι μύες πέριξ του ισχίου ρικνώνονται και η κοτύλη γίνεται δυσπλαστική γεμίζοντας με ινολιπόδη ιστό. Στις θεραπευτικές επιλογές ανάλογα με την ηλικία του παιδιού περιλαμβάνονται η συντηρητική αντιμετώπιση με ιμάντες τύπου Pавлик, οι νάρθηκες και η ανοιχτή χειρουργική ανάταξη σε συνδυασμό με τις οστεοτομίες κοτύλης και μηριαίου.

## **1.5. 2 Δυσπλασία του ισχίου σε ενήλικες**

### **1.5.2. 1 Παθογένεια**

Η δυσπλασία του ισχίου είναι διαταραχή που οφείλεται σε ανώμαλη ανάπτυξη ή εξάρθρημα του ισχίου λόγω χαλαρότητας του θυλάκου ή μηχανικών παραγόντων. Οφείλεται σε αναπτυξιακή δυσπλασία του ισχίου πλημμελώς θεραπευθείσα. Στους ενήλικες κάτω των 50 ετών ο πόνος στο ισχίο οφείλεται συνήθως σε κάποια μορφή δυσπλασίας του ισχίου. Η πάθηση οδηγεί σε εκφυλιστική νόσο του ισχίου (οστεοαρθρίτιδα) σε ποσοστό μεγαλύτερο του 50 % σε ασθενείς πέριξ των 50 ετών. Στο φάσμα της πάθησης συμπεριλαμβάνονται από την απλή πρόσκρουση της μηριαίας κεφαλής στην κοτύλη ως και σημαντική αρθρίτιδα της άρθρωσης (Hartofilakidis & Babis 2009, Hartofilakidis et al 2000).

### **1.5.2. 2 Κατάταξη**

#### **Δυσπλασία της κοτύλης**

*Μικρή κάλυψη της κεφαλής-Η πιο κλασσική μορφή*

1. Υπερβολικά μεγάλη κάλυψη της μηριαίας κεφαλής
2. Κακή θέση κάλυψης της μηριαίας κεφαλής

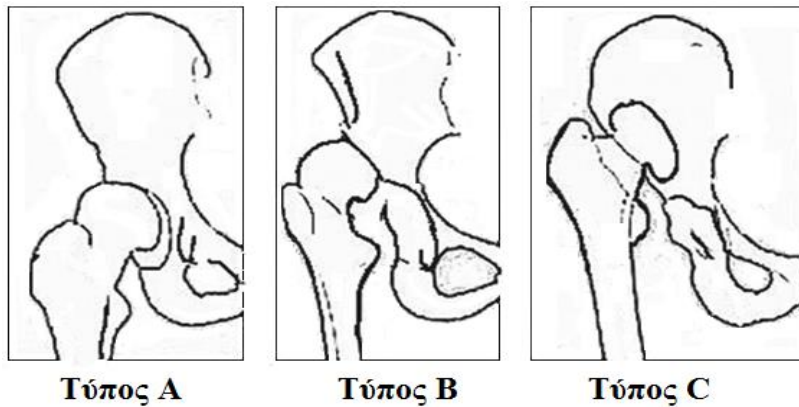
Σύμφωνα με την ταξινόμηση Χαρτοφυλακίδη, η δυσπλασία του ισχίου μπορεί να ταξινομηθεί σε 3 τύπους (Hartofilakidis et al 1999).

- Τύπος Α: Μηριαία κεφαλή εντός της κοτύλης. Υπεξάρθρημα. Αβαθής κοτύλη

- Τύπος Β: Μηριαία κεφαλή εντός ψευδοκοτύλης που βρίσκεται υψηλότερα από την αληθή κοτύλη (υψηλό εξάρθημα)
- Τύπος C: Μηριαία κεφαλή ακάλυπτη και μετακινημένη προς τα άνω και οπίσθια (χαμηλό εξάρθημα)

#### *Δυσπλασία του εγγύς μηριαίου*

1. Παθολογικό offset κεφαλής-αυχένα
2. Παθολογική κλίση του μηριαίου αυχένα



**Εικόνα 1. 11.** Ταξινόμηση δυσπλασίας ισχίου κατά Χαρτοφυλακίδη (Hartofilakidis et al 1999).

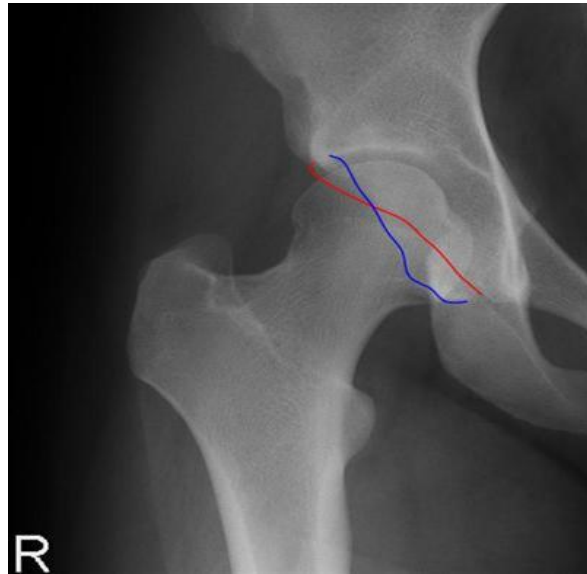
#### **1.5.2. 3 Κλινικά ευρήματα**

Στην πάθηση παρατηρείται παθολογική πρόσκρουση μεταξύ του μηριαίου αυχένα και του πρόσθιου τοιχώματος της κοτύλης. Η περιοχή επαφής είναι η πρόσθια άνω επιφάνεια της κοτύλης. Εμφανίζεται με πόνο και φλεγμονή στο ισχίο, εξελίσσεται σε εκφύλιση του επιχείλιου χόνδρου με παραγωγή θραυσμάτων του, καταστροφή της επιφάνειας του χόνδρου με ρωγμές στην επιφάνειά του και με τελικό αποτέλεσμα την εκφύλιση-καταστροφή της άρθρωσης. Το τεστ πρόσκρουσης με το ισχίο σε 90° κάμψης είναι θετικό, με περιορισμό της έσω στροφής του ισχίου (Hartofilakidis & Babis 2009).

#### **1.5.2. 4 Ακτινολογικά ευρήματα**

Στη δυσπλασία της κοτύλης, το σημείο της σύμπτωσης των γραμμών των τοιχωμάτων της κοτύλης (crossover sign) στην προσθιοπίσθια ακτινογραφία λεκάνης είναι παθογνωμονικό. Επίσης συχνά μπορεί να παρατηρηθεί και η ισχιακή άκανθα στην

ακτινογραφία. Στη δυσπλασία του εγγύς μηριαίου, η απόσταση (offset) μεταξύ του άνω ορίου της μηριαίας κεφαλής και του αυχένος μειώνεται σε αυτήν την πάθηση, με αποτέλεσμα ακτινολογικά να ομοιάζει το εγγύς μηριαίο με λαβή όπλου. Επίσης υπάρχει παθολογική σχέση μεταξύ της κλίσης του αυχένα του μηριαίου, που σε αυτήν την περίπτωση εμφανίζεται με μεγάλη πρόσθια απόκλιση (anteversion) σε αντίθεση με την αυξημένη οπίσθια αναστροφή της κοτύλης (retroversion) (Hartofilakidis et al 2000).

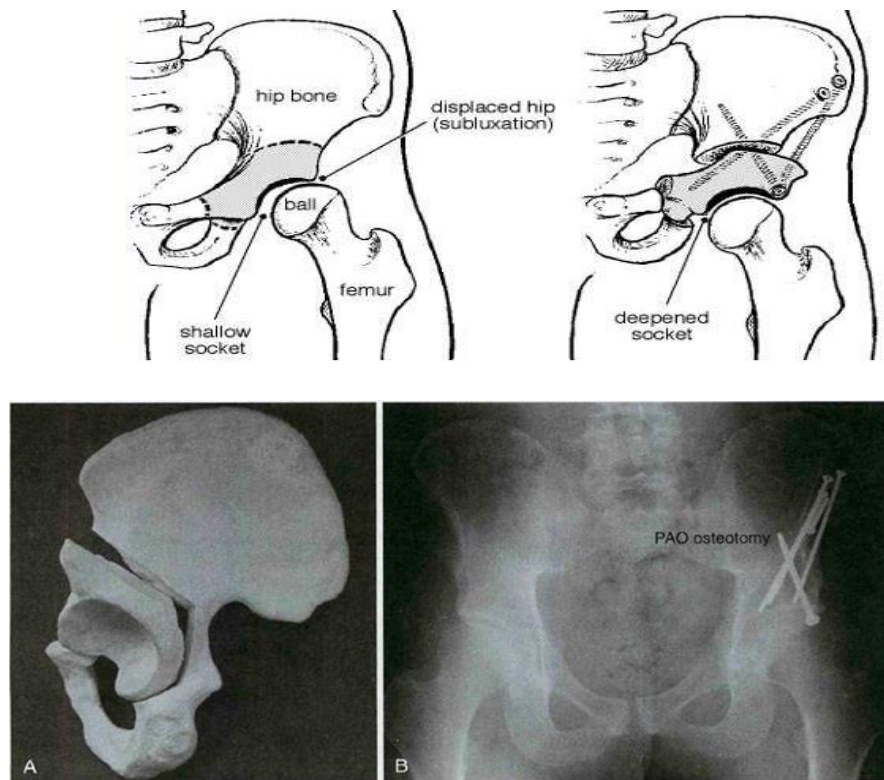


*Εικόνα 1. 12 Σημείο crossover [www.orthobullets.com](http://www.orthobullets.com).*

### **1.5.2. 5 Θεραπεία**

Έπειτα από την έναρξη των συμπτωμάτων γρήγορα η πάθηση εξελίσσεται σε εκφύλιση της άρθρωσης, με αποτέλεσμα να απαιτείται συχνά η χειρουργική παρέμβαση. Η θεραπεία της πάθησης εξαρτάται από την έκταση της δυσμορφίας και την εντόπιση της πάθησης. Η θεραπεία είναι χειρουργική κυρίως και περιλαμβάνει οστεοτομίες, αποσυμπίεση του ισχίου, οστεοτομία του εγγύς μηριαίου, αρθροσκόπηση του ισχίου και τέλος σε προχωρημένη καταστροφή του ισχίου ολική αρθροπλαστική του ισχίου (Hartofilakidis et al 2013 , 2011, 1998, Hartofilakidis& Karachalios 2004). Οι οστεοτομίες είναι περικοτυλιαίες (Ganz, Bernese), οστεοτομίες μηριαίου και οστεοτομίες πυέλου (Chiari, Shelf) (Hartofilakidis et al 1997, 2011).





Εικόνα 1.13 Οστεοτομία Ganz ([www.orthobullers.com](http://www.orthobullers.com)).

## 1.6 ΑΣΗΠΤΗ ΝΕΚΡΩΣΗ ΜΗΡΙΑΙΑΣ ΚΕΦΑΛΗΣ

### 1.6.1 Παθογένεια

Η άσηπτη νέκρωση της μηριαίας κεφαλής είναι μια σχετικά συχνή αιτία πόνου στο ισχίο. Αποτελεί την πιο συχνή οστική νέκρωση και οφείλεται στη διακοπή της αιμάτωσης σε κάποιο μέρος της μηριαίας κεφαλής. Η διακοπή αυτή μπορεί να είναι μετατραυματική (μετά από υποκεφαλικό κάταγμα ισχίου ή εξάρθρημα ισχίου), αλλά μπορεί να είναι και ανάγγεια (λόγω λήψης υψηλών δόσεων στεροειδών, αιματολογικών διαταραχών, νόσου δυτών κλπ.). Υπάρχει η υποψία ότι σε ασθενείς με αυξημένη τάση για θρομβώσεις υπάρχει και αυξημένη συχνότητα εμφάνισης της νόσου. Πάντως σε όλες τις περιπτώσεις στο τελικό στάδιο της νόσου παρατηρείται ένας περιορισμός της φλεβικής αποχέτευσης της άρθρωσης του ισχίου (Aldridge et al. 2004, Babis 2011).

## 1.6. 2 Επιδημιολογία

Η ακριβής συχνότητα εμφάνισης της νόσου δεν είναι γνωστή και επίσης σίγουρα υπάρχει και ένας σημαντικός αριθμός περιπτώσεων που είναι ασυμπτωματικές. Η μέση ηλικία εμφάνισης της νόσου είναι κατά τη διάρκεια της 5ης δεκαετίας της ζωής. Η νόσος προσβάλλει συχνότερα τον ανδρικό πληθυσμό με αναλογία άρρεν/θήλυ : 7/3. Σε ποσοστό που προσεγγίζει το 50%, η νόσος είναι αμφοτερόπλευρη. Στις ΗΠΑ, κάθε χρόνο διαγιγνώσκονται 20.000 νέοι ασθενείς με οστεονέκρωση, ενώ η νόσος ευθύνεται για το 5-18% των ολικών αρθροπλαστικών ισχίου που πραγματοποιούνται κάθε έτος. Από μελέτες σε ασθενείς που λαμβάνουν συστηματικά κορτικοστεροειδή υπολογίζεται ότι η επίπτωση της νόσου κυμαίνεται από 5-25% (Babis et al 2011, Colomb-Lippa 2014).

## 1.6. 3 Κλινική εικόνα

Ο πόνος αποτελεί σε όλες τις περιπτώσεις το αρχικό σύμπτωμα. Περιγράφεται ως παλλόμενος, βαθύς και πολλές φορές έχει διαλείπον χαρακτήρα. Στις περισσότερες περιπτώσεις είναι αρχικά ήπιος και εμφανίζεται κατά τη χρήση της άρθρωσης, ιδιαίτερα δε κατά τη φόρτιση. Με την πάροδο του χρόνου ο πόνος επιτείνεται, εμφανίζεται και κατά την ηρεμία οδηγώντας τον ασθενή σε συχνή χρήση ισχυρών αναλγητικών μέσων. Το εύρος κίνησης της άρθρωσης του ισχίου, συνήθως διατηρείται ακέραιο κατά τα αρχικά στάδια της νόσου. Εντούτοις, η επιδείνωση του άλγους κατά τη χρήση της άρθρωσης και η κατάρρευση της μηριαίας κεφαλής οδηγούν τον ασθενή σε περιορισμό του ενεργητικού και παθητικού εύρους κίνησης (κυρίως κάμψη, απαγωγή και έσω στροφή), ενώ στα τελικά στάδια, όταν πλέον έχουν εγκατασταθεί οι δευτεροπαθείς βαριές οστεοαρθρικές αλλοιώσεις, το εύρος της κίνησης περιορίζεται ακόμα περισσότερο. Οι ασθενείς συχνά παραπονούνται για ευαισθησία στην πάσχουσα περιοχή (Kang et al 2013, Mont et al 2006).

### 1.6. 4 Διαγνωστικές εξετάσεις

Αρχικά λαμβάνεται προσθιοπίσθια και πλάγια ακτινογραφία της λεκάνης και σε περιπτώσεις ύποπτων ευρημάτων απαιτείται μαγνητική τομογραφία. Χαρακτηριστικό ακτινολογικό εύρημα θεωρείται το crescent sign που αντιστοιχεί στην περιοχή κατάρρευσης του υποχόνδριου οστού. Επίσης παρατηρούνται οστεοσκληρυντικές αλλοιώσεις με ανώμαλη παρυφή εντός της κεφαλής και υποχόνδριες κύστεις.



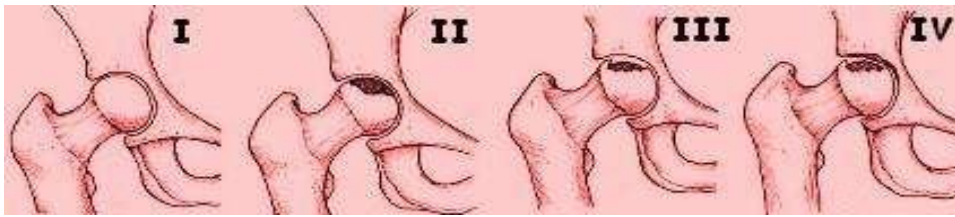
*Εικόνα 1. 14 Μηννοειδές σημείο (crescent sign) σε ακτινογραφία ισχίου*

Σε προχωρημένα στάδια της νόσου, παρατηρείται επιπέδωση του ομαλού σφαιρικού σχήματος της κεφαλής λόγω της καθίζηση του υποχόνδριου οστού της κεφαλής, ενώ ταχύτατα αναπτύσσονται τα κλασσικά ακτινολογικά ευρήματα της οστεοαρθρίτιδας με εμφάνιση οστεόφυτων, εξάλειψη του μεσάρθριου διαστήματος, και υποχόνδρια σκλήρυνση των αρθρικών επιφανειών.

Στη μαγνητική τομογραφία παρατηρείται το σημείο της διπλής γραμμής (double line sign), η οποία περιβάλλει την περιοχή της βλάβης, και απαντάται σε ποσοστό άνω του 80%, καθώς και οστικό οίδημα. Το σπινθηρογράφημα αποκαλύπτει μια κεντρική περιοχή ελαττωμένης πρόσληψης ραδιοφαρμάκου (cold spots), που περιβάλλεται από μια περιοχή αυξημένης πρόσληψης ραδιοφαρμάκου (doughnut sign ή cold-in-hot sign) (Malizos et 2007, Babis et al2011, Assouline-Dayane et al 2002).

### 1.6. 5 Σταδιοποίηση

Η σταδιοποίηση Ficat (Εικόνα 1.16, Πίνακας 1.2) είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την πρόγνωση της εξέλιξης της νόσου και για την επιλογή της θεραπείας (Aldridge 2004).



*Εικόνα 1. 15. Σταδιοποίηση Ficat*

**Πίνακας 1. 2** Σταδιοποίηση άσηπτης νέκρωσης μηριαίας κεφαλής κατά Ficat.

ΣΤΑΔΙΟ	ΚΛΙΝΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ	ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ
<b>0</b>	(-)	Ro (-) MRI: Σημείο διπλής γραμμής (νεκρωτική διαδικασία) Ισχίο υψηλού κινδύνου
<b>I</b>	Άλγος και περιορισμός κινήσεων	Ro (-). MRI: (+) Bone scan: (+)
<b>IIA</b>	Επιδείνωση συμπτωμάτων	Ro: Σκληρύνσεις και διαυγάσεις. Σχήμα κεφαλής φυσιολογικό
<b>IIB</b>		Ro: Crescent sign
<b>III</b>	Επιδείνωση συμπτωμάτων	Ro: Καθίζηση αρθρικής επιφάνειας και απώλεια σφαιρικότητας της κεφαλής.
<b>IV</b>	Σοβαρή δυσκαμψία	Ro: OA ισχίου

### 1.6. 6 Θεραπεία

Στόχος της θεραπείας της άσηπτης νέκρωσης της μηριαίας κεφαλής είναι η διατήρηση της άρθρωσης του ισχίου για όσο το δυνατόν μακρότερο χρονικό διάστημα. Λαμβάνοντας υπόψη την ηλικία του ασθενούς, το στάδιο της νόσου, τη θέση και την έκταση της βλάβης και την υποκείμενη αιτία της άσηπτης νέκρωσης, διατίθενται 3 θεραπευτικές επιλογές: α) Η συντηρητική θεραπεία β) Η χειρουργική παρέμβαση με διατήρηση της άρθρωσης και γ) Η ολική αντικατάσταση της άρθρωσης.

Η συντηρητική αγωγή έχει χρησιμοποιηθεί πειραματικώς είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό, αλλά σπάνια επιφέρουν μακρόχρονα θετικά αποτελέσματα. Περιλαμβάνει περιορισμό της φόρτισης, φαρμακευτική αγωγή με διφωσφονικά και βιοφυσικές θεραπευτικές μεθόδους. Ο σκοπός της φαρμακευτικής αγωγής πριν την κατάρρευση της μηριαίας κεφαλής είναι η βελτίωση του άλγους και της λειτουργικότητας του ισχίου, η

πρόληψη της ακτινολογικής επιδείνωσης και η επούλωση των νεκρωτικών εστιών. Η χειρουργική θεραπεία περιλαμβάνει τρυπανισμούς αποσυμπίεσης για ευόδωση της αιματικής κυκλοφορίας, τοποθέτηση αγγειούμενης περόνης ή ράβδων τανταλίου, οστεοτομίες μηριαίου και τέλος σε ανίατες περιπτώσεις σε ολική αρθροπλαστική του ισχίου Aldridge & Urbaniak 2004, Malizos et al 2007, Rajpura et al 2011).

## 1. 7 ΕΚΤΟΠΗ ΟΣΤΕΟΠΟΙΗΣΗ

Ως έκτοπος οστεοποίηση ορίζεται η παραγωγή οστού στα μαλακά μέρη όπου δεν υπάρχει σκελετικό οστό. Μελετήθηκε αρχικά από τους Reidel (1918), Dejerne και Ceillier (1883) με βάση τα κλινικά χαρακτηριστικά του ασθενούς (Mavrogenis et al 2011). Σήμερα ταξινομείται σε μετατραυματική, μη τραυματική ή νευρογενή, και οστεοϊό μυοσίτιδα προοδευτική ή ινοπλαστική προοδευτική οστεοποίηση (Vanden Bossche & Vanderstraeten 2005). Η νόσος εμφανίζεται συχνότερα σε άντρες ενώ η συνηθέστερη εντόπιση είναι το ισχίο. Αν οφείλεται σε τραυματισμό του εγκεφάλου, η συνηθέστερη εντόπιση είναι ο αγκώνας. Άλλες θέσεις εντόπισης είναι ο ώμος και το γόνατο. Η έκτοπη οστεοποίηση του ισχίου ταξινομείται με βάση το σύστημα Brooker (Brooker et al 1973).



*Εικόνα 1.16. Έκτοπη οστεοποίηση ισχίου*

### 1.7. 1 Παθογένεια

Δημιουργείται κυρίως έπειτα από τραυματισμό των μαλακών μορίων, όπως π.χ.

έπειτα από προσπέλαση του ισχίου για επέμβαση ολικής αρθροπλαστικής (Brooker et al 1973). Επίσης υπάρχει και μία κληρονομική μορφή, η οστεοποιός μυοσίτις, όπου με ελάχιστη βία-τραυματισμό δημιουργούνται αντιδραστικά στο υποδόριο έκτοπες οστεοποιήσεις με τραγικά αποτελέσματα για την ποιότητα ζωής του ασθενούς. Τέλος έκτοπες οστεοποιήσεις παράγονται παραδόξως, έπειτα από τραυματισμούς του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού με πολυήμερη κατάκλιση του ασθενούς στην μονάδα εντατικής θεραπείας, σε απομακρυσμένες και άσχετες με το σημείο του τραυματισμού περιοχές. Σε αυτές τις περιπτώσεις ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι μετά από χειρουργική εξαίρεσή τους το ποσοστό υποτροπής είναι ιδιαίτερα αυξημένο. Για αυτό το λόγο συνίσταται η εξαίρεση της βλάβης να γίνεται τρεις με έξι μήνες έπειτα από την εμφάνισή της και αφού υπάρχουν ακτινολογικά ευρήματα ωρίμανσης (ομαλά όρια, εμφάνιση δοκίδων, μη ανάπτυξη) στις ακτινογραφίες (McCarthy & Sundaram 2005, Sullivan et al 2013).

### **1.7. 2 Θεραπεία**

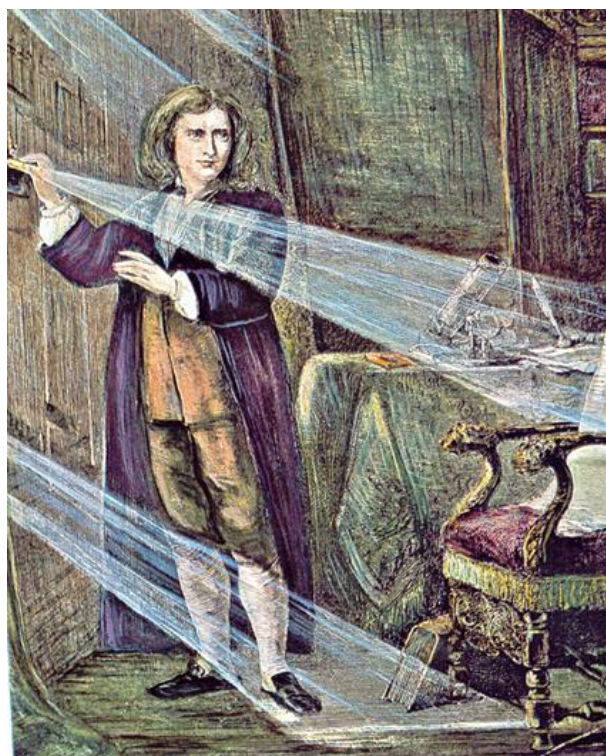
Στην περίπτωση της έκτοπης οστεοποίησης με συμπτώματα, έπειτα από ολική αρθροπλαστική ισχίου συνίσταται εξαίρεση της βλάβης έπειτα από 6 μήνες από το αρχικό χειρουργείο. Πιστεύεται ότι η επικουρική ακτινοθεραπεία στην περιοχή της βλάβης σε δόση 6-7Gy άμεσα μετεγχειρητικά μειώνει το ποσοστό υποτροπής, μειώνοντας τον αριθμό διαφοροποίησης των μεσεγχυματικών κυττάρων σε προγωνικούς οστεοβλάστες. Σε ασθενείς αυξημένου κινδύνου για ανάπτυξη έκτοπης οστεοποίησης, όπως οι ασθενείς με νόσο Paget, δύναται να λάβουν προ της επέμβασης ολικής αρθροπλαστικής ισχίου 600-800 rad. Επίσης στις θεραπευτικές επιλογές συμπεριλαμβάνονται τα διφοσφονικά, με πτωχά αποτελέσματα όταν διακόπτονται, καθώς και η ινδομεθακίνη, με συχνές επιπλοκές του γαστρεντερικού, όπως γαστρορραγία (Koulouvaris et al 2010, Macfarlane et al 2008, Popovic et al 2014, Wick et al 1999).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### ΥΠΕΡΥΘΡΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ

#### 2. 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο πρωτοπόρος της υπέρυθρης φασματοσκοπίας ήταν ο Sir William Herschel (αρχές 1800 μ.Χ.) ο οποίος καθώς διερευνούσε τις θερμικές ηδύτητες του ορατού φάσματος του φωτός κατέληξε στην διαπίστωση ότι η περιοχή στο φάσμα που αντιστοιχεί από το ιώδες προς το ερυθρό ήταν θερμότερη από τις υπόλοιπες ορατές περιοχές του φάσματος. Επιπλέον η αμέσως επόμενη άορατη περιοχή του φάσματος εμφάνιζε την υψηλότερη θερμοκρασία. Οι ακτίνες αυτές εμφάνιζαν ίδιες ιδιότητες με τις ορατές και ονομάστηκαν *calorific rays*. Η έρευνα που ακολούθησε είχε ως αποτέλεσμα την κατασκευή του πρώτου φασματοφωτόμετρου υπέρυθρου (1835). Η αποδοχή της μεθόδου ήταν ραγδαία και ιδιαίτερα στη διάδοσή της συνέβαλαν οι φασματοσκόποι Coblentz και Angstrom τις δεκαετίες 1850 και 1900.



*Εικόνα 2. 1. Η υπέρυθρη φασματοσκοπία διαδόθηκε ταχύτατα τις δεκαετίες 1850 και 1900.*

Παρόλη τη ραγδαία διάδοση της μεθόδου οι πρώτες μελέτες δομής βιολογικών ιστών (π.χ. μελέτη της δευτεροταγούς και τριτοταγούς διαμόρφωσης ενός πολυπεπτιδίου ή πρωτεΐνης) έγιναν το 1950. Γνωστοί φασματοσκόποι που επιχείρησαν να λάβουν φάσματα ιστών ανθρώπων και ζώων και να δημιουργήσουν μία βάση δεδομένων τα «δακτυλικά αποτυπώματα» για κάθε είδος ιστού ήταν οι Blout, Mellors και Woernley (Πετρά 2003). Το επόμενο καθοριστικό βήμα στην μελέτη βιολογικών ιστών ήταν τα φασματοφωτόμετρα υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infrared, FT-IR) το οποίο έδωσε πολύ καλύτερα αποτελέσματα (Theophanides 1978, Sandorfy & Theophanides 1984, Theophanides 1984, 2012, 1012 a, 1015).

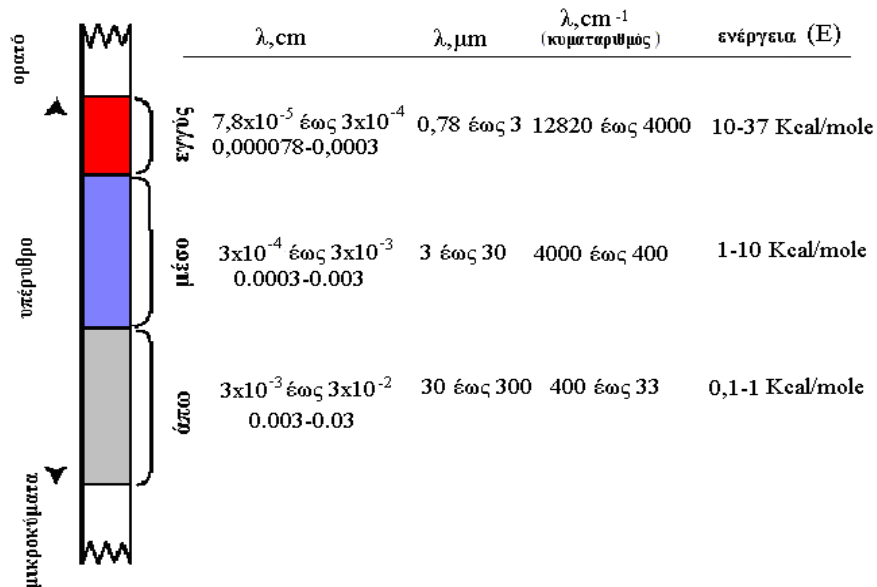
## **2. 2 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΜΕ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ FOURIER (Fourier Transform Infrared, FT-IR)**

Η απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας από τα μόρια μίας βιολογικής ένωσης τα οδηγεί σε διέγερση σε υψηλότερες στάθμες δόνησης. Αυτή είναι η βασική αρχή της υπέρυθρης φασματοσκοπίας και οι ενώσεις στις οποίες προκαλείται διαρκής μεταβολή της διπολικής ροπής έπειτα από την απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας καλούνται ενεργά υπέρυθρες ενώσεις (IR-active) (Θεοφανίδης & Αναστασοπούλου 1998).

Η υπέρυθρη περιοχή του φάσματος (Σχήμα 2.1) ξεκινά από της ορατή περιοχή του φάσματος και φτάνει ως τα μικροκύματα (0.8  $\mu\text{m}$  έως 300  $\mu\text{m}$ ) . Αποτελείται από την περιοχή του εγγύς υπέρυθρου (800 nm έως 2.5  $\mu\text{m}$ ), του μέσου υπέρυθρου (2.5  $\mu\text{m}$  έως 50  $\mu\text{m}$ ) και του άπω υπέρυθρου (50  $\mu\text{m}$  έως 300  $\mu\text{m}$ ).

Το κάθε μόριο με τις χημικές του ομάδες χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένη περιοχή απορρόφησης του υπέρυθρου φάσματος, η οποία και το χαρακτηρίζει και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δακτυλικό αποτύπωμα της διαμόρφωσής του.



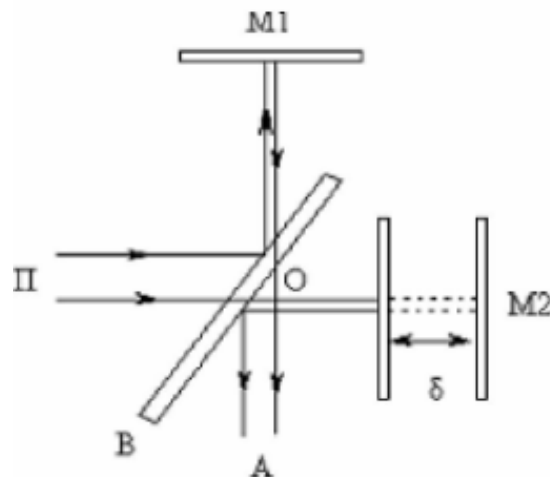


**Σχήμα 2. 1** Η υπέρυθη περιοχή του υπερύθρου φάσματος. Όρια του εγγύς, μέσου και άπω υπερύθρου με τις αντίστοιχες ενέργειές τους.

Με βάση την αρχή λειτουργίας τους τα φασματοφωτόμετρα υπερύθρου διαχωρίζονται σε δύο κατηγορίες:

1) Τα φασματοφωτόμετρα διασποράς (dispersive spectrometers) και 2) τα φασματοφωτόμετρα μη-διασποράς (non-dispersive spectrometers). Τα πρώτα χρησιμοποιούν συνήθως πρίσμα, ενώ στα δεύτερα κάτοπτρο. Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν τα φασματοφωτόμετρα με μετασχηματισμό Fourier.

Ιδιαίτερα πλεονεκτήματα στην καταγραφή του υπερύθρου φάσματος με μετασχηματισμό Fourier προσφέρει η χρήση ενός συμβολόμετρου αντί ενός μονοχρωμάτορα.



**Σχήμα 2. 2** Συμβολόμετρο Michelson. (Π = πηγή, M1 = κάτοπτρο μίξης, M1' = είδωλο του M1 όπως φαίνεται από τη θέση A, M2 = κινητό κάτοπτρο, B = διαιρέτης δέσμης (chopper) και A = αναλυτής. (θεοφανίδης & Αναστασοπούλου 1998)

Το συμβολόμετρο Michelson αποτελεί το βασικό τμήμα ενός φασματοφωτόμετρου Fourier. Έχει δύο κάτοπτρα M1 και M2, κάθετα μεταξύ τους.

Το ένα κάτοπτρο είναι σταθερό (fixed mirror) ενώ το άλλο είτε κινείται (moving mirror) με σταθερή ταχύτητα, είτε σταματά περιοδικά και για μικρά χρονικά διαστήματα. Ανάμεσα στα δύο κάτοπτρα υπάρχει ένα ημιδιαφανές κάτοπτρο που λειτουργεί ως διαχωριστής δέσμης με ανακλαστικότητα και διαπερατότητα 50%.

Με το συμβολόμετρο επιτεύχθηκε η λήψη άμεσα όλου του φάσματος, ενώ η άμεση μετατροπή του με μετασχηματισμό Fourier επιτρέπει την ανάλυση και καταγραφή του φάσματος σε χρόνο πολύ μικρό.

Σήμερα τα φασματοφωτόμετρα είναι συνδεδεμένα με μικροσκόπιο ή μπορούν να είναι δύο διαστάσεων, αλλά η αρχή λειτουργία παραμένει η ίδια. Η ανάπτυξη των κρυστάλλων και η αντικατάστασή τους με αδάμαντα επιτρέπει την μείωση του πάχους της δέσμης και επομένως την διαχωριστική ικανότητα του οργάνου.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### 3.1 ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ ΣΑΡΩΣΗΣ

#### 3.1.1 Ιστορική αναδρομή

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM) αποτελεί παραλλαγή του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και παρέχει τον συνδυασμό εικόνας υψηλής ανάλυσης, στοιχειακής ανάλυσης και πρόσφατα κρυσταλλογραφικής ανάλυσης. Με το SEM μπορεί να γίνει ανάλυση δειγμάτων μεγέθους έως και 10 nm ή και λιγότερο, επίσης να εντοπισθούν κρυσταλλικοί δεσμοί και να προσδιορισθεί ακόμη και το σύστημα κρυστάλλωσης δειγμάτων σε τάξη μεγέθους 1 nm. Τα σύγχρονα ηλεκτρονικά μικροσκόπια με τα δευτερογενή ηλεκτρόνια (secondary electrons) απεικονίζουν το δείγμα ενώ με τα επανασκεδαζόμενα ηλεκτρόνια (backscattered electrons, BES) καθορίζεται το μέγεθος των κρυστάλλων. Η εκμετάλλευση των ανασκεδαζόμενων ηλεκτρονίων (diffracted backscattered electrons, EBSD) μας παρέχει πλέον την δυνατότητα υπολογισμού της κρυσταλλικής δομής (Κολοβού 2009, Πισσαρίδη 2012).

Το πρώτο SEM που χρησιμοποιήθηκε για την εξέταση της επιφάνειας ενός στερεού δείγματος χωρίς εντυπωσιακά αποτελέσματα περιγράφηκε από τον Zworykin ο οποίος μαζί με του Hillier, Snyder (1942) πέτυχαν να υπερσκελίσουν πολλά προβλήματα. Αργότερα, στα τέλη της δεκαετίας του 1940 ο C. W. Oatley, από το Πανεπιστήμιο του Cambridge, ενδιαφέρθηκε για την διεξαγωγή ερευνών στον τομέα της ηλεκτρονιακής οπτικής και αποφάσισε να ανακατασκευάσει το SEM. Το 1953 ο Wells υπό την εποπτεία του Oatley, κατασκεύασε συσκευή SEM, χρησιμοποιώντας επίσης ηλεκτροστατικούς φακούς. Η πρωτοτυπία της συσκευής αυτής SEM αφορά την χρήση εκνεφωτή ηλεκτρονίων στη βάση της στήλης, διαμόρφωση η οποία συνέβαλε σημαντικά στην πειραματική διεργασία.

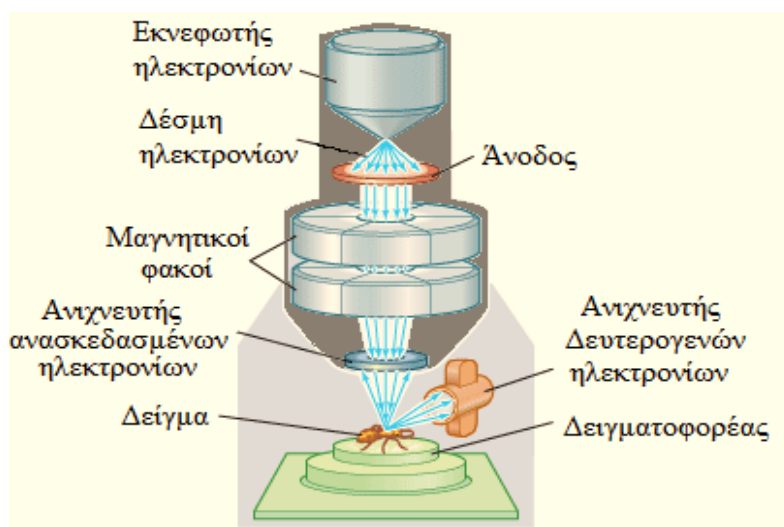
Στις φιλοδοξίες όμως του Oatley συμπεριλαμβανόταν η παραγωγή ενός απλού και χαμηλού κόστους SEM. Για την επίτευξη της ιδέας αυτής ο Peter Spreadbury, ο πέμπτος κατά σειρά συνεργάτης του, κατασκεύασε ένα απλό SEM χρησιμοποιώντας μια λυχνία

καθοδικών ακτίνων (Cathode Ray Tube-CRT) ως πηγή εκπομπής. Έτσι ξεκίνησε μια νέα εποχή από τον Gary Stewart (1958), ο οποίος προσάρμοσε έναν εκνεφωτή ιόντων στον θάλαμο του δείγματος του SEM, το οποίο επέτρεψε τον βομβαρδισμό του δείγματος με ιόντα. Το έργο πάνω στην ιοντική δέσμη διευρύνθηκε αργότερα από τον Alec Broers (1961), ο οποίος βελτίωσε την δέσμη ιόντων, που αποτελούν το οπτικό σύστημα του οργάνου και προσέθεσε ένα μαγνητικό αντικειμενικό φακό για την βελτίωση της ανάλυσης της εικόνας (McMullan 2006).

### 3.1. 2 Αρχές λειτουργίας

Το SEM αποτελεί μια παραλλαγή του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και παρέχει ένα πολύτιμο συνδυασμό εικόνας υψηλής ανάλυσης, στοιχειακής ανάλυσης και πρόσφατα κρυσταλλογραφικής ανάλυσης της δομής του δείγματος. Μπορεί να δώσει ανάλυση δειγμάτων 10 nm ή λιγότερο, να χρησιμοποιηθεί σε σκληρές επιφάνειες, προσφέρει ποσοτική και ημιποσοτική ανάλυση στοιχείων, εντοπίζει κρυστάλλους και προσδιορίζει το σύστημα κρυστάλλωσης δειγμάτων της τάξης μεγέθους 1nm (Suzuki 2002).

Τα ηλεκτρόνια που παράγονται από τον εκνεφωτή του μικροσκοπίου (Σχήμα 3.1) επιταχύνονται με εφαρμογή τάσης και σχηματίζουν δέσμη ηλεκτρονίων, η οποία εστιάζεται πάνω στο δείγμα με σύστημα ισχυρών ηλεκτρομαγνητικών φακών.



**Σχήμα 3. 1** Σχηματική παράσταση της αρχής λειτουργίας SEM. Φαίνονται τα βασικά τμήματα του οργάνου

Η αλληλεπίδραση των ηλεκτρονίων οδηγεί στην διέγερση των ατόμων του δείγματος, τα

οποία κατά την μετάπτωση συνοδεύεται με εκπομπή ακτίνων X (φωτονίων) ενέργειας ίσης με ενεργειακή διαφορά της βασικής και διεγερμένης κατάστασης.

Η μονοχρωματική ενέργεια των εκπεμπόμενων ακτίνων X είναι μοναδιαία και καθορίζει το στοιχείο από όπου εκπέμπεται, επιτρέποντας έτσι την χημική ανάλυση αυτού (EDX). Η αλληλεπίδραση της προσπίπτουσας δέσμης ηλεκτρονίων με το δείγμα παρέχει επιπλέον πληροφορίες σχετικά με την τοπολογική κατάσταση του δείγματος (Smith & Oatley 1955).

Τα ηλεκτρόνια δεσμεύονται από ανιχνευτή όπου καταμετρούνται. Επειδή ο αριθμός των ηλεκτρονίων εξαρτάται από τη γεωμετρία της επιφάνειας στο σημείο πρόσπτωσης της δέσμης, η ανίχνευσή τους προσφέρει σαφείς εικόνες της επιφανειακής δομής του δείγματος. Αυτή η παραλλαγή του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου έχει αρκετά πλεονεκτήματα. Το δείγμα μπορεί να είναι παχύ, αφού η δέσμη δεν χρειάζεται να περάσει δια μέσου αυτού. Επίσης η παραγωγή των ανακρουόμενων ηλεκτρονίων εξαρτάται από τη γωνία πρόσπτωσης της δέσμης στην επιφάνεια. Συνεπώς οι μικρογραφίες του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης έχουν πολύ καλύτερη τρισδιάστατη εμφάνιση από τις συνήθεις. Η διακριτική ικανότητα στα σημερινά SEM είναι της τάξης μερικών nm, πολύ μεγαλύτερη από εκείνη των καλύτερων οπτικών μικροσκοπίων.

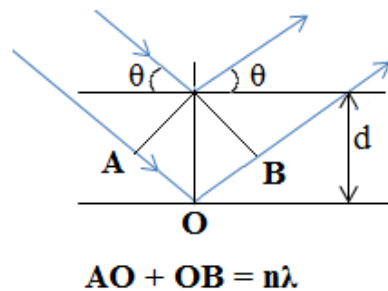
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### 4 ΠΕΡΙΘΛΑΣΙΜΕΤΡΟ ΑΚΤΙΝΩΝ Χ, XRD

#### 4.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Μετά την ανακάλυψη των ακτίνων Χ από τον Röntgen και την παρατήρησή του ότι όταν οι ακτίνες Χ προσπέσουν σε ένα κρύσταλλο, ο κρύσταλλος φθορίζει, ο Max von Laue το 1912 διαπίστωσε ότι οι κρυσταλλικές ουσίες συμπεριφέρονται ως τρισδιάστατα διαφράγματα περίθλασης ακτίνων Χ. Όμως, το μήκος κύματος των ακτίνων Χ, που θα προσπέσουν στον κρύσταλλο, θα πρέπει να είναι παραπλήσιο με την απόσταση των επιπέδων των κρυσταλλικών πλεγμάτων του προς μελέτη υλικού. Στην περίπτωση αυτή η προσπίπτουσα ακτίνα Χ με την ανακλώμενη (περιθλώμενη) από το πλέγμα ακτίνα Χ θα πρέπει να βρίσκονται σε φάση ώστε η συμβολή τους να ενισχύσει το σήμα.

Αργότερα, ο Bragg διατύπωσε ότι η συμβολή των δύο κυμάτων γίνεται για συγκεκριμένη γωνία πρόσπτωσης  $\theta$ . Η συνθήκη συμβολής διαπιστώθηκε ότι ισχύει μόνον αν η διαδρομή ανάμεσα από τα κρυσταλλικά επίπεδα είναι ακέραια πολλαπλάσια του μήκους κύματος των ακτίνων Χ (Σχήμα 4.1).



Σχήμα 4.1 Νόμος Bragg

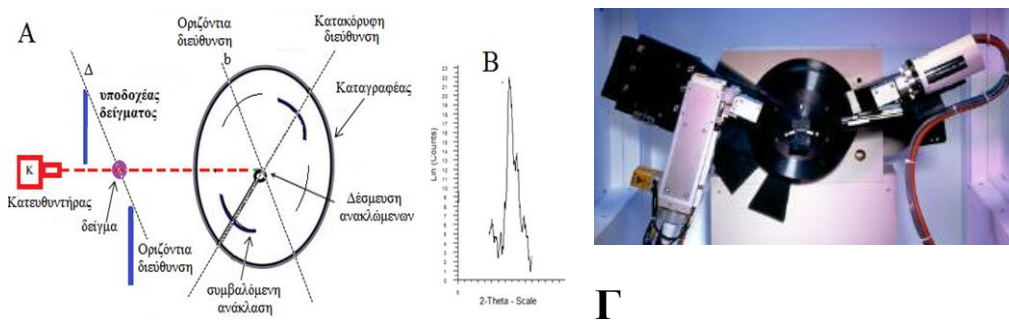
Από το Σχήμα 4.1 εφαρμόζοντας την σχέση :

$$2d\sin\theta = n\lambda \quad [\text{εξ } 4.1]$$

υπολογίζονται οι διαστάσεις και το κρυσταλλικό σύστημα του κρυστάλλου.

## 4.2. ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ

Οι Bragg (υιός και πατέρας) διαπίστωσαν ότι όταν υπάρχει επαναλαμβανόμενο πλέγμα ηλεκτρονίων τότε μπορεί να γίνει περίθλαση των ακτίνων X, η δε συμβολή των γίνεται προς συγκεκριμένες κατευθύνσεις πρόσπτωσης των ακτίνων X. Για τον λόγο αυτό το δείγμα τοποθετείται σε περιστρεφόμενο δίσκο (Σχήμα 4.2) και λαμβάνεται το αντίστοιχο γράφημα για γωνίες  $2\theta$ .



**Σχήμα 4.2** A; Αρχή λειτουργίας XRD. Το δείγμα τοποθετείται σε περιστρεφόμενο δίσκο και καταγράφονται οι συμβαλλόμενες ακτίνες X, B; γράφημα XRD και Γ; Συσκευή XRD

Οι Debye-Sherer διαπίστωσαν ότι η παρουσία των μορίων αέρα παρεμποδίζει την μέτρηση, λόγω πρόσκρουσης με τις ακτίνες X, και γι αυτό κατά την ανάλυση εφαρμόζεται υψηλό κενό. Επίσης απλοποίησαν την εξίσωση Bragg, και τελικά το μέγεθος των κρυστάλλων υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$d = \frac{0.9\lambda}{\beta \cos\theta} \quad [\text{εξ } 4.2]$$

Όπου  $d$  είναι το μέγεθος του κρυστάλλου σε  $\text{\AA}$ ,  $\lambda$  το μήκος κύματος των προσπίπτουσών ακτίνων X,  $\beta$  το εύρος στο ήμισυ του ύψους της ανάκλασης και  $\cos\theta$  είναι το συνημίτονο της προσπίπτουσας γωνίας των ακτίνων X ( $25,85^\circ$ ).

# **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

### 5.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Στο παρόν κεφάλαιο περιγράφονται τα οστά που λήφθηκαν από ασθενείς που υποβλήθηκαν σε αποκατάσταση τμημάτων που οστού ισχίου και γόνατος για διάφορες ασθένειες.

#### 5.1.1 Υλικά

Ο σχεδιασμός και η προετοιμασία των δειγμάτων αποτελούν το σημαντικότερο πλεονέκτημα των αναλύσεων με FT-IR φασματοσκοπία και SEM ανάλυση, δεδομένου ότι και οι δύο μέθοδοι είναι μη καταστρεπτικές. Η ορθή διαδικασία απορρέει από το γεγονός ότι τα δείγματα χρησιμοποιούνται ως έχουν, δηλαδή δεν αφαλατώνονται ούτε βάφονται. Επομένως το βασικό κριτήριο είναι το πάχος των δειγμάτων, έτσι ώστε να τα διαπερνά μόνο η δέσμη της υπέρυθρης ακτινοβολίας.

##### 5.1.1.a Λήψη δειγμάτων ανθρώπινου οστού

Ελήφθησαν δείγματα φλοιώδους και σπογγώδους οστού από 42 ασθενείς ηλικίας 31 έως 87 ετών, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε χειρουργική αντιμετώπιση (Πίνακας 5.1).

**Πίνακας 5.1.** Χαρακτηριστικά των ασθενειών των ληφθέντων δειγμάτων από ασθενείς ηλικίας 31 έως 87 ετών

Ασθένεια	Αριθμός
Δυσπλαστικά ισχία	15
Αγκυλοποιητική Αρθρίτις	1
Έκτοπη Οστεοποίηση	4
Οστεονέκρωση	3
Ρευματοειδής αρθρίτις	1
Χαλάρωση ολικής αρθροπλαστικής γόνατος	2
Χαλάρωση ολικής αρθροπλαστικής ισχίου	4
Ψωριασική αρθρίτις	2
Καρκινικά	10
<b>Σύνολο</b>	<b>42</b>

Από αυτά 15 προήλθαν από ασθενείς με αναπτυξιακή δυσπλασία του ισχίου, 1 με αγκυλοποιητική αρθρίτιδα του ισχίου, 4 από έκτοπη οστεοποίηση του ισχίου, 3 λόγω οστεονέκρωσης της μηριαίας κεφαλής, 1 από ρευματοειδή αρθρίτιδα του γόνατος, 2 από χαλάρωση ολικής αρθροπλαστικής γόνατος, 4 από χαλάρωση ολικής αρθροπλαστικής ισχίου και 2 από ψωριασική αρθρίτιδα (ισχίου και γόνατος) και 10 καρκινικά.

Η σύγκριση με φυσιολογικά και ακτινοβολημένα οστά έγινε από τα δεδομένα του εργαστηρίου Ακτινοχημείας & Βιοφασματοσκοπίας.

### 5.1.1.b Επεξεργασία των δειγμάτων

Τα ληφθέντα δείγματα αμέσως μετά την επέμβαση και προκειμένου να απομακρυνθεί ο λιπώδης ιστός και τα χρωμοφόρα συστατικά του αίματος των οστών τοποθετήθηκαν αρχικά σε διαλύματα 30% υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) για διάστημα 10 min και ακετόνης επί 30 min. Η διαδικασία επαναλήφθηκε εναλλάξ επί 2 ώρες. Τέλος τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε συσκευή υψηλού κενού και θερμοκρασία 30 °C, για τουλάχιστον 1h για την απομάκρυνση της υγρασίας (Πετρά 2003). Η διαδικασία αυτή δεν επηρεάζει τα συστατικά του οστού ούτε τα υπέρυθρα φάσματα.

Επιπλέον, τα δείγματα για την κοπή τους σε μικροτόμο δεν εγκιβωτίστηκαν σε παραφίνη. Τούτο έγινε επειδή διαπιστώθηκε ότι κατά την απομάκρυνση της παραφίνης οι διαλύτες παρασύρουν σημαντικά ευδιάλυτα προϊόντα τα οποία παράγονται κατά την ανάπτυξη της ασθένειας, με αποτέλεσμα την παραποίηση των αποτελεσμάτων. Κάτω από αυτές τις συνθήκες δεν υπάρχει μεταβολή των χημικών δεσμών μεταξύ ανόργανης (μεταλλικής) φάσης, οργανικής φάσης και της διεπιφάνειας. Αντιθέτως, σε ιστοπαθολογικές μεθόδους τα δείγματα καθαρίζονται από τις επασβεστώσεις με χρήση EDTA (Ethylene diamine tetraacetic acid) και αποκαλύπτουν μόνο αλλαγές της οργανικής ζώνης των ιστών.

Επειδή οι τεχνικές οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη των δειγμάτων δεν είναι καταστρεπτικές χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια δείγματα, ώστε από την ίδια θέση να λαμβάνονται όλες οι πληροφορίες και τα αποτελέσματα να είναι αξιόπιστα και να βεβαιώνεται η επαναληψιμότητά τους.

### 5.1.1.c. Προετοιμασία των δειγμάτων και συλλογή των δεδομένων

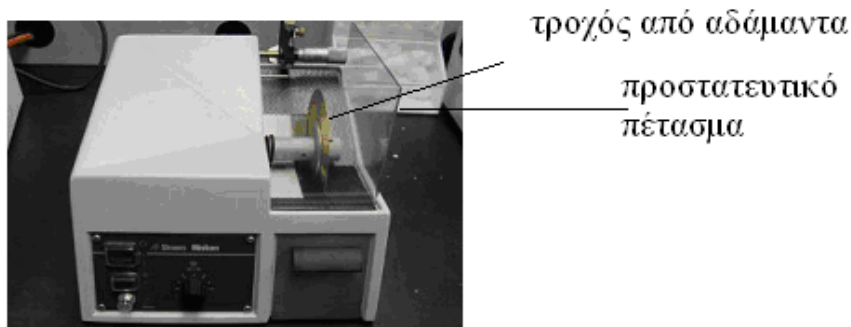
Προς αποφυγή πολλαπλών παραγόντων που μπορεί να επηρεάσουν τα

αποτελέσματα έγινε επιμελής απομάκρυνση του αίματος και του λίπους, παρόλο που στην υπέρυθη φασματοσκοπία το δείγμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως έχει χωρίς επεξεργασία. Ο επιμελής καθαρισμός και η προετοιμασία του δείγματος είναι σημαντικό μέρος ενός επιτυχημένου πειράματος μελέτης δειγμάτων με ATR-FT-IR, micro-FT-IR φασματοσκοπία, SEM-EDX και XRD.

## 5.1.2. Μέθοδοι

### 5.1.2.α Μικροτόμος-Λήψη μικροτομών

Οι μικροτομές των δειγμάτων και η ανάλυση στο SEM έγιναν με μικροτόμο Struers Minitom με δίσκο από αδάμαντα, πάχους 300  $\mu\text{m}$  (Εικόνα 5.1). Σε όλα τα πειράματα διατηρήθηκε το πάχος των οστικών δειγμάτων ίσο με 3  $\mu\text{m}$ .



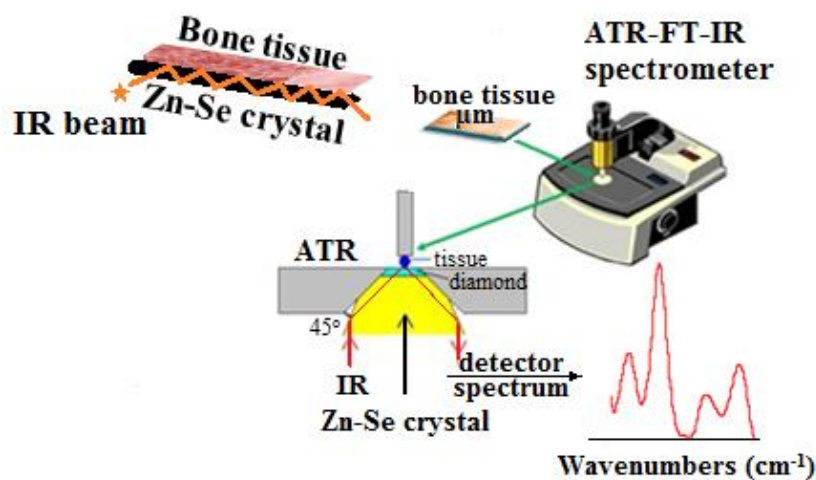
*Εικόνα 5. 1 Μικροτόμος Struers Minitom*

Τα δείγματα δεν εγκιβωτίστηκαν σε παραφίνη ή άλλο στερεωτικό υλικό. Με τον τρόπο αυτό αποφεύχθηκε η πιθανότητα να ανιχνευθεί παραφίνη στο δείγμα ή διαλύτες της παραφίνης να προκαλέσουν αλλοιώσεις στα συστατικά των οστών. Επίσης έχει διαπιστωθεί ότι κατά την «πλύση» των οστών με διαλύτες, κυρίως αρκετά οργανικά συστατικά του οστού απομακρύνονται, αλλοιώνοντας έτσι το αποτέλεσμα της μελέτης.

### 5.1.2. β ATR-FT-IR φάσματα

Η λήψη των υπέρυθρων FT-IR φασμάτων έγινε με τεχνική ATR-FT-IR (Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared). Τα FT-IR φάσματα καταγράφηκαν με

φασματοφωτόμετρο Nicolet 6700 thermoscientific, και διακριτική ικανότητα  $4 \text{ cm}^{-1}$ . Κάθε φάσμα (scans) προέκυπτε από 120 συμβολογραφήματα. Το όργανο έφερε εξάρτημα τεχνικής Αποσβένουσας Ολικής Ανάκλασης (Attenuated Total Reflectance, ATR). Το πλεονέκτημα του εξαρτήματος αυτού είναι ότι το δείγμα δεν υφίσταται καμία επεξεργασία, δηλαδή βαφή ή αφαλάτωση. Όπως δείχνει το Σχήμα 5.1 η δέσμη της υπέρυθρης ακτινοβολίας, μέσω ενός κρυστάλλου αδάμαντα, προσπίπτοντας στο δείγμα το οποίο τοποθετείται σε κρύσταλλο Zn-Se (ψευδαργύρου-σεληνίου), υπό γωνία συνήθως  $45^\circ$  υφίσταται πολλαπλές εσωτερικές ανακλάσεις, αυξάνοντας με τον τρόπο αυτό τον λόγο του σήματος προς τον θόρυβο (μέτρηση ελεγχόμενη από την ανάκλαση) και επομένως την ευαισθησία (Mamarelis 2011, Dritsa 2014).



**Σχήμα 5. 1** Αρχή λειτουργίας ATR-FT-IR φασματοφωτομέτρου. Η υπέρυθρη ακτινοβολία προσπίπτει πάνω στο δείγμα μέσω ενός κρυστάλλου πολλαπλής ολικής ανάκλασης. Ο κρύσταλλος από αδάμαντα επιτρέπει την μείωση της δέσμης και επομένως την διακριτική ικανότητα.

Με τον τρόπο αυτό η συγκέντρωση του δείγματος πολλαπλασιάζεται, επιτρέποντας την μέτρηση πολύ μικρής ποσότητας δείγματος μερικών  $\mu\text{m}$ , μέχρι ακόμη μοναδιαίου κυττάρου. Ο κρύσταλλος από αδάμαντα αυξάνει την λαμπρότητα του φασματοφωτομέτρου (λόγος σήματος προς θόρυβο) μειώνοντας ακόμη περισσότερο τις απαιτούμενες προς ανάλυση διαστάσεις του δείγματος. Τέλος, η υπέρυθρη ακτινοβολία εξερχόμενη από το δείγμα διέρχεται από τον ανιχνευτή για να δώσει το υπέρυθρο φάσμα (Σχήμα 5.1).

Τα δείγματα αρχικά είχαν σταθεροποιηθεί σε φορμαλδεΰδη και στη συνέχεια έγινε έκπλυση με υπεροξείδιο του υδρογόνου και ακετόνη, ώστε να απομακρυνθεί το αίμα και

το λίπος, αντίστοιχα (Πετρά 2002). Η διαδικασία αυτή δεν μεταβάλλει την μοριακή δομή του βιολογικού δείγματος.

### 5.1.2. γ Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM)

Η μελέτη της μορφολογίας και αρχιτεκτονικής ιστών έγινε με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Scanning Electron Microscopy, SEM) της εταιρείας Fei Co, The Netherlands (Εικόνα 5.2). Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης επιτρέπει τη διερεύνηση της επιφάνειας των ιστών.



*Εικόνα 5. 2. Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Fei Co, The Netherlands.)*

Η συσκευή έφερε εξάρτημα EDX (Energy-dispersive X-ray) το οποίο επέτρεπε την χημική ανάλυση των συστατικών των οστών και τις σχετικές συγκεντρώσεις τους.

### 5.1.2.δ. περίθλαση ακτίνων X (XRD)

Η κρυσταλλογραφική ανάλυση των δειγμάτων έγινε με περίθλαση ακτίνων X (XRD) βασισμένη σε αυτόματο σύστημα προσαρμογής και ανάλυσης. Χρησιμοποιήθηκε διαθλασίμετρο Siemens D-500 X-Ray Diffractometer με περιστρεφόμενο δείγμα. Το διάστημα περίθλασης ήταν  $2\theta$   $5^\circ$ - $80^\circ$  και ο ρυθμός της τάξης  $0.030^\circ/s$ . Το XRD δεν επιτρέπει την ανίχνευση άμορφων συστατικών στο δείγμα, αλλά μόνο κρυσταλλικών.

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

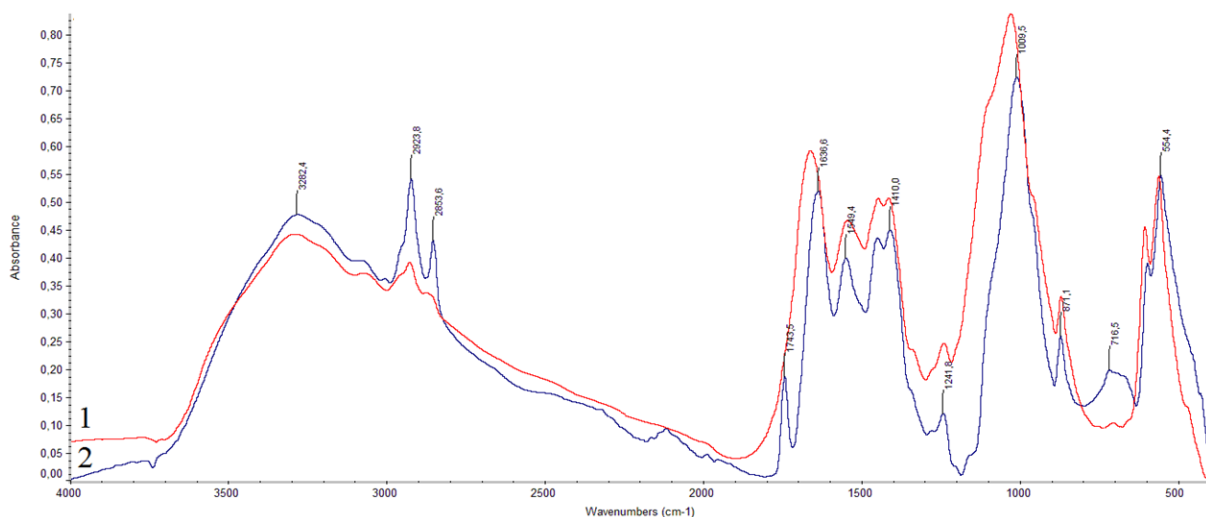
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

Για την συστηματική μελέτη των φασμάτων λήφθηκαν φάσματα ανά κατηγορία ασθένειας και τα εκάστοτε λαμβανόμενα φάσματα συγκρίθηκαν τόσο με υγιή όσο και μεταξύ των διαφόρων ασθενειών. Η επιλογή αυτή επιτρέπει την κατάταξη των συχνοτήτων απορρόφησης των χαρακτηριστικών ταινιών των βιολογικών μορίων τα οποία επηρεάζονται από την ασθένεια. Το υπέρυθρο φάσμα χωρίζεται συνήθως σε τρεις βασικές περιοχές όπως  $4000-2800\text{ cm}^{-1}$ ,  $1800-1500\text{ cm}^{-1}$  και  $1500-400\text{ cm}^{-1}$ . Στις περιοχές αυτές, όπως θα φανεί παρακάτω εμφανίζονται χαρακτηριστικές ταινίες οι οποίες καθορίζουν την μοριακή δομή των οστών.

### 6.1 FT-IR ΦΑΣΜΑΤΑ ΔΥΣΠΛΑΣΤΙΚΩΝ ΙΣΧΙΩΝ

Όπως προαναφέρθηκε η δυσπλασία του ισχίου είναι μια βλάβη, η οποία εντείνεται από την μηχανική τριβή που αναπτύσσεται με τους γειτονικούς ιστούς και τελικά οδηγεί στην χειρουργική αφαίρεση του οστού.

Το Σχήμα 6.1 δείχνει τα υπέρυθρα φάσματα υγιούς (1) και δύσμορφου οστού (2).



**Σχήμα 6. 1** FT-IR φάσματα οστών 1; Υγιούς οστού και 2; Δυσπλαστικού οστού στην περιοχή του φάσματος  $4000-400\text{ cm}^{-1}$ .

Η σύγκριση των φασμάτων δείχνει σημαντικές διαφορές σε όλη την έκταση του φάσματος από 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ . Η ταινία στα 3565  $\text{cm}^{-1}$  η οποία αποδίδεται στις δονήσεις τάσης των ομάδων  $\nu\text{OH}$  του νερού και του υδροξυαπατίτη στο φάσμα του δυσπλαστικού οστού μετατοπίζεται στα 3538  $\text{cm}^{-1}$ , ενώ η ένταση της ταινίας απορρόφησης μειώνεται σημαντικά. Οι διαφοροποιήσεις αυτές δείχνουν ότι στο δυσπλαστικό οστό ο υδροξυαπατίτης περιέχει μικρότερο αριθμό ομάδων  $\text{OH}$  υδροξυλίου. Επίσης παρατηρείται μία μετατόπιση των απορροφήσεων των δονήσεων τάσης  $\nu\text{NH}$  των πρωτεϊνών του δυσπλαστικού οστού. Η μετατόπιση αυτή αποδίδεται στο γεγονός ότι οι δεσμοί υδρογόνου οι οποίοι συγκρατούν την δευτεροταγή δομή του κολλαγόνου έχουν αλλάξει την ενέργειά τους, ως αποτέλεσμα της εκτροπής από την φυσιολογική ανάπτυξη και τη διαμόρφωση της δευτεροταγούς δομής.

Η νέα ταινία στα 3080  $\text{cm}^{-1}$  έχει χρησιμοποιηθεί ως «διαγνωστική ταινία» για την παρουσία ολεφινικής ( $\nu=\text{CH}$ ) τερματικής ομάδας (Mamarelis et al, 2010, 2011, 2011a, Pissaridi 2011, 2013, 2015, Kyriakidou, 2016). Η εμφάνιση της ταινίας αυτής οδηγεί στο συμπέρασμα ότι σε κάποιο στάδιο της ασθένειας αναπτύχθηκε οξειδωτικό στρες, δηλαδή παραγωγή ελευθέρων δραστικών ριζών (ROS, Reactive Oxygen Species). Το οξειδωτικό στρες στην περίπτωση των ασθενών με δυσπλασία ισχίου φαίνεται να επικρατεί για μεγάλο χρονικό διάστημα. Υπέρ της άποψης αυτής συνηγορεί και η αύξηση των εντάσεων των ταινιών οι οποίες αποδίδονται στις απορροφήσεις τάσεις των μεθυλ ( $\nu\text{CH}_3$ ) και μεθυλεν ( $\nu\text{CH}_2$ ) ομάδων των λιπιδίων και φωσφολιπιδίων των μεμβρανών, στην περιοχή του φάσματος 3000-2850  $\text{cm}^{-1}$ .

Η αύξηση των εντάσεων των απορροφήσεων τάσης των μεθυλ και μεθυλενομάδων στην περιοχή του φάσματος 3000-2850  $\text{cm}^{-1}$  συνδέεται με αύξηση της λιποφιλικότητας του περιβάλλοντος, η οποία οδηγεί σε μεταβολή της ρευστότητας των μεμβρανών των κυττάρων. Εξ άλλου αυτό γίνεται περισσότερο αντιληπτό αν ληφθεί ο λόγος των εντάσεων των αντισυμμετρικών και συμμετρικών δονήσεων τάσης των μεθυλ ομάδων  $[\nu_{\text{as}}\text{CH}_3]:[\nu_{\text{s}}\text{CH}_3]$ , ο οποίος μειώνεται σημαντικά, ενώ παράλληλα αυξάνουν οι λόγοι  $[\nu_{\text{s}}\text{CH}_2]:[\nu_{\text{as}}\text{CH}_2]$  και  $[\nu_{\text{s}}\text{CH}_2]:[\nu_{\text{s}}\text{CH}_2]$  (Anastassopoulou & Theophanides 1991). Στην ίδια περιοχή από την εμφάνιση νέας ταινίας στα 1891  $\text{cm}^{-1}$  συμπεραίνεται ο σχηματισμός προϊόντων τα οποία περιέχουν διακλαδούμενη αλειφατική αλυσίδα.

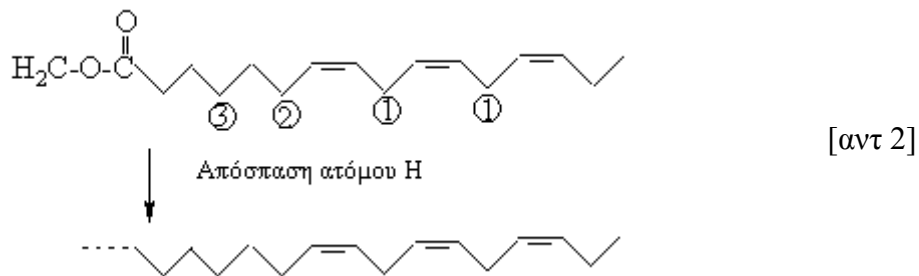
Η παρουσία των δύο αυτών ταινιών ερμηνεύεται πλήρως αν λάβουμε υπόψη την χημεία των ελευθέρων ριζών που παράγονται κατά το οξειδωτικό στρες. Είναι πλέον αποδεκτό ότι κατά τον μεταβολισμό τα ιόντα σιδήρου αντιδρούν εύκολα με υπεροξειδίο



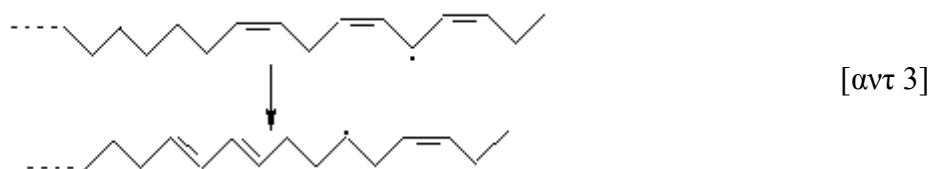
του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) και παράγονται ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου ( $\text{HO}^*$ ), σύμφωνα με την αντίδραση Fenton:



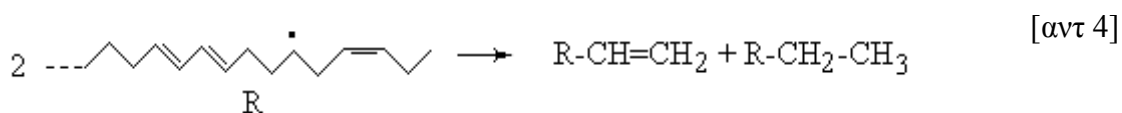
Οι παραγόμενες από την αντίδραση ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου αντιδρούν με τα λιπίδια με αντίδραση απόσπασης ατόμων υδρογόνου σύμφωνα με το σχήμα [αντ 2]



Η παραγόμενη ελεύθερη ρίζα ανασχηματίζεται ταχύτατα:



Οι παραγόμενες ελεύθερες ρίζες από την αντίδραση [3] συνήθως διμερίζονται προς σταθερά προϊόντα, σύμφωνα με την αντίδραση [4]:



Η αντίδραση [4] ερμηνεύει την εμφάνιση της τερματικής ολεφινικής ομάδας στο υπέρυθρο φάσμα του δυσπλαστικού οστού. Αν η παραγωγή ελευθέρων ριζών είναι συνεχής, όπως συμβαίνει σε μια διαρκή φλεγμονή, τότε παράγεται μεγαλύτερος αριθμός ελευθέρων ριζών λιπιδίων και φωσφολιπιδίων οι οποίες οδηγούν στον σχηματισμό και άλλων προϊόντων. Επιβεβαίωση της διαρκούς φλεγμονής γίνεται με την εμφάνιση νέων ταινιών στην περιοχή του φάσματος  $3000\text{-}2850 \text{ cm}^{-1}$ .



Επίσης η αύξηση των εντάσεων των απορροφήσεων των αντισυμμετρικών και συμμετρικών δονήσεων τάσης μεθυλενομάδων ( $\nu\text{CH}_2$ ) συνδέεται με αύξηση των τερματικών ομάδων  $\text{CH}_2$ , λόγω της σχάσης των αλειφατικών αλυσίδων των λιπιδίων και λιπαρών οξέων των μεμβρανών.

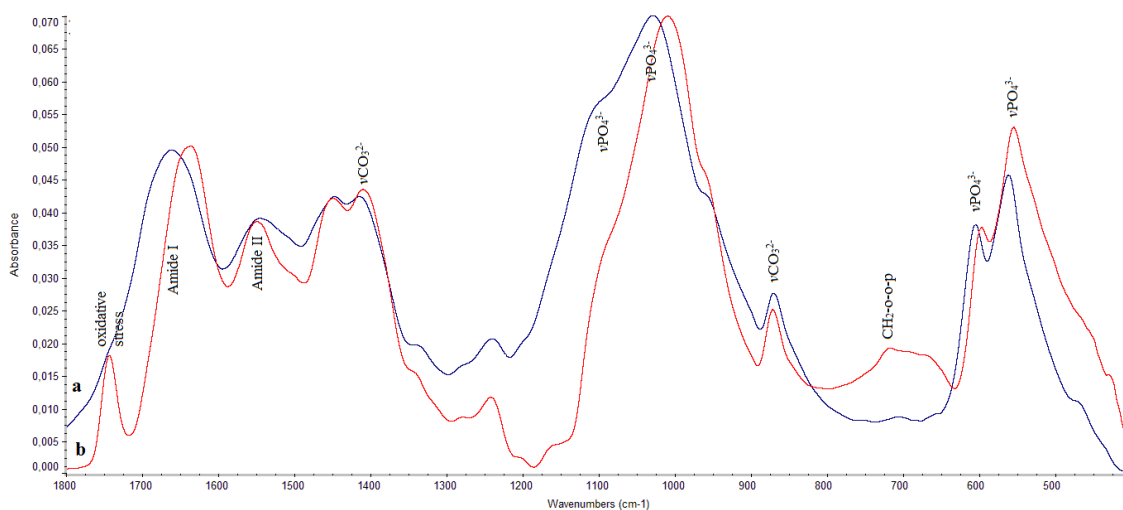
Τα παραπάνω αποτελέσματα βρίσκονται σε συμφωνία με τα μακροσκοπικά κλινικά χαρακτηριστικά του δυσπλαστικού οστού. Διαπιστώνεται ότι η χειρουργική εκτομή των δυσπλαστικών μηριαίων με ειδικό ορθοπαιδικό πριόνι εμφάνιζε αρκετές δυσκολίες, λόγω του ότι οι μηριαίοι αυχένες ήταν αρκετά σκληρότεροι από ότι οι φυσιολογικοί. Μάλιστα στην χειρουργική συγκρίνεται η σκληρότητά του με εκείνη του μαρμάρου. Είναι γνωστό από την κλασική χημεία των πολυμερών ότι τα προϊόντα με διακλαδούμενο (branch polymerization) ή διασταυρούμενο πολυμερισμό (crosslinking) αυξάνουν την σκληρότητά τους. Φυσικά και το σχήμα ήταν παραλλαγμένο. Οι μηριαίοι αυχένες βρέθηκαν βραχύτεροι, ευρύτεροι και δύσμορφοι ως προς τους υγείς. Αλλά, όπως θα δείξουμε πιο κάτω η SEM ανάλυση με ειδικό ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης του ανέδειξε την καταστροφή της συνηθισμένης μορφής του κολλαγόνου, από θεμέλια ουσία στήριξης, σε κατεστραμμένα τυχαίας αρχιτεκτονικής συσσωματώματα.

Όλα τα παραπάνω ευρήματα μπορούν να αποδοθούν στη χρόνια φλεγμονή και ανακατασκευή που επικρατεί στο πάσχον δυσπλαστικό ισχίο από τη γέννηση του ασθενούς έως και το χειρουργείο αντικατάστασης. Είναι γνωστό ότι λόγω πάσχοντος σχήματος, η δυσπλαστική μηριαία κεφαλή δέχεται τα φορτία ανομοιογενώς. Επίσης ο παχύς θύλακος που αναπτύσσεται αντιδραστικά στα δυσπλαστικά ισχία συχνά εγκλωβίζεται εντός της δυσπλαστικής άρθρωσης, προστρίβεται με την κίνηση και αναπτύσσει χρόνια φλεγμονή με αποτέλεσμα την περαιτέρω καταστροφή του χόνδρου και του υποκείμενου υποχόνδριου οστού. Η ακτινογραφία (Εικόνα 6.1) μας δείχνει ότι οι μηριαίες κεφαλές του ασθενούς είναι αποπλατυσμένες με παχυμένο μη λειτουργικό και ιδιαίτερα σκληρό χόνδρο και υποχόνδριο οστού, ως αποτέλεσμα του οξειδωτικού στρες.



**Εικόνα 6. 1** Χαρακτηριστική απεικόνιση με ακτίνες Χ δυσπλαστικού- εξάρθρωμένου ισχίου, με αποπλάτυνση της μηριαίας κεφαλής και βραχύ-διευρυμένο αυχένα.

Η περιοχή του φάσματος από  $1800\text{ cm}^{-1}$  μέχρι  $400\text{ cm}^{-1}$  παρουσιάζει περισσότερο ενδιαφέρον επειδή περιλαμβάνει τις δονήσεις των αμινομάδων των πρωτεϊνών και των φωσφορικών ομάδων του υδροξυαπατίτη. Στο Σχήμα 6.2 φαίνονται τα FT-IR φάσματα υγιούς οστού (Σχήμα 6.2 a) και δυσπλαστικού οστού (Σχήμα 6.2 b) στην περιοχή του φάσματος  $1800\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ .

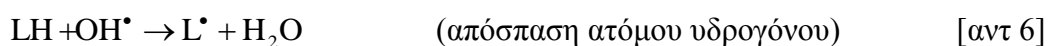


**Σχήμα 6. 2** FT-IR φάσματα οστών: a; υγιούς οστού και b; δυσπλαστικού οστού στην περιοχή  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ .

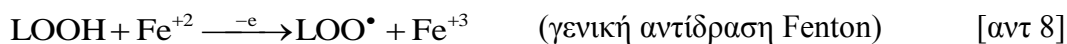
Από την σύγκριση των δύο φασμάτων φαίνονται σημαντικές διαφορές. Η νέα ταινία στα  $1743\text{ cm}^{-1}$ , η οποία εμφανίζεται στο φάσμα του δυσπλαστικού οστού, αποδίδεται στην παρουσία αλδεϋδικού καρβοξυλίου ( $\text{C}=\text{O}$ ). Η ταινία αυτή σε συνδυασμό με την εμφάνιση της ταινίας την οποία εντοπίσαμε στα  $3080\text{ cm}^{-1}$  επιβεβαιώνουν την επίδραση του οξειδωτικού στρες το οποίο φαίνεται να επικρατεί στην δυσπλασία. Όπως προαναφέρθηκε η δυσπλασία συνοδεύεται με φλεγμονή του ισχίου. Είναι αποδεκτό πλέον ότι η φλεγμονή είναι αποτέλεσμα επίδρασης του οξειδωτικού στρες (Anastassopoulou et al, 2015, Mamarelis et al, 2010, 2011, 2011a, Pissaridi 2011, 2013, Dritsa 2013, 2015, Kyriakidou, 2016).

Η εμφάνιση της ταινίας στα  $1743\text{ cm}^{-1}$  σε συνδυασμό με την ταινία στα  $3080\text{ cm}^{-1}$ , που σχολιάστηκε προηγουμένως, επιβεβαιώνουν την υπεροξείδωση των μεμβρανών στην περίπτωση των δυσπλαστικών οστών, λόγω της χρόνιας φλεγμονής την οποία προκαλεί η τριβή, εξαιτίας της ανατομικής βλάβης.

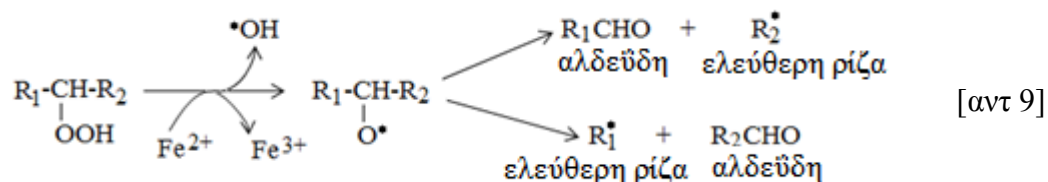
Στα βιολογικά συστήματα η διάσπαση των υπεροξειδίων των λιπιδίων σε αλδεϋδες γίνεται παράλληλα με την αυτοοξειδωση των λιπαρών οξέων και τη λιπιδική υπεροξείδωση (αντιδράσεις [6] και [7]).



Αυτές οι δευτερογενείς αντιδράσεις ενισχύονται από την παρουσία μεταβατικών μεταλλικών ιόντων, διασπώντας τα λιπιδικά υπεροξειδία σε αλκοξυλικές ρίζες με αντιδράσεις ανάλογες κατά Fenton, σύμφωνα με την γενική αντίδραση [αντ 8]:



Οι παραγόμενες αλκοξυλ ελεύθερες ρίζες ( $\text{LOO}^\bullet$ ) των λιπιδίων, επειδή δεν είναι σταθερές, διασπώνται ομολυτικά, σε οποιαδήποτε πλευρά της αλκοξυλομάδας, σχηματίζοντας αλδεϋδες και ρίζες των λιπιδίων.



Η αντίδραση [9] δεν είναι απλή και λαμβάνει χώρα σε πολλά στάδια.

Στην περιοχή του φάσματος μεταξύ  $1700-1500\text{ cm}^{-1}$  αναμένονται οι δονήσεις κάμψης των Amide I και Amide II των πεπτιδικών ομάδων των πρωτεϊνών. Στον Πίνακα 6.1 δίνονται οι δονήσεις του πεπτιδικού δεσμού των αλυσίδων.

**Πίνακας 6. 1** Χαρακτηρισμός των δονήσεων των πεπτιδικών δεσμών

Πεπτιδικός δεσμός	Κυματαριθμοί $\text{cm}^{-1}$	Χαρακτηρισμός ταινίας
Amide I	1650	$\nu\text{C}=\text{O}$ (80%) & $\nu\text{C}-\text{N}$ , $\delta\text{ipN}-\text{H}$ (20%)
Amide II	1550	$\delta\text{ipN}-\text{H}$ (60%) & $\nu\text{C}-\text{N}$ (40%)
Amide III	1250	$\nu\text{C}-\text{N}$ (60%) & $\delta\text{ipN}-\text{H}$ (40%)
Amide IV	630	$\delta\text{ipN}-\text{C}=\text{O}$
Amide V	700	$\delta\text{opN}-\text{H}$
Amide VI	600	$\delta\text{opC}=\text{O}$
Amide VII	200	Rotation internal of C-N

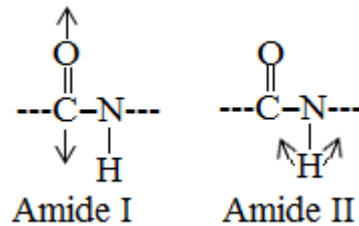
Η θέση και το εύρος των ταινιών των χαρακτηριστική απορροφήσεων των πεπτιδικών ομάδων εξαρτάται σημαντικά από την διαμόρφωση των πρωτεϊνών.

Στον Πίνακα 6.2 δίνονται οι απορροφήσεις των Amide I, Amide II και Amide III των δυσπλαστικών οστών, όπως υπολογίσθηκαν για τους ασθενείς.

**Πίνακας 6. 2** Χαρακτηριστικές ταινίες απορρόφησης IR σε συνάρτηση με την διαμόρφωση της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών

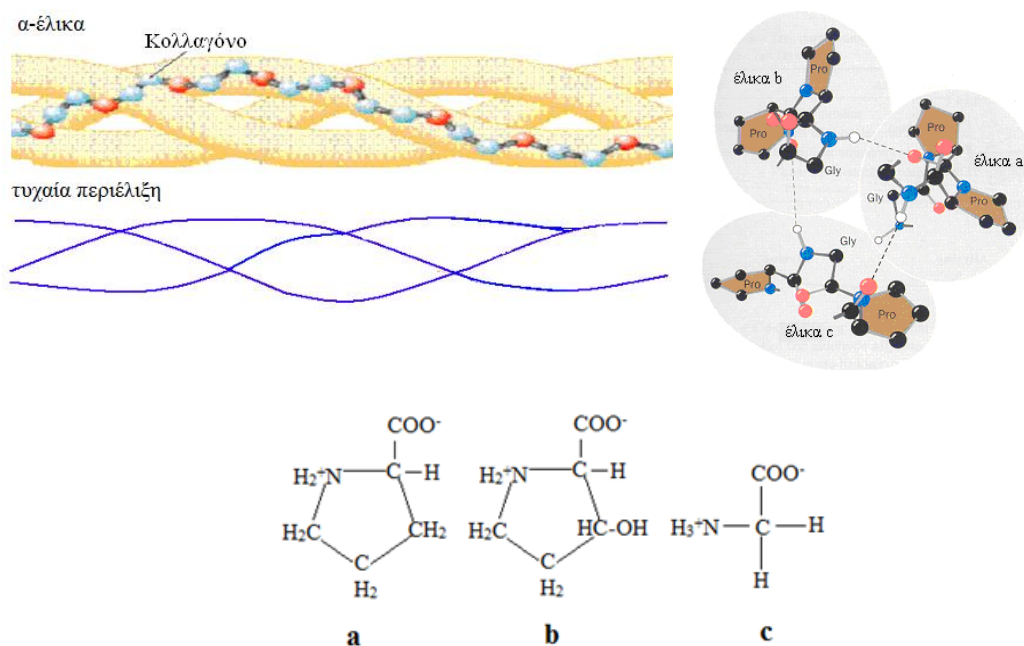
Διαμόρφωση πρωτεΐνης	Amide I $\text{cm}^{-1}$	Amide II $\text{cm}^{-1}$	Amide III $\text{cm}^{-1}$
$\alpha$ -έλικα	1650-1659	1550-1555	1260, 1260-1310
$\beta$ -επίπεδα //	1633		1245-1235
$\beta$ -επίπεδα αντι-//	1684		
B-turns	1672	1531	1330□1290
Τυχαία περιέλιξη	1600-1635	1530	1253□1243

Η ισχυρή έντασης ταινία η οποία εμφανίζεται στα  $1655\text{ cm}^{-1}$  αποδίδεται στην δόνηση κάμψης της πεπτιδικής ομάδας δNH πρωτεϊνών (Amide I). Στην ταινία αυτή συμμετέχει και η δόνηση τάσης  $\nu\text{C-N}$  και η δόνηση κάμψης δN-H εντός επιπέδου των ομάδων του πεπτιδικού δεσμού (Σχήμα 6.3).



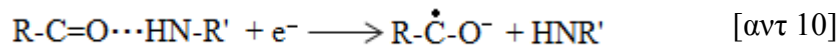
**Σχήμα 6.3** Δονήσεις των ατόμων τάσης και κάμψης στον πεπτιδικό δεσμό

Η ταινία αυτή είναι πάρα πολύ ευαίσθητη στις μεταβολές τόσο του περιβάλλοντος όσο και στις διαμορφώσεις των αλυσίδων των πρωτεϊνών, οι οποίες σχηματίζουν το κολλαγόνο. Οι μετατοπίσεις των απορροφήσεων του μεγίστου της δόνησης των Amide I προς μικρότερους κυματαριθμούς δηλώνουν ότι η έλικα του κολλαγόνου μεταβάλλει την διαμόρφωση από α-έλικα που έχει στην φυσιολογική διαμόρφωση σε τυχαία έλικα. (Μαμαρέλης 2010, Μαυρογένης 2016) Στο Σχήμα 6.4 δίνεται η τριπλή έλικα του κολλαγόνου και οι θέσεις των δεσμών υδρογόνου οι οποίοι σχηματίζουν την έλικα, καθώς και οι χημικοί τύποι των αμινοξέων τα οποία επικρατούν στο κολλαγόνο των οστών.



**Σχήμα 6.4** Τριπλή α-έλικα του κολλαγόνου, τυχαία περιέλιξη και οι χημικοί τύποι των αμινοξέων από τα οποία σχηματίζεται. a: προλίνη, b: υδροξυπρολίνη και c: γλυκίνη.

Η μεταβολή της δευτεροταγούς διαμόρφωσης των κολλαγονούχων πρωτεϊνών αποδίδεται και πάλι στην αλληλεπίδραση των ελευθέρων ριζών και την μεταφορά ηλεκτρονίων με αποτέλεσμα την σχάση των δεσμών υδρογόνου που συγκρατούν την τριπλή έλικα (Kolonou & Anastassopoulou 2007, Anastassopoulou et al 2012, Petra et al 1999, 2000, 2005). Είναι γνωστό ότι η μεταφορά ηλεκτρονίου στον πεπτιδικό δεσμό είναι μία ταχύτατη αντίδραση προσθήκης στο καρβονύλιο του πεπτιδικού δεσμού, με αποτέλεσμα την καταστροφή του δεσμού υδρογόνου (Spinks & Woods 1990, Von Sonntag 1987)



Το γεγονός ότι οι ελεύθερες ρίζες επιδρούν στα βιολογικά μόρια επιβεβαιώνονται από την έρευνα του Brochmann και των συνεργατών του (Brochmann 2003), οι οποίοι απέδειξαν ότι με μεταβολή των διατροφικών συνθηκών επέτυχαν να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη οξειδωτικού στρες συμβάλλοντας στην αύξηση της πυκνότητας των οστών.

Η κορυφή στα  $1550 \text{ cm}^{-1}$  αποδίδεται στην δόνηση των ομάδων Amide II και οφείλεται κατά 60% στη δόνηση κάμψης εντός του επιπέδου (in-plane) της ομάδας  $-\delta\text{NH}$  και κατά 40% στη δόνηση τάσης της ομάδας  $\nu\text{C-N}$ . Η ταινία αυτή αποδίδεται στην διαμόρφωση της έλικας του κολλαγόνου σε α μορφή [Πετρά 2003, Κολοβού 2009, Μαμαρέλης 2010]. Η ταινία αυτή μετατοπίζεται προς μικρότερους κυματαριθμούς στα δυσπλαστικά οστά. Όπως είναι γνωστό η εμφάνιση της ταινίας στα  $1530 \text{ cm}^{-1}$  συνδέεται με την παρουσία κολλαγόνου με δευτεροταγή δομή τυχαίας περιέλιξης.

Οι κορυφές στα  $1450 \text{ cm}^{-1}$  και  $1418 \text{ cm}^{-1}$  αποδίδονται στην απορρόφηση των ανθρακικών ιόντων του  $\text{CaCO}_3$  τύπου AB και B, αντίστοιχα. Η ταινία στα  $1418 \text{ cm}^{-1}$  συνδυαζόμενη με την ταινία στα  $870 \text{ cm}^{-1}$  η οποία οφείλεται στην δόνηση τάσης των ανθρακικών ιόντων  $\nu_2\text{CO}_3^{2-}$ , επιβεβαιώνουν την επικράτηση του υδροξυαπατίτη τύπου B. Είναι γνωστό ότι στον υδροξυαπατίτη τύπου B φωσφορικά ιόντα έχουν αντικατασταθεί από ισάριθμα ανθρακικά ιόντα (Anastassopoulou et al 2009, Nyquist & Kagel 1971, Okazaki, 1983, El Feki C.Rey, Vignoles, 1991). Τα ευρήματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η ασθένεια προκαλεί αντικατάσταση των φωσφορικών ιόντων από ανθρακικά. Το φαινόμενο αυτό θα πρέπει να ευνοείται από την ανάπτυξη της φλεγμονής, λόγω της οποίας θα μειώνεται τοπικά το pH του περιβάλλοντος των κυττάρων. Προχωρώντας προς μικρότερους κυματαριθμούς η κορυφή που παρατηρείται στα  $1242 \text{ cm}^{-1}$  αντιστοιχεί στις δονήσεις  $\nu\text{CN}$   $\delta\text{NH}$  των Amide III.

Η περιοχή του φάσματος μεταξύ 1200-800 παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για

την μελέτη των οστών. Στην περιοχή αυτή εμφανίζονται οι απορροφήσεις των δονήσεων τάσης των φωσφορικών ομάδων του υδροξυαπατίτη. Παρατηρείται ότι οι ταινίες του φάσματος του οστού με δυσπλασία εμφανίζει σημαντικές διαφορές τόσο ως προς την ένταση όσο και ως προς τις μετατοπίσεις προς μικρότερους κυματαριθμούς από τις αντίστοιχες δονήσεις των ιδίων ομάδων στα υγιή οστά. Οι μετατοπίσεις αυτές συνδέονται με την μετατροπή του βιολογικού υδροξυαπατίτη σε άμορφο φωσφορικό ασβέστιο.

Η μετατροπή του υδροξυαπατίτη σε φωσφορικά άλατα δικαιολογεί απόλυτα τα κλινικά συμπτώματα των ασθενών, όπως την παραγωγή θραυσμάτων του οστού και της «μαρμάρινης» υφής. Όπως είναι γνωστό ο υδροξυαπατίτης προσδίδει ελαστικότητα στο οστό, σε αντίθεση με τα φωσφορικά άλατα. Επομένως η μείωση του υδροξυαπατίτη και της ελαστικότητας οδηγούν σε αύξηση των φωσφορικών αλάτων και την σκληρότητα του οστού με αποτέλεσμα την αύξηση της πιθανότητας θραύσης. Όπως προαναφέρθηκε κατά τη χειρουργική εκτομή διαπιστώθηκε η σκληρή και άκαμπτη σύσταση του πάσχοντος φλοιώδους οστού.

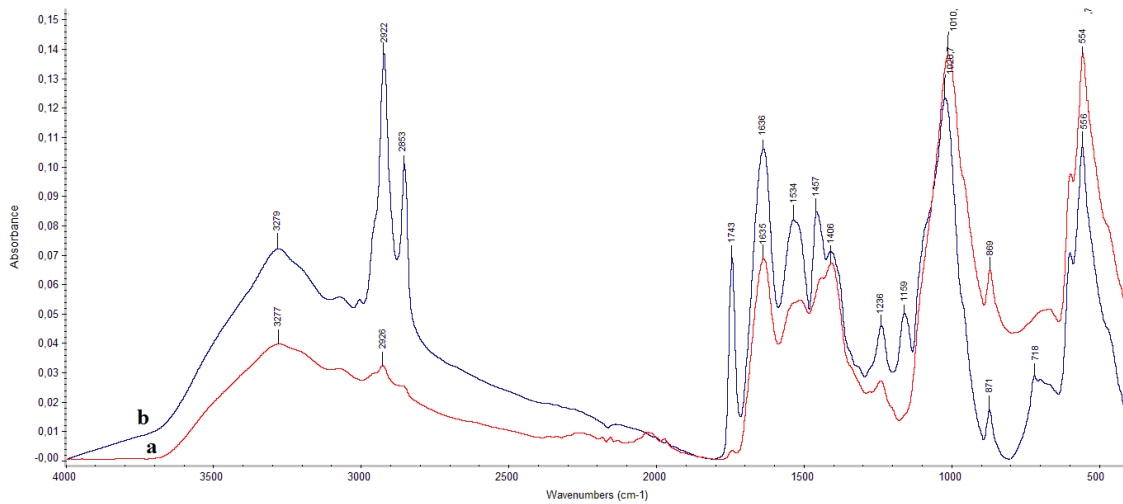
Τέλος, η παρατηρούμενη στους ασθενείς καταστροφή της επιφάνειας του χόνδρου με ρωγμές στην επιφάνειά του και η εκφύλιση-καταστροφή της άρθρωσης θεωρείται προδιαγεγραμμένη. Επίσης η καταστροφή της φυσιολογικής δομής της α-έλικας των πρωτεϊνών συμβάλλει στην καταστροφή του βιολογικού υδροξυαπατίτη, αφού καταστρέφεται το ικρίωμα.

Ιδιαίτερα πρέπει να τονισθούν οι μετατοπίσεις τις οποίες εμφανίζουν οι δονήσεις των φωσφορικών ομάδων στην περιοχή  $600-400\text{ cm}^{-1}$ . Η περιοχή αυτή συνδέεται με την ενυδάτωση των φωσφορικών ομάδων. Οι μετατοπίσεις των ταινιών στα φάσματα των δυσπλαστικών οστών φαίνεται ότι η μεταβολή της ποιότητας του υδροξυαπατίτη και η απόκλιση από την βιολογική δομή του δείχνει ότι επηρεάζει και την ενυδάτωση των ιόντων. Η παρατηρούμενη αφυδάτωση ενισχύεται και από την κλινική εικόνα των ασθενών, στους οποίους η μηχανική τριβή αυξάνει το αποτέλεσμα της βλάβης.

### **6.1.1 Σύγκριση μεταξύ φλοιώδους και σπογγώδους δυσπλαστικού οστού**

Προκειμένου να δούμε την περαιτέρω επίδραση της δυσπλασίας στο οστό σε μοριακό επίπεδο συγκρίθηκαν τα φάσματα φλοιώδους και σπογγώδους οστού. Στο Σχήμα 6.5 δίνονται τα FT-IR φάσματα φλοιώδους (καμπύλη a) και σπογγώδους οστού (καμπύλη b).

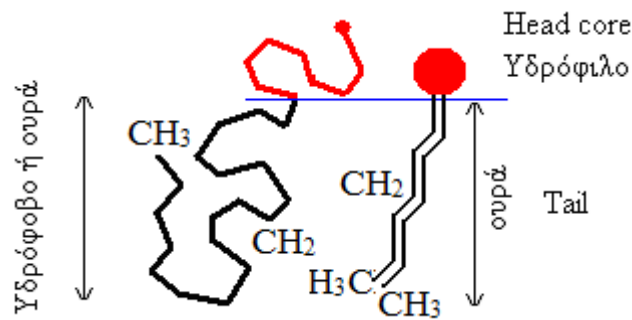




**Σχήμα 6. 5** FT-IR φάσματα δυσπλαστικού οστού: *a*; Φλοιώδους και *b*; Σπογγώδους στην περιοχή  $4000-400\text{ cm}^{-1}$

Όπως φαίνεται από την μορφή των φασμάτων οι διαφορές μεταξύ φλοιώδους και σπογγώδους οστού επισημαίνονται κυρίως στις περιοχές του φάσματος  $4000-2850\text{ cm}^{-1}$ ,  $1800-1100\text{ cm}^{-1}$ , σε περιοχές δηλαδή όπου εμφανίζονται οι δονήσεις τάσης των χαρακτηριστικών ομάδων που διακρίνουν την οργανική φάση. Οι διαφορές σημειώνονται κυρίως στις εντάσεις των ταινιών και αυτό είναι αναμενόμενο δεδομένου ότι το σπογγώδες οστό είναι περισσότερο πλούσιο σε οργανική φάση από ότι το φλοιώδες. Έτσι, οι εντάσεις των ταινιών των δονήσεων τάσης των ομάδων  $\text{CH}_3$  και  $\text{CH}_2$  δεν είναι αρκετά έντονες στο φλοιώδες οστό, αφού αποτελείται από υδροξυαπατίτη, ενώ το οργανικό τμήμα είναι κολλαγονούχες πρωτεΐνες που αποτελούν την θεμέλια ουσία του οστού (matrix). Αυτό επιβεβαιώνεται με την ανάλυση του φάσματος του φλοιώδους οστού, όπου δεν εμφανίζονται οι ταινίες των δονήσεων τάσης των μεθυλομάδων ( $\text{CH}_3$ ), δεδομένου ότι τα αμινοξέα δεν περιέχουν μεθυλομάδες, όπως συμβαίνει στις αλειφατικές αλυσίδες των λιπιδίων και φωσφολιπιδίων των μεμβρανών των κυττάρων. Αντίθετα, στην περίπτωση του σπογγώδους οστού οι εντάσεις των ταινιών είναι μεγάλες. Η ένταση των ταινιών των συμμετρικών και αντισυμμετρικών δονήσεων τάσης των μεθυλ και μεθυλενομάδων καθορίζει το λιπόφιλο ή υδρόφιλο περιβάλλον το οποίο επικρατεί στον χώρο όπου δονούνται (Anastassopoulou & Theophanides1990).

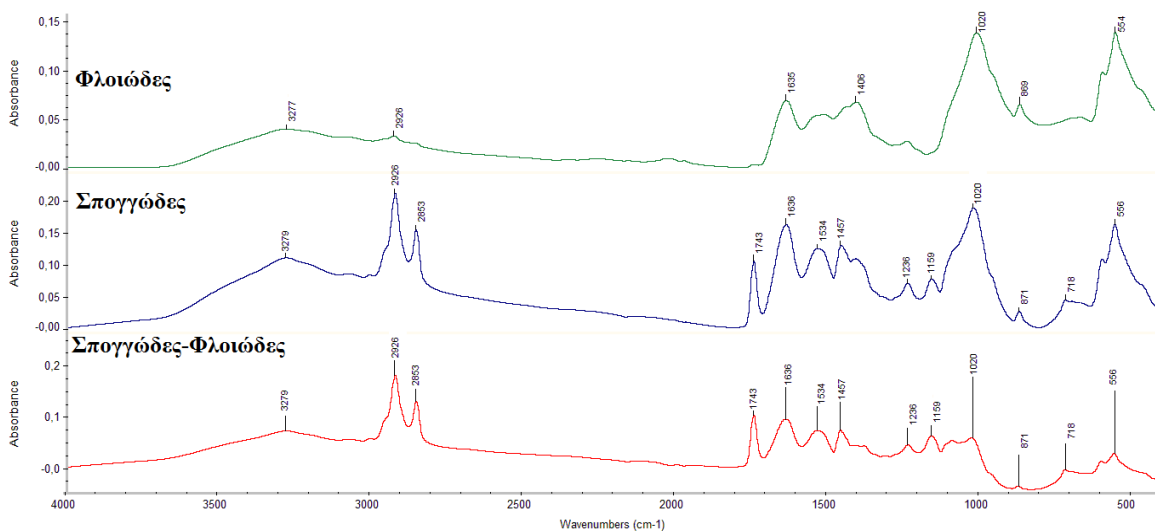
Όπως είναι γνωστό, οι μεμβράνες αποτελούνται από μακρομόρια που είναι αμφίφιλα, δηλαδή φέρουν ένα υδρόφιλο τμήμα “head core” και ένα υδρόφοβο τμήμα “tail” (Αναστασοπούλου & Θεοφανίδης 2009, Αναστασοπούλου κ.ά. 2015).



**Σχήμα 6. 6** Σχηματική παράσταση της δομής των μακρομορίων που σχηματίζουν μεμβράνες. Φαίνεται το υδρόφιλο και υδρόφοβο τμήμα των μορίων

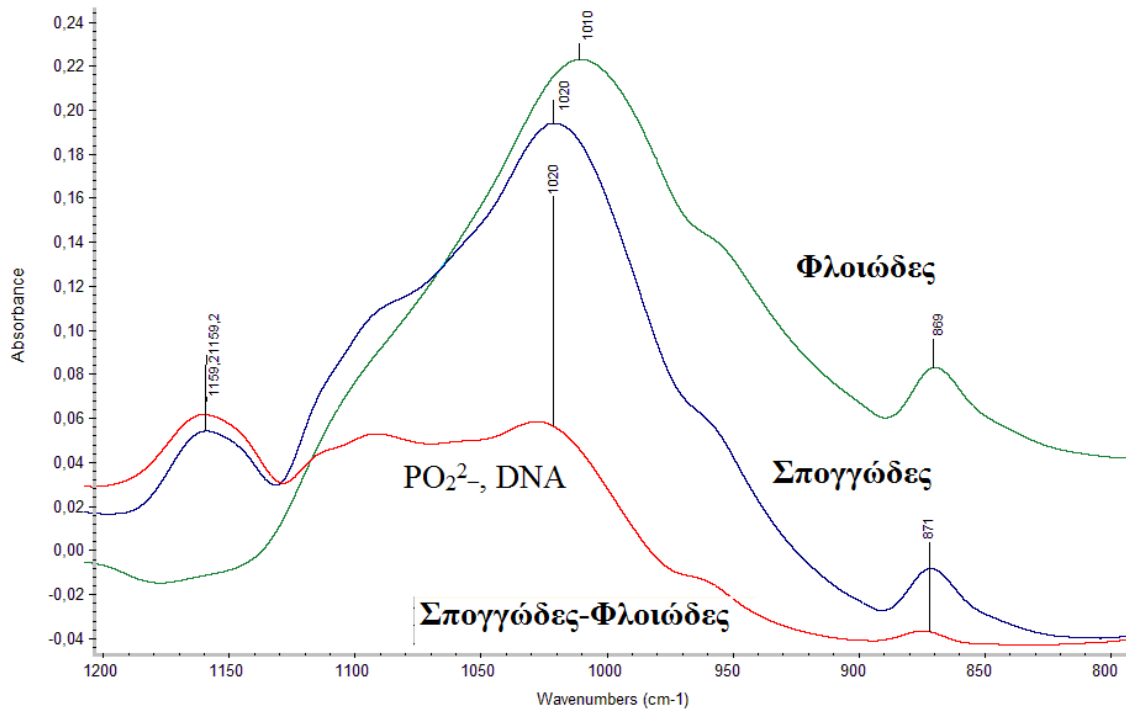
Ιδιαίτερα πρέπει να τονισθεί η εμφάνιση της ταινίας απορρόφησης στα  $1743\text{ cm}^{-1}$  και η μεγάλη έντασή της. Η ταινία όπως προαναφέρθηκε συνδέεται με την υπεροξείδωση των μεμβρανών των κυττάρων, ενώ παράλληλα μας δείχνει την φλεγμονώδη διεργασία την οποία προκαλεί η δυσπλασία των οστών. Μάλιστα οι ταινίες ομοιάζουν με τις αντίστοιχες οι οποίες παρατηρήθηκαν στις αθηρωματικές πλάκες των καρωτίδων και που είχαν συνδεθεί με την LDL στον υπενδοθηλιακό χώρο (Jawien 2008, Μαμαρέλης 2010, Mamarelis et al 2010,2011, Dritsa 2013, 2015, Pissaridi et al 2013).

Τα παραπάνω επιβεβαιώνονται αν από το φάσμα του σπογγώδους οστού αφαιρεθεί το αντίστοιχο φάσμα του φλοιώδους (Σχήμα 6.7). Όπως είναι αναμενόμενο, οι παραμένουσες μετά την αφαίρεση ταινίες επιβεβαιώνουν ότι το σπογγώδες οστό είναι πιο πλούσιο σε οργανική φάση (θετικές απορροφήσεις).



**Σχήμα 6. 7** FT-IR φάσματα φλοιώδους, σπογγώδους οστού και του φάσματος μετά την αφαίρεσή τους στην περιοχή  $4000-400\text{ cm}^{-1}$ .

Ενδιαφέρον παρουσιάζεται μετά την αφαίρεση των φασμάτων στην περιοχή του φάσματος  $1200-800\text{ cm}^{-1}$  (Σχήμα 6.8).

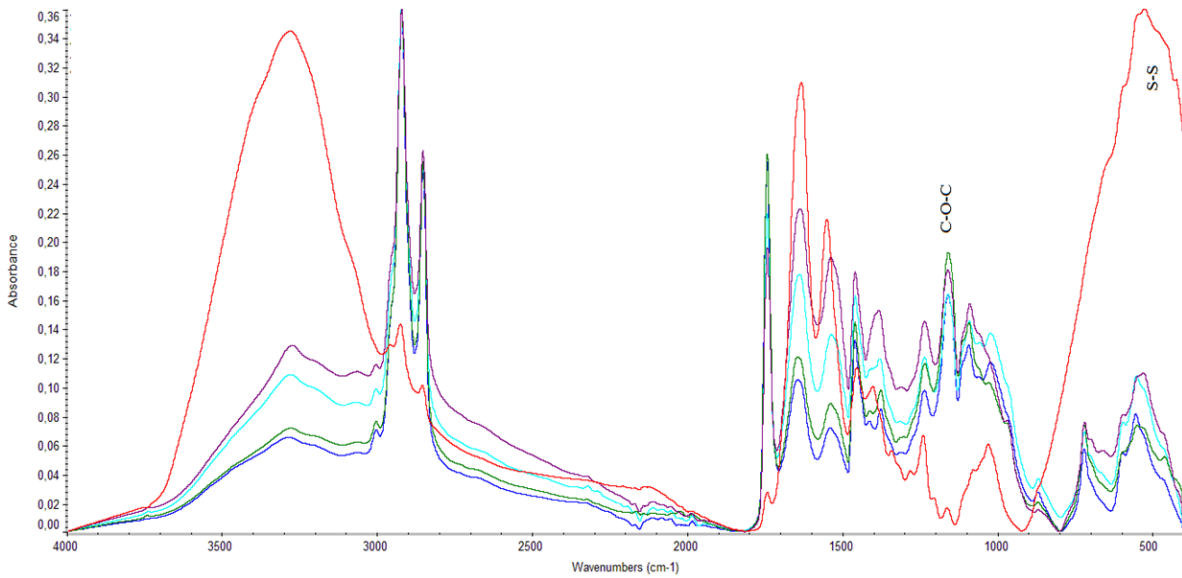


**Σχήμα 6. 8** FT-IR φάσματα φλοιώδους, σπογγώδους οστού και του φάσματος μετά την αφαίρεσή τους στην περιοχή  $1200-800\text{ cm}^{-1}$ .

Παρατηρείται ότι μετά την αφαίρεση των ταινιών του υδροξυαπατίτη φαίνονται οι ταινίες των φωσφολιπιδίων και του DNA, συστατικά τα οποία επικρατούν στο σπογγώδες οστό. Από την επεξεργασία των φασμάτων διαφαίνεται ότι είναι δυνατόν να λάβουμε πολύ περισσότερες πληροφορίες για την μοριακή διαμόρφωση του οστίτη ιστού και πώς επηρεάζεται από την ασθένεια.

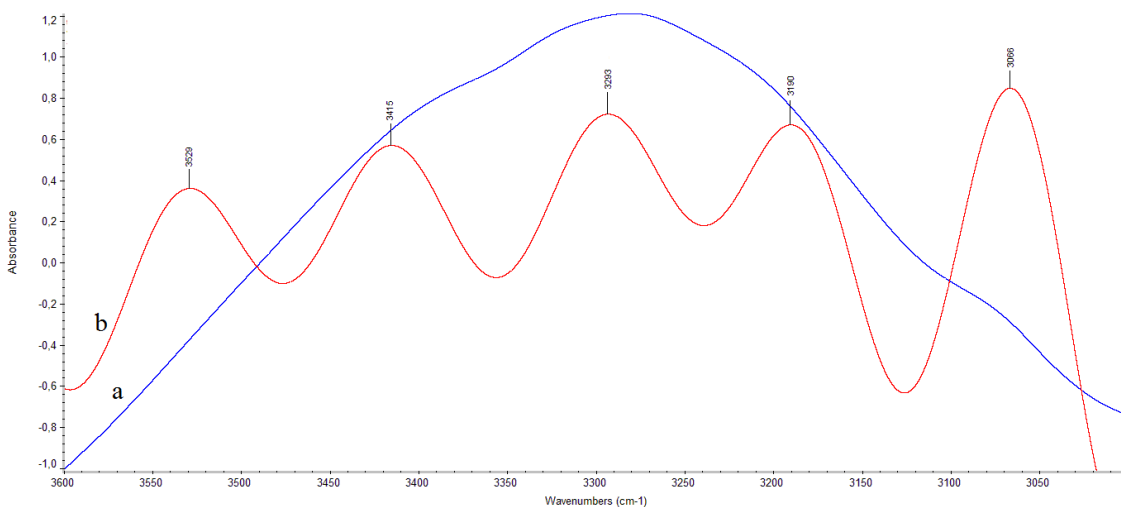
### 6.1.2 FT-IR φάσματα χόνδρου ασθενών με δυσπλασία

Στο Σχήμα 6.9 δίνονται τα υπέρυθρα φάσματα χόνδρων από ασθενείς με δυσπλαστικό οστό.



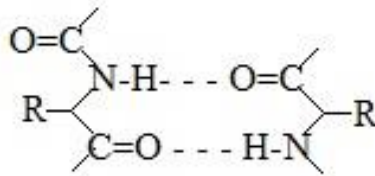
**Σχήμα 6. 9** FT-IR φάσματα χόνδρων που λήφθηκαν από ασθενείς με δυσπλασία οστών στην περιοχή  $4000-400\text{ cm}^{-1}$ .

Από τα φάσματα φαίνεται ότι το οξειδωτικό στρες προκάλεσε σημαντικές βλάβες στον χόνδρο. Η αύξηση των εντάσεων στην περιοχή του φάσματος μεταξύ  $4000-3000\text{ cm}^{-1}$  συνδέεται με αύξηση των δονήσεων τάσης των ελεύθερων ομάδων νNH των πρωτεϊνών και πρωτεογλυκανών. Μαθηματική ανάλυση (deconvolution) της περιοχής του φάσματος  $3600-3000$  όπου εμφανίζονται οι δονήσεις τάσης των ομάδων νOH και νNH δείχνει ότι η πλατειά ταινία δεν είναι απλή (Σχήμα 6.10).



**Σχήμα 6. 10** FT-IR φάσμα (a) χόνδρου οστών με δυσπλασία και (b) deconvolution στην περιοχή  $3600-3000\text{ cm}^{-1}$ .

Οι ταινίες στα  $3529\text{ cm}^{-1}$  και  $3415\text{ cm}^{-1}$  αντιστοιχούν στις δονήσεις των ελεύθερων δονήσεων τάσης των ομάδων  $\nu\text{OH}$  και  $\nu\text{NH}$ , αντίστοιχα. Η αύξηση των ταινιών με την επίδραση της ασθένειας δείχνει ότι υπάρχει σημαντική σχάση των γλυκοζαμινών και πρωτεϊνών, επιβεβαιώνοντας την αύξηση του οξειδωτικού στρες. Η ταινία στους  $3292\text{ cm}^{-1}$  αποδίδεται στις δονήσεις τάσης των ομάδων  $\nu\text{NH}$  των πρωτεϊνών και επιβεβαιώνουν ότι η διαμόρφωση των πρωτεϊνών έχει μορφή Amide A (Anastassopoulou et al. 2008, 2011, 2015, Mavrogenis et al. 2015, 2016, Μαυρογένης 2016).



**Σχήμα 6. II** Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των ομάδων  $\text{NH}$  και  $\text{C}=\text{O}$  των πεπτιδικών δεσμών.

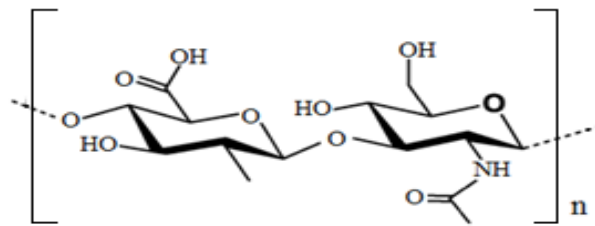
Από την ανάλυση του φάσματος συμπεραίνεται ότι η ασθένεια επηρεάζει σημαντικά τους δεσμούς υδρογόνου οι οποίοι συγκρατούν τόσο τις αλυσίδες των πρωτεϊνών για να σχηματίσουν την τριπλή έλικα, όσο και τους δεσμούς που συνδέουν τις πρωτεογλυκάνες μεταξύ τους και με τις πρωτεΐνες, κυρίως το κολλαγόνο. Στην σχάση των δεσμών αυτών αποδίδουμε την παρατηρούμενη κλινική εικόνα φθοράς του χόνδρου και κατά συνέπεια των οστών του ασθενούς, λόγω μηχανικής τριβής. Τα προϊόντα σχάσης οδηγούν σε αντιδράσεις πολυμερισμού ή συμπολυμερισμού των θραυσμάτων. Τα προϊόντα αυτά δεν δύναται να επιδιορθωθούν από το αμυντικό σύστημα του οργανισμού, αλλά ούτε και φαρμακευτικά, προκαλώντας μόνιμες βλάβες.

Οι ταινίες στην περιοχή του φάσματος μεταξύ  $3000\text{ cm}^{-1}$  μέχρι  $2870\text{ cm}^{-1}$  προέρχονται από τις συμμετρικές και αντισυμμετρικές δονήσεις τάσης των μεθυλ ( $\nu_{as}, \text{CH}_3$ ,  $\nu_s, \text{CH}_3$ ) και μεθυλενομάδων ( $\nu_{as}, \text{CH}_2$ ,  $\nu_s, \text{CH}_2$ ) των λιπιδίων, πρωτεϊνών και γλυκοζιτών. Η ένταση και η θέση των δονήσεων απορροφήσεων των χαρακτηριστικών αυτών ομάδων μας παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την κατάσταση των μεμβρανών των κυττάρων και της λιποφιλικότητας του περιβάλλοντος μέσου. (Anastassopoulou et al. 2012)

Διαπιστώθηκε ότι η ασθένεια οδηγεί στην αύξηση της λιποφιλικότητας του περιβάλλοντος. Διαπιστώθηκε ότι η αύξηση αυτή συνδέεται με αύξηση του σχηματισμού ινιδίων. Η ίνωση παρατηρήθηκε ότι είναι μια μη αντιστρεπτή βλάβη και συνδέεται με διαταραχή της συγκέντρωσης του νερού στους χόνδρους, γεγονός που πολλές φορές εκδηλώνεται ως φλεγμονή.

Σημαντική είναι επίσης η αύξηση της ταινίας στα  $1743\text{ cm}^{-1}$ , η οποία επιβεβαιώνει την υπεροξείδωση των μεμβρανών και σχηματισμό αλδευδών. Επίσης οι ταινίες οι οποίες αντιστοιχούν στις δονήσεις τάσης των Amide I και Amide II μετατοπίζονται από τα  $1650\text{ cm}^{-1}$  και  $1550\text{ cm}^{-1}$  προς μικρότερους κυματαριθμούς και εμφανίζονται στα  $1638\text{ cm}^{-1}$  και  $1540\text{ cm}^{-1}$ , αντίστοιχα.

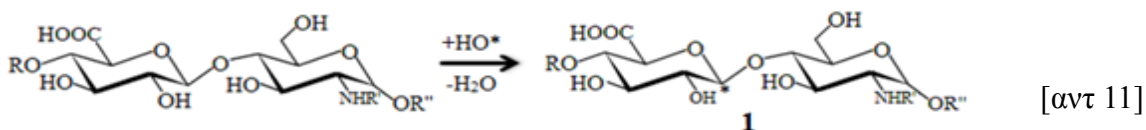
Αξίζει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση του χόνδρου εμφανίζεται μία νέα ταινία στα  $1165\text{ cm}^{-1}$ . Η ταινία αυτή αποδίδεται στις απορροφήσεις των ομάδων C-O-C των σακχάρων των γλυκοζιτών των χόνδρων. Στο Σχήμα 6.12 δίνεται το μονομερές ενός δισακχαρίτη ο οποίος σχηματίζει τον σκελετό (πολυμερές) των γλυκοζαμινογλυκανών του αρθρικού χόνδρου.



**Σχήμα 6. 12** Χημικός τύπος των μονομερών δισακχαριτών τα οποία αποτελούν τον σκελετό των γλυκοζαμινογλυκανών του αρθρικού χόνδρου.

Γενικά, οι δονήσεις απορρόφησης της ομάδας -C-O-C- των γλυκοζαμινογλυκανών εμφανίζεται μεταξύ  $1150-1165\text{ cm}^{-1}$ , ο εξωκυκλικός δεσμός (γέφυρα οξυγόνου) της ομάδας -C-O-C- παρέχει δόνηση στα  $1079\text{ cm}^{-1}$  και ο δεσμός C-OH στα  $1040\text{ cm}^{-1}$ . Στα φάσματα των χόνδρων προερχόμενων από ασθενείς με δυσπλασία οστών η περιοχή του φάσματος είναι περισσότερο σύνθετη επειδή παράγονται θραύσματα των γλυκοζαμινογλυκανών, αλλά και διαφορετικών φωσφορικών αλάτων από την σχάση του υδροξυαπατίτη.

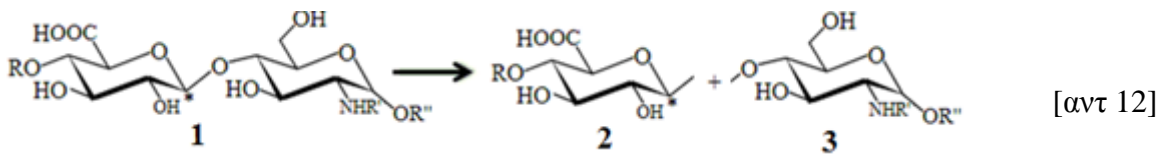
Η σχάση των αλυσίδων των γλυκοζαμινογλυκανών έχει διαπιστωθεί τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* με βήματα όπως φαίνονται στην αντίδραση [αντ 11]:



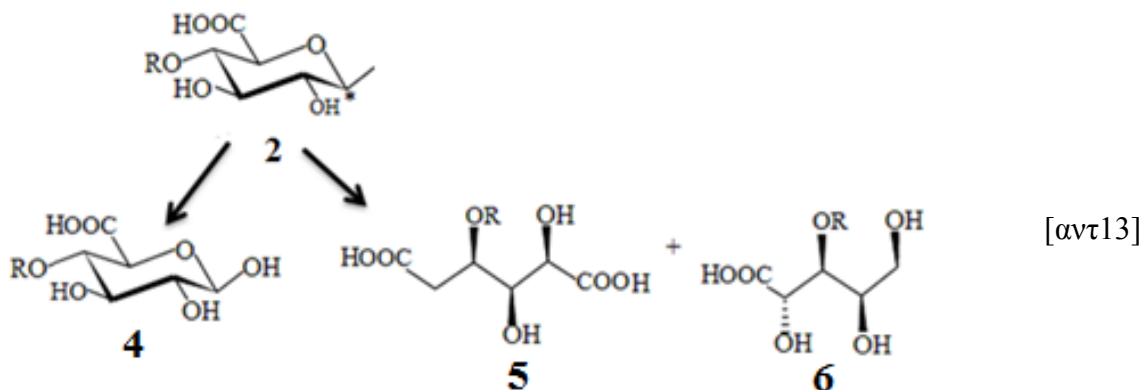
(Όπου R και R'' τα υπόλοιπα τμήματα του πολυμερούς και R' = OCH<sub>3</sub>)

Όπως φαίνεται οι ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου αποσπών άτομα υδρογόνου από του; δακτυλίους των σακχάρων παρέχοντας ελεύθερες ρίζες των γλυκοζαμινογλυκανών

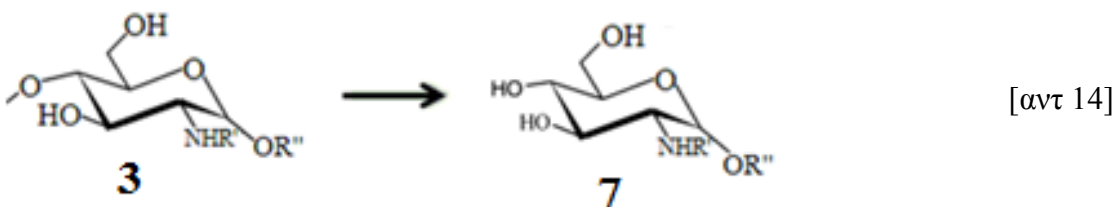
Η παραγόμενη ελεύθερη ρίζα 1 του πολυσακχαρίτη δεν είναι σταθερή και συνήθως διασπάται προς δύο άλλες ελεύθερες ρίζες 2 και 3, όπως φαίνεται στην αντίδραση [αντ 12].



Στη συνέχεια, για την χημική συμπεριφορά της ελεύθερης ρίζας 2 διαπιστώθηκαν δύο παράλληλοι δρόμοι: α) Η ελεύθερη ρίζα 2 προσλαμβάνει ένα άτομο υδρογόνου και μία υδροξυλομάδα από διπλανές θέσεις ή από άλλον πολυσακχαρίτη και δίνει σταθερό προϊόν 4 και β) επειδή οι ελεύθερες ρίζες δεν είναι σταθερές, θα διασπασθεί προς άλλα σταθερά προϊόντα, στα οποία όμως θα έχουν υποστεί σχάση οι κυκλικές ομάδες των πολυγλυκοζιτών σύμφωνα με τις αντιδράσεις [αντ 13]:



Τέλος, η ελεύθερη ρίζα 2 μπορεί να οδηγηθεί προς σταθερό προϊόν με πρόσληψη ενός ατόμου υδρογόνου (αντίδραση 14).



Με την απόσπαση των ατόμων υδρογόνου από διάφορες θέσεις της αλυσίδας των γλυκοζαμινών του χόνδρου σχηματίζονται νέες ελεύθερες ρίζες των γλυκοζαμινογλυκανών οι οποίες όμως δεν είναι σταθερές. Από την χημεία των ελευθέρων ριζών είναι γνωστό ότι οι ελεύθερες ρίζες είτε παρέχουν αντιδράσεις ρίζα-ρίζα και πολυμερίζονται είτε διασπώνται προς μικρότερα σταθερά μόρια.

Στην περιοχή του φάσματος  $1200-800\text{ cm}^{-1}$  όπου εμφανίζονται οι δονήσεις τάσης

των φωσφορικών ομάδων του υδροξυαπατίτη παρατηρείται μείωση έως εξαφάνιση των απορροφήσεων των δονήσεων τάσης  $\nu\text{PO}_4^{3-}$ . Αυτό είναι αναμενόμενο δεδομένου ότι οι χόνδροι περιέχουν μικρότερη ποσότητα οστού και είναι περισσότερο πλούσιοι σε γλυκοζαμινογλυκάνες. Για τον λόγο αυτό παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η μελέτη της περιοχής  $600\text{-}400\text{ cm}^{-1}$  του υπερύθρου φάσματος των χόνδρων, δεδομένου ότι δεν υπάρχουν επικαλύψεις των απορροφήσεων χαρακτηριστικών δονήσεων. Όπως φαίνεται από το Σχήμα 6.9 εμφανίζονται νέες ταινίες στις συχνότητες περίπου  $710\text{ cm}^{-1}$  και  $575\text{ cm}^{-1}$  οι οποίες αποδίδονται στις δονήσεις τάσης των ομάδων C-S θειολών και στη συχνότητα  $520\text{ cm}^{-1}$ , η οποία αντιστοιχεί στη δόνηση τάσης των διθειολών (S-S). Παρατηρείται ότι η αύξηση της δόνησης των απορροφήσεων των ομάδων S-S σε μερικούς ασθενείς είναι αρκετά μεγάλη. Η αύξηση της έντασης της ταινίας απορρόφησης των διθειολικών δεσμών δείχνει ότι οι ενδογενείς φυσικές προστατευτικές ενώσεις, όπως είναι η γλουταθειόλη καταναλώνονται για την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες (Μαμαρέλης)

### 6.1.3 SEM ανάλυση δυσπλαστικών οστών

Στην περαιτέρω μελέτη έγινε ανάλυση των οστών με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM). Στην Εικόνα 6.2 δίνεται η μορφολογία δυσπλαστικού οστού ασθενούς. Από την Εικόνα 6.2 φαίνεται καθαρά η καταστροφή τόσο της ανόργανης φάσης όσο ιδιαίτερα των δευτεροταγών δομών των πρωτεϊνών. Φαίνεται ότι η διαμόρφωση της α-έλικας έχει καταστραφεί εντελώς, ενώ οι πρωτεΐνες σχηματίζουν συσσωματώματα. Το βέλος τονίζει την παρουσία των θέσεων διακλαδούμενου πολυμερισμού των πρωτεϊνών.

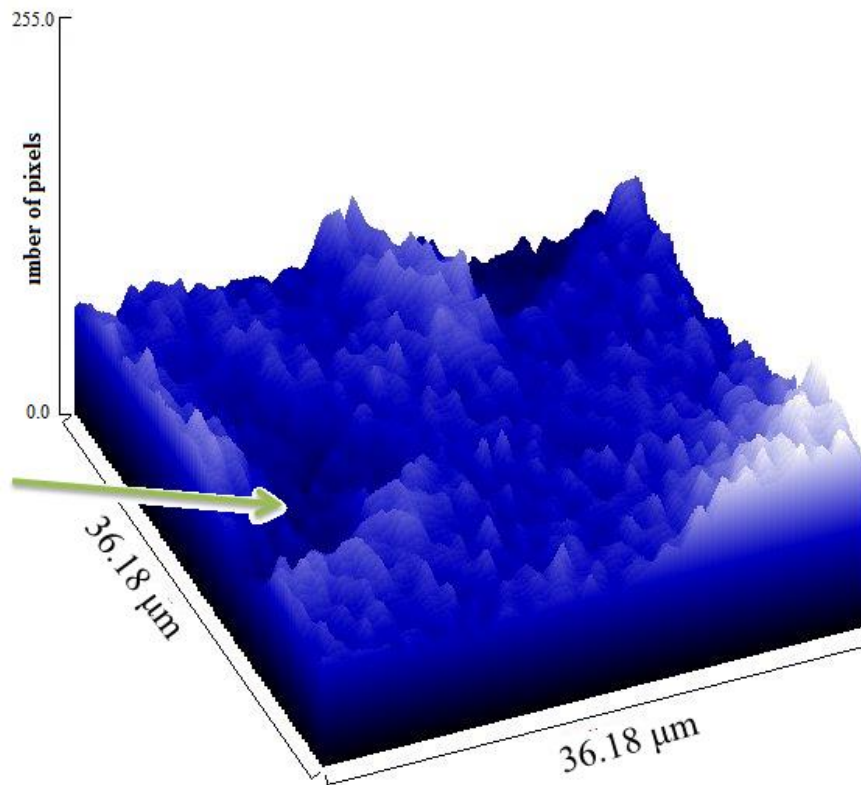




**Εικόνα 6. 2** SEM μορφολογική απεικόνιση της αρχιτεκτονικής της επιφάνειας δυσπλαστικού οστού. Φαίνεται η καταστροφή της α-έλικας σε τυχαία περιέλιξη και ο σχηματισμός συσσωματωμάτων. Το βέλος δείχνει την θέση διακλαδούμενου πολυμερισμού. Κλίμακα 300 μm.

Αντίστοιχη μορφολογία παρατηρήθηκε σε όλα τα δείγματα των ασθενών με δυσπλασία. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τα ευρήματα που λήφθηκαν από τα FT-IR φάσματα.

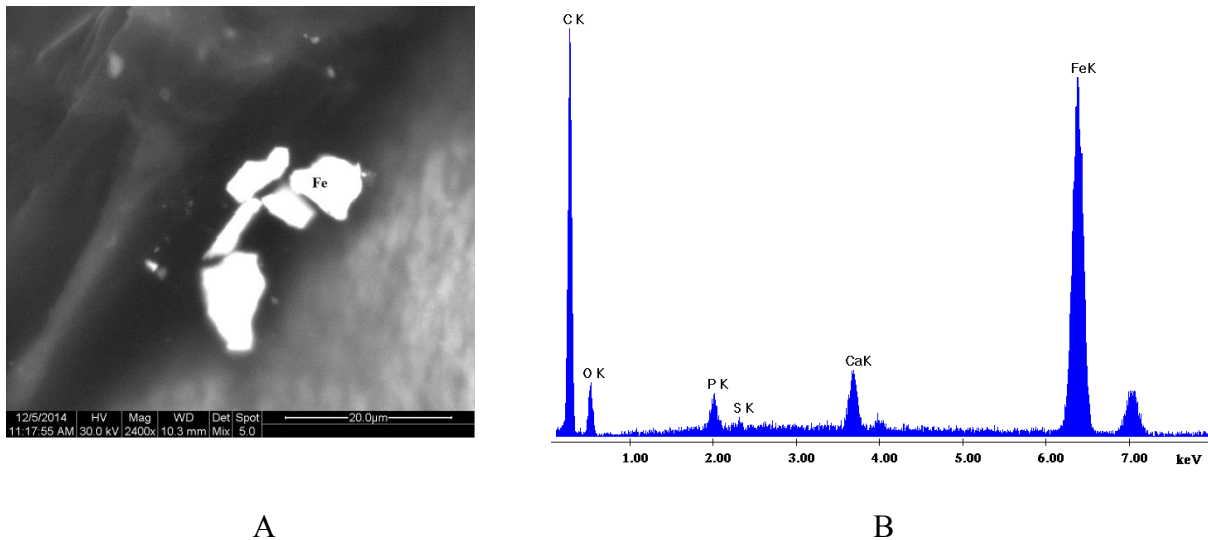
Η ImageJ ανάλυση στην θέση του διακλαδούμενου δεσμού δείχνει την μείωση του υδροξυαπατίτη στο οστό και την αύξηση της οργανικής φάσης.



**Εικόνα 6. 3** ImageJ ανάλυση στην θέση του διακλαδούμενου δεσμού. Το βέλος δείχνει την θέση διακλαδούμενου δεσμού της Εικόνας 6.2.

Η λευκή περιοχή της ανάλυσης αντιστοιχεί σε αυξημένη αγωγιμότητα η οποία προφανώς οφείλεται στην παρουσία των ανθρακικών αλάτων, όπως φαίνεται και από τα υπέρυθρα φάσματα. Το βέλος δείχνει την θέση του διασταυρωμένου δεσμού, που είναι αυξημένο σε οργανική μάζα. Η έλλειψη αγώγιμων μορίων επιβεβαιώνει την καταστροφή των πρωτεϊνών η οποία συνεπάγεται και την βεβαιωμένη καταστροφή των δεσμών υδρογόνου που συγκρατούν την έλικα. Οι θέσεις σχάσης των δεσμών ευνοούν τους πολυμερισμούς των οργανικών θραυσμάτων.

Η EDX ανάλυση έδειξε ότι στα δείγματα ορισμένων ασθενών υπήρχε αυξημένη συγκέντρωση σιδήρου και χαλκού (Εικόνα 6.4).

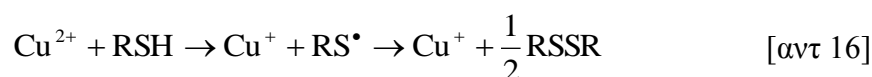


**Εικόνα 6. 4 A:** SEM μορφολογία οστού με δυσπλασία. Η λευκή επιφάνεια είναι συσσώρευση σιδήρου. **B:** EDX ανάλυση της λευκής επιφάνειας

Αν και σε μερικούς ασθενείς η ανίχνευση σιδήρου, χαλκού και χρωμίου συνδέονται με μετανάστευση των ιόντων από άλλη θέση εμφύτευσης βιοϋλικού, όμως ως μεταβατικά μέταλλα μπορούν να αντιδράσουν με τα βιολογικά μόρια άμεσα ή έμμεσα. Η παρουσία τους, δεδομένου ότι είναι μεταβατικά μέταλλα (ο χαλκός συμπεριφέρεται ως μεταβατικό μέταλλο) δείχνει ότι είναι δυνατή η έναρξη αντιδράσεων Fenton και Haber-Weiss αντίστοιχα κάτω από το έντονο οξειδωτικό στρες το οποίο μεταβάλλει το οξειδωτικό δυναμικό των μετάλλων. Μάλιστα είναι αποδεκτό ότι η αντίδραση της λιπιδικής υπεροξείδωσης ξεκινά είτε με μεταφορά ηλεκτρονίων και αναγωγή των μεταλλικών ιόντων μεταβατικών μετάλλων και χαλκού:

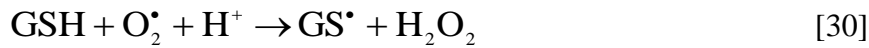


είτε με άμεση αναγωγή των μεταλλικών ιόντων από ενδογενείς αναγωγικούς παράγοντες. Για παράδειγμα, τα ιόντα χαλκού αντιδρούν άμεσα με τις θειόλες προς τελικά προϊόντα δισουλφιδίων (-S-S-).

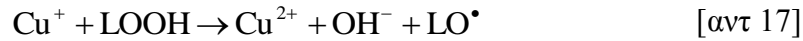


Η αντίδραση [αντ 16] ερμηνεύει επαρκώς την εμφάνιση της απορρόφησης δόνησης των δισουλφονικών δεσμών στην περιοχή του φάσματος  $600\text{-}500 \text{ cm}^{-1}$ .

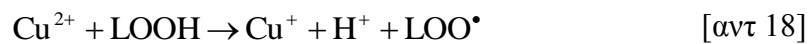
Η esr φασματοσκοπία (Jones et al 2002) έδειξε ότι οι υπερόξυ ελεύθερες ρίζες και οι ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου είναι οι κυριότερες ελεύθερες ρίζες που αντιδρούν με τις γλουταθειόλες GSH και παράγουν δισουλφίδια (GS-SG).



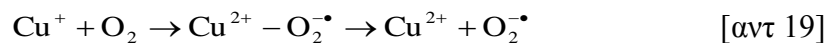
Τα ιόντα μονοσθενούς χαλκού ( $\text{Cu}^+$ ) είναι ισχυρά προοξειδωτικά (prooxidants), που πιθανόν να αντιδρούν με λιπαρά οξέα παράγοντας τις αντίστοιχες ελεύθερες ρίζες των λιπιδίων ( $\text{LO}^\bullet$ ) σύμφωνα με την αντίδραση [αντ 17]:



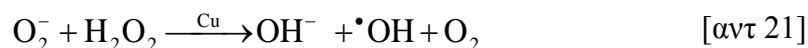
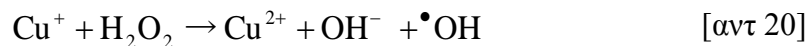
Τα παραγόμενα δισθενή ιόντα μπορούν με τη σειρά τους να σχηματίσουν ελεύθερες ρίζες υπεροξειδίων των λιπιδίων:



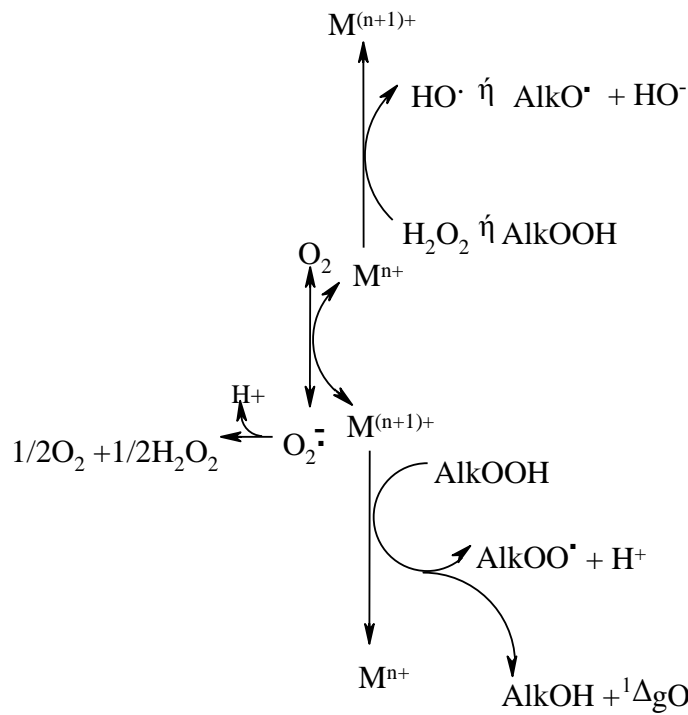
Τα μονοσθενή ιόντα χαλκού μπορούν να οξειδωθούν προς δισθενή χαλκό και ελεύθερες ρίζες οξυγόνου. Η αντίδραση γίνεται σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο σχηματίζεται το ενδιάμεσο σύμπλοκο (transition complex)  $\text{Cu}-\text{O}$ . Η μορφή αυτή του οξειδίου δεν είναι σταθερή και διασπάται ταχύτατα προς το ανιόν της υπερόξυ ελεύθερης ρίζας του οξυγόνου. Στην αντίδραση [αντ 19] φαίνονται τα δύο στάδια.



Όπως προκύπτει από τα πειράματά μας το οξειδωτικό στρες φαίνεται ότι τελικά δημιουργεί βλάβες σε μοριακό επίπεδο που ενδέχεται να προκαλέσουν διακοπή βιολογικών λειτουργιών και ο οργανισμός να οδηγηθεί σε κυτταρικές βλάβες μέχρι και τον θάνατο. Εξ άλλου, σε αναγωγικές συνθήκες ο χαλκός είναι δυνατόν να αναχθεί από  $\text{Cu(II)}$  σε  $\text{Cu(I)}$  οπότε γίνεται πιο τοξικός, επειδή διατηρεί την παραγωγή ελευθέρων ριζών υδροξυλίου ( $\text{HO}^\bullet$ ) σύμφωνα με αντιδράσεις τύπου Haber-Weiss (Theophanides & Anastassopoulou 2002, 2006):

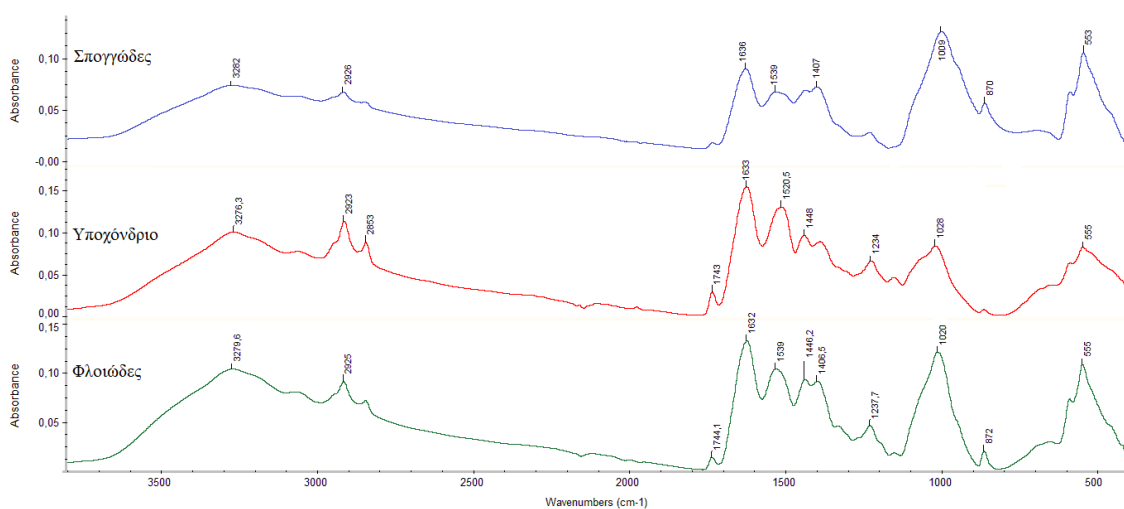


Γενικά, οι αντιδράσεις παραγωγής υπεροξειδίων από τα μεταβατικά μέταλλα, μπορούν να αποδοθούν όπως φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα 6. 13:



**Σχήμα 6. 13** Σχηματική παράσταση των αλυσιδωτών αντιδράσεων οξειδοαναγωγής που λαμβάνουν χώρα στον οργανισμό παρουσία μεταλλικών ιόντων

Για να δούμε πώς συμπεριφέρεται η ασθένεια στα οστά λάβαμε τα υπέρυθρα φάσματα του φλοιώδους, σπογγώδους και υποχόνδριου οστού (Σχήμα 6.14). Συγκρίνοντας τα φάσματα παρατηρούνται διαφορές μεταξύ τους οι οποίες εντοπίζονται σε όλη την έκταση από  $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ .

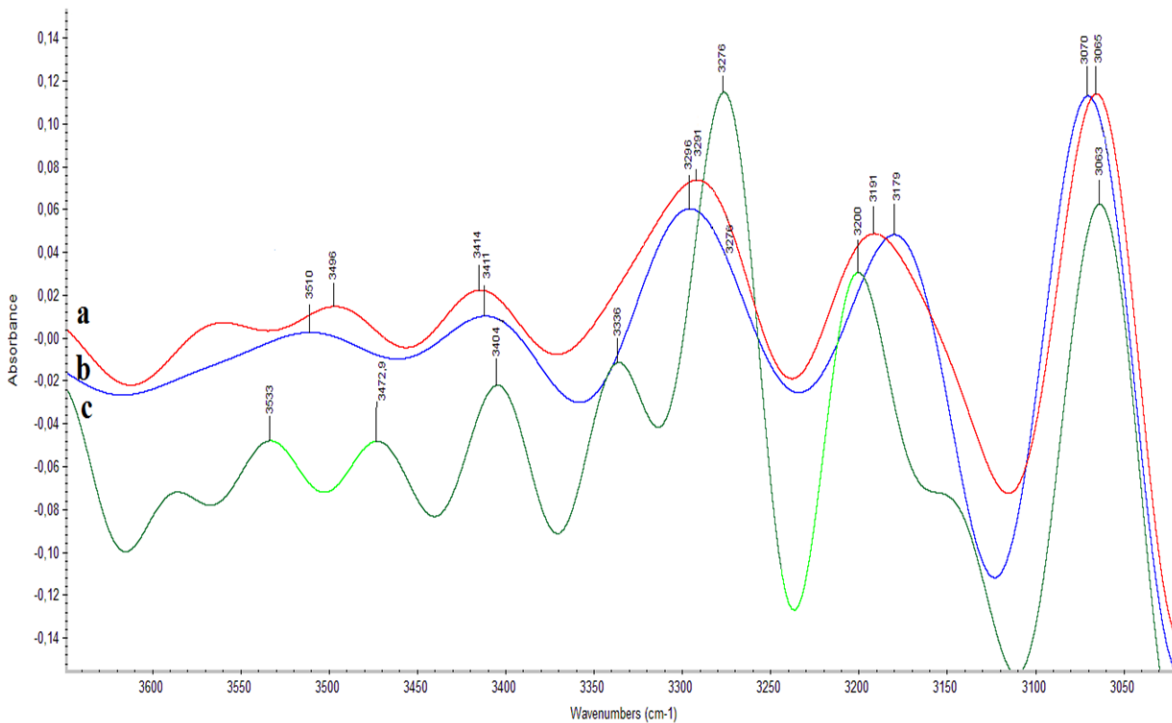


**Σχήμα 6. 14** FT-IR φάσματα σπογγώδους, υποχόνδριου και φλοιώδους οστού ασθενούς με δυσπλασία στην περιοχή  $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ .

Διαπιστώνεται ότι οι ταινίες απορροφήσεων των χαρακτηριστικών ομάδων των οστών μετατοπίζονται προς μικρότερους κυματαριθμούς δηλώνοντας την διαφορετική

διαμόρφωση των μορίων του οστού. Πέραν αυτών, σημαντικές είναι οι διαφορές μεταξύ των συχνοτήτων όπου απορροφούν οι δονήσεις τάσης των φωσφορικών ομάδων ( $\nu\text{PO}_4^{3-}$ ) του υδροξυαπατίτη. Από τις διαφορές αυτές φαίνεται ότι στα δυσπλαστικά οστά ο υδροξυαπατίτης δεν έχει την ίδια σύσταση στην έκταση του οστού.

Από τις μετατοπίσεις των ταινιών απορρόφησης στην περιοχή  $4000\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$  φαίνεται ότι  $\text{cm}^{-1}$  οι δεσμοί υδρογόνου που συγκρατούν τις έλικες έχουν διαφοροποιηθεί.



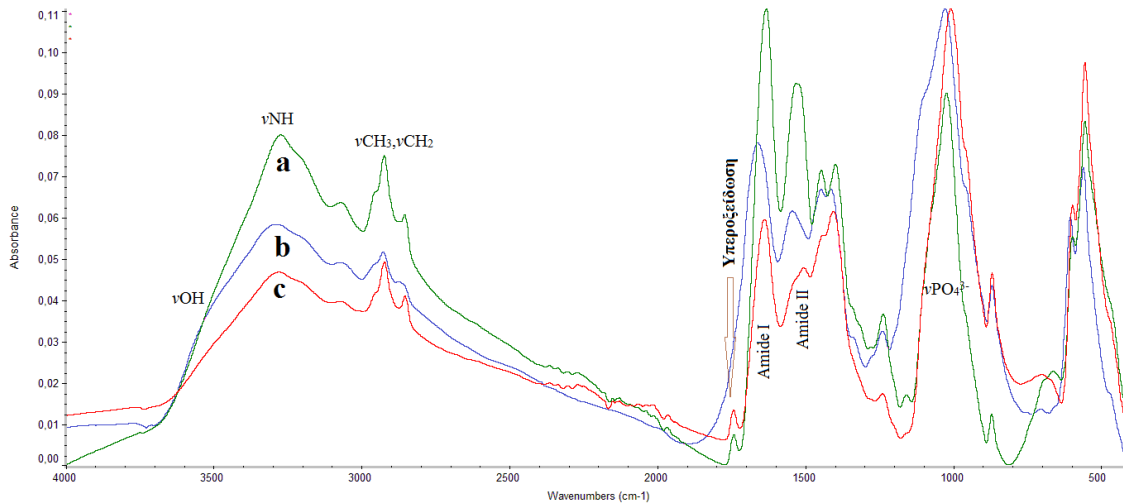
**Σχήμα 6. 15** Deconvolution των FT-IR φασμάτων σπογγώδους, υποχόνδριου και φλοιώδους οστού ασθενούς με δυσπλασία στην περιοχή  $3600\text{-}300\text{ cm}^{-1}$ .

Η παρατήρηση αυτή συνδέεται και με τις μετατοπίσεις στην περιοχή του φάσματος  $1800\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$  όπου απορροφούν οι ομάδες των Amide I και Amide II, από τις οποίες συμπεραίνεται ότι η διαμόρφωση των πρωτεϊνών έλαβε τυχαία διαμόρφωση.

Επίσης, από την σύγκριση των υπέρυθρων φασμάτων του φλοιώδους, σπογγώδους και υποχόνδριου φαίνεται ότι αν και η οργανική φάση στο φλοιώδες οστό είναι μικρότερη των άλλων, όμως οι βλάβες είναι περισσότερες. Φαίνεται δηλαδή ότι στην περίπτωση της δυσπλασίας οι βλάβες αρχίζουν από την εξωτερική επιφάνεια του οστού. Πιθανόν αυτό να οφείλεται στην αυξημένη τριβή η οποία ασκείται στα δυσπλαστικά οστά.

## 6.2. FT-IR ΦΑΣΜΑΤΑ ΟΣΤΩΝ ΑΣΘΕΝΟΥΣ ΜΕ ΑΓΚΥΛΟΠΟΙΗΤΙΚΗ ΣΠΟΝΔΥΛΙΤΙΔΑ

Στο Σχήμα 6.16 συγκρίνονται τα υπέρυθρα φάσματα σπογγώδους και φλοιώδους οστού από ασθενή με αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα δεξιού ισχίου με το αντίστοιχο φάσμα υγιούς οστού.



**Σχήμα 6. 16** FT-IR φάσματα οστών ασθενούς με αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα δεξιού ισχίου. *a*; σπογγώδες, *b*; υγιές και *c*; Φλοιώδες οστό.

Παρατηρείται, όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις, ότι η ασθένεια επηρεάζει τόσο την οργανική όσο και την ανόργανη φάση του οστού. Η υπεροξείδωση των μεμβρανών, όπως φαίνεται από την ένταση της ταινίας στα  $1743\text{ cm}^{-1}$ , είναι μικρότερη από ότι στην ρευματοειδή αρθρίτιδα ή στην δυσμορφία. Οι μετατοπίσεις των εντάσεων απορρόφησης των δονήσεων των φωσφορικών ομάδων του υδροξυαπατίτη προς μικρότερους κυματαυθμούς δείχνει επίσης ότι η βλάβη μετατρέπει την δομή του βιολογικού υδροξυαπατίτη προς κρυσταλλική και άμορφη.

Από την μέτρηση των εντάσεων των [Amide I]:[Amide II] διαπιστώνεται ότι ο λόγος αυξάνει στο φάσμα του φλοιώδους οστού τόσο ως προς το υγιές όσο και ως προς το σπογγώδες. Φαίνεται δηλαδή ότι η β-διαμόρφωση του κολλαγόνου είναι πιο ευαίσθητη στην ασθένεια.

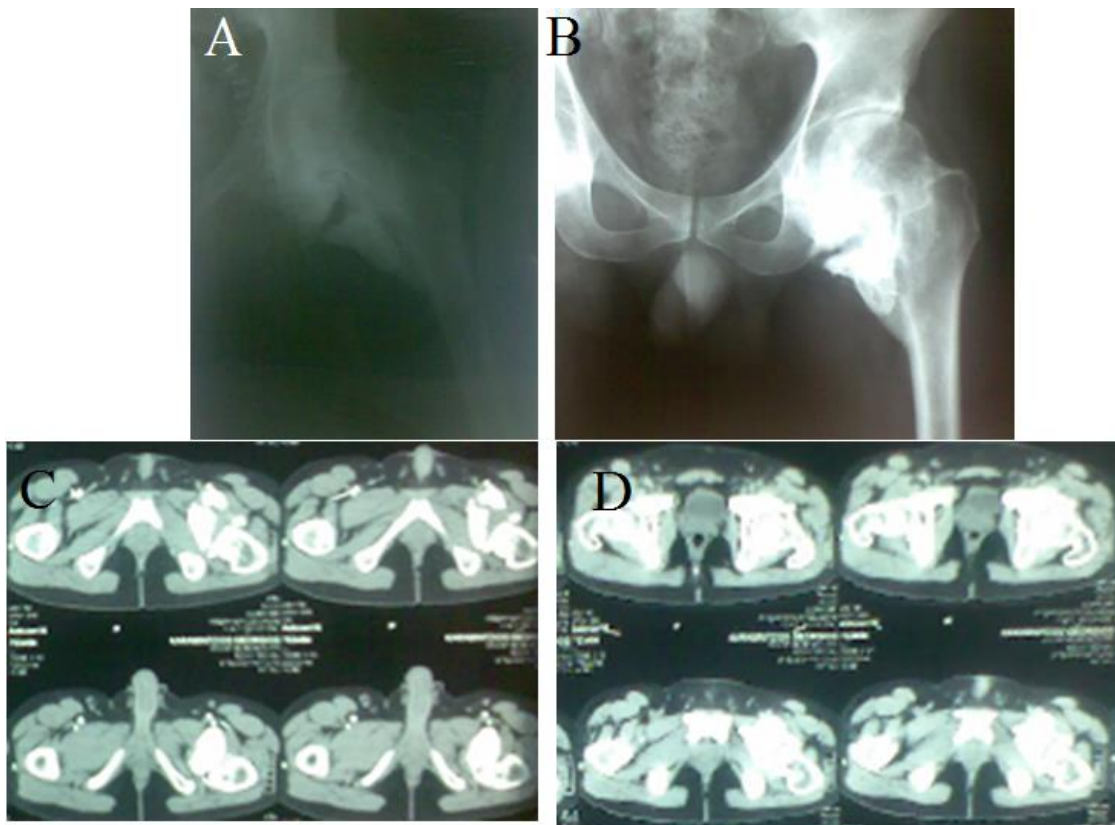
Συγκρίνοντας τα υπέρυθρα φάσματα των οστών ασθενών με δυσπλασία και αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα διαπιστώθηκε ότι τα δυσπλαστικά οστά εμφανίζουν μεγαλύτερη βλάβη στο φλοιώδες τμήμα του οστού, όπως προκύπτει από την εμφάνιση των



ταινιών των δισουλφονικών ομάδων. Αντίθετα στην αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα διαπιστώθηκε ότι στον υδροξυαπατίτη έχουμε μεγαλύτερη αντικατάσταση των φωσφορικών ιόντων από ανθρακικά ιόντα. Η αντικατάσταση αυτή δείχνει την ταχύτερη γήρανση του οστού (Πετρά 2002, Petra et al 2000, 2005).

### 6.3 FT-IR ΦΑΣΜΑΤΑ ΟΣΤΕΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΜΑΛΑΚΩΝ ΙΣΤΩΝ

Όπως προαναφέρθηκε η έκτοπη οστεοποίηση εμφανίζεται στους μαλακούς ιστούς και ουδόλως σχετίζεται με την ανάπτυξη οστών του σκελετού. Μέχρι σήμερα το αίτιο σχηματισμού οστού στα μαλακά μόρια δεν έχει διευκρινισθεί. Για τον λόγο αυτόν εμφανίζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η μελέτη του φαινομένου σε μοριακό επίπεδο. Στην Εικόνα 5.5 φαίνονται οι ακτινογραφίες ασθενούς 31 ετών ο οποίος εμφάνισε έκτοπη οστεοποίηση στο αριστερό ισχίο. Στην Εικόνα 6.5 φαίνονται οι θέσεις της έκτοπης οστεοποίησης του ασθενούς, όπως λήφθηκαν με ακτινογραφία και αξονική τομογραφία.

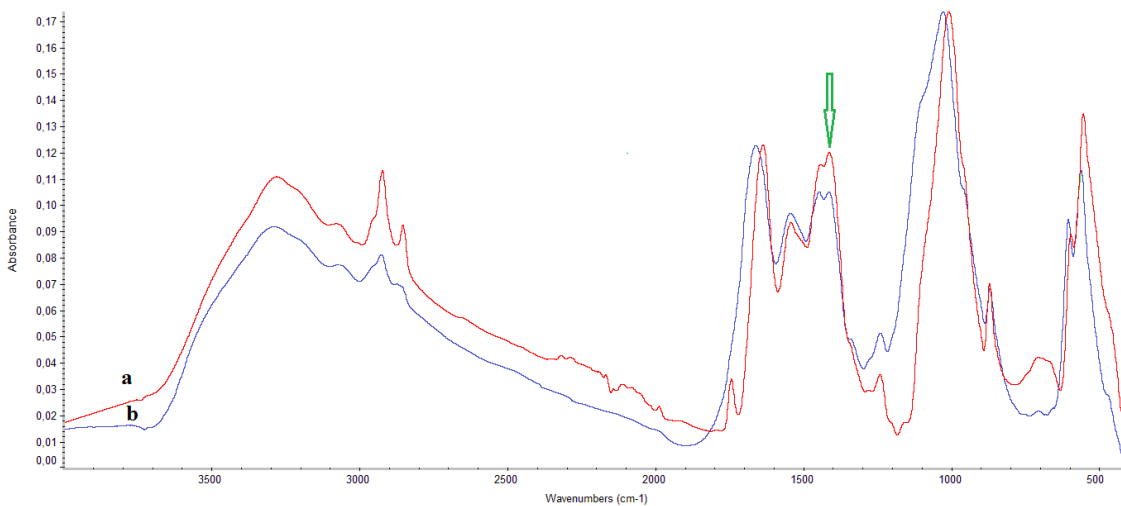


**Εικόνα 6. 5.** Ακτινογραφίες και αξονικές τομογραφίες αριστερού ισχίου ασθενούς 31 ετών, μετά από ρήξη ανευρύσματος της πρόσθιας αναστομωτικής αρτηρίας. A B C D



Τα ευρήματα αυτά είναι μακροσκοπικά και πέραν της θέσεως και του μεγέθους δεν παρέχουν καμία πληροφορία σχετικά με τις βλάβες σε μοριακό επίπεδο. Εφαρμόζοντας την υπέρυθη φασματοσκοπία με μετασχηματισμό Fourier αναμένουμε να διαπιστώσουμε μοριακές βλάβες.

Στο Σχήμα 6.17 και στον Πίνακα 6.1 δίνονται τα υπέρυθρα φάσματα του έκτοπου οστού το οποίο σχηματίστηκε στο αριστερό ισχίο ασθενούς 31 έτους και συγκρίνονται με τα αντίστοιχα υπέρυθρα φάσματα του υγιούς οστού.



**Σχήμα 6. 17** FT-IR φάσματα: *a*; έκτοπου οστού αριστερού ισχίου ασθενούς 31 έτους και *b*; υγιούς οστού στην περιοχή  $4000-400\text{ cm}^{-1}$ .

Από τη σύγκριση των φασμάτων διαπιστώνονται σημαντικές διαφορές σε όλη σχεδόν την έκταση του φάσματος από  $4000-400\text{ cm}^{-1}$ . Οι διαφορές στα φάσματα των έκτοπων οστών εντοπίζονται στην μείωση των ομάδων υδροξυλίου του υδροξυαπατίτη, στην μεταβολή των δεσμών υδρογόνου που σχηματίζουν οι NH ομάδες των πρωτεϊνών, στην μεταβολή της ευκινησίας των μεμβρανών και στην υπεροξειδωσή τους. Επίσης οι πρωτεΐνες αποκτούν δευτεροταγή δομή τυχαίας περιέλιξης, που όπως και στα δυσμορφικά οστά οφείλονται στο αναπτυσσόμενο οξειδωτικό στρες. Αξίζει όμως να σχολιασθεί ιδιαίτερα η περιοχή του φάσματος από  $1500-800\text{ cm}^{-1}$ . Στην περιοχή αυτή εμφανίζονται οι απορροφήσεις των δονήσεων τάσης των ανθρακικών ιόντων ( $\nu\text{CO}_3^{2-}$ ) και των φωσφορικών ιόντων του υδροξυαπατίτη ( $\nu\text{PO}_4^{3-}$ ). Από την αναστροφή των εντάσεων των ταινιών στα  $1460\text{ cm}^{-1}$  και  $1448\text{ cm}^{-1}$  συμπεραίνεται ότι κατά την σύνθεση του έκτοπου οστού ο οργανισμός παράγει περισσότερο ανθρακικό ασβέστιο.

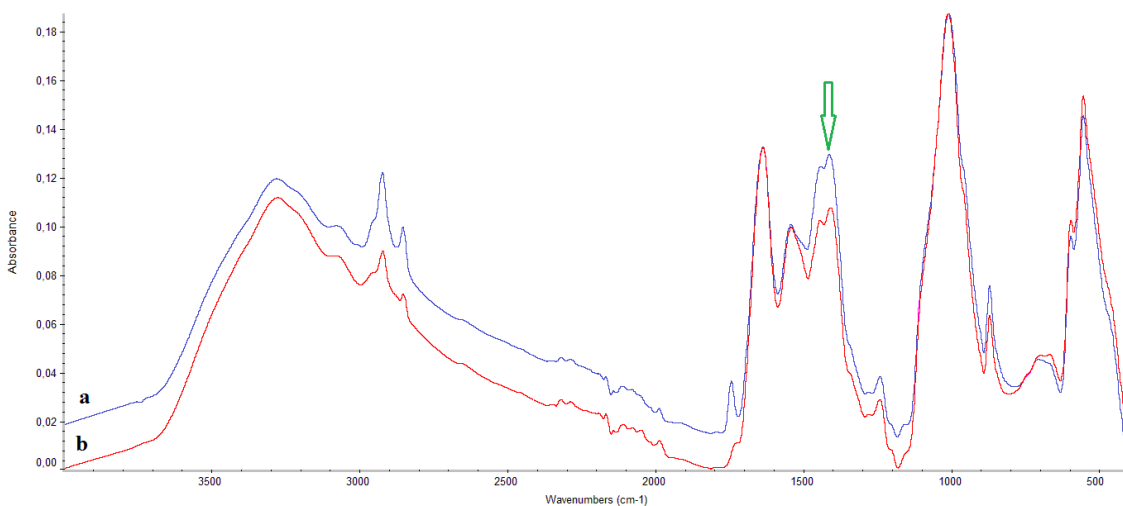
**Πίνακας 6.3** Χαρακτηριστικές ταινίες απορρόφησης υγιούς και έκτοπου οστού

υγιές ( $\text{cm}^{-1}$ )	Έκτοπο ( $\text{cm}^{-1}$ )	Χαρακτηρισμός
3286	3295	$\nu\text{N-H}$
3183	3187	$\text{Hb}\nu\text{N-H}$
	3078	$\nu(\text{=C-H})$ , ολεφινικό
	3010	$\nu\text{CH}$ αρωματικό
2960	2960	$\nu_{\text{as}}\text{CH}_3$ ,
2926	2924	$\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$
	2890	$\nu\text{CH}$ τεταρτοταγές
2875	2877	$\nu_{\text{sym}}\text{CH}_3$
2853	2853	$\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$
-	1744	Aldehydes, peroxidation product
	1735	$\nu\text{C=O}$ Χοληστερικών εστέρων
	1700	Esers $\nu\text{C=O}$ Hb, $\beta$ -sheet, antiparallel
	1686	$\beta$ -sheet, antiparallel
1657	1658	Amide I $\alpha$ -helix
	1631	Amide I, τυχαία περιέλιξη, $\beta$ -sheet //
	1597	Amide II $\beta$ -sheet //
1555	1543	Amide II, $\beta$ -turn, τυχαία περιέλιξη
1511	1513	$\beta$ -sheet //
1500	1499	$\text{C=N}$
1460	1460	$\nu_3\text{CO}_3^{2-}$ , $\delta_{\text{as}}\text{CH}_2$
1233		$\nu_{\text{as}}\text{PO}_2^-$ DNA, $\text{O-C(O)-C}$
1192	1192	$\nu_{\text{as}}\text{HPO}_4^{2-}$ , γλυκοζυλίωση
1163	1165	$\text{PO}_2^-$ φωσφολιπιδίων & DNA
1113	1113	Γλυκοζυλίωση
1083		$\nu_3\text{PO}_4^{3-}$
1022		$\nu_3\text{PO}_4^{3-}$
	1010	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , $\text{CaHPO}_4$
956		$\nu_1\text{PO}_4^{3-}$
919		HA
	893	$\text{HPO}_4^{2-}$
874	875	$\nu_4\text{CO}_3^{2-}$
	724	<i>o-o-p</i> - $\text{CH}_2$ of lipids
601	601	$\nu_4\text{PO}_4^{3-}$
	557	$\nu\text{C-S}$
	521	$\nu\text{S-S}$

Η διαδικασία αυτή απαιτεί χημικά μια διατήρηση στον ασθενή «οξέωσης», δηλαδή μείωση του pH του οργανισμού τουλάχιστον τοπικά στην θέση σχηματισμού και ανοξία. Οι συνθήκες αυτές έχουν παρατηρηθεί σε ασθενείς με μακροχρόνια κατάκλιση (Mavrogenis et al 2011). Τέλος οι μετατοπίσεις των ταινιών απορρόφησης των δονήσεων τάσης των φωσφορικών ομάδων δείχνουν ότι δεν πρόκειται για βιολογικό υδροξυαπατίτη.

Προκειμένου να απαντηθεί, αν είναι δυνατόν, το ερώτημα γιατί σε ασθενείς στην μονάδα εντατικής θεραπείας με κρανιοεγκεφαλικές κακώσεις και με κακώσεις του νωτιαίου μυελού μετά από πολυήμερη κατάκλιση παρατηρούνται έκτοπες οστεοποιήσεις σε απομακρυσμένες και άσχετες με το σημείο του τραυματισμού περιοχές, συγκρίθηκαν τα υπέρυθρα φάσματα από οστό έκτοπης οστεοποίησης με την πέτρα που σχηματίζει η αορτική βαλβίδα, δεδομένου ότι η επασβέστωσή της υπάγεται στις έκτοπες οστεοποιήσεις.

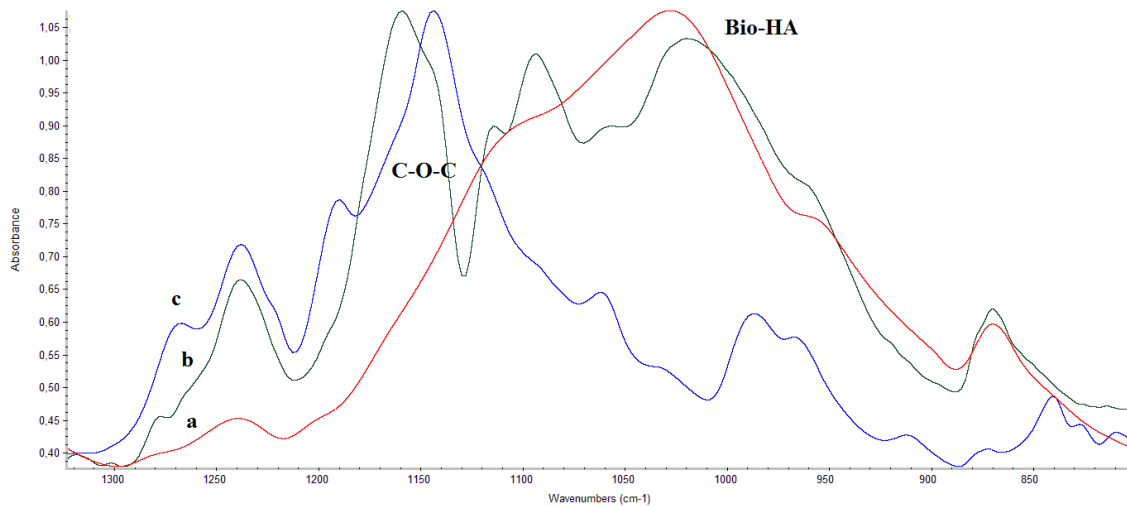
Στο Σχήμα 6.18 φαίνονται τα υπέρυθρα φάσματα έκτοπου οστού ισχίου ασθενούς (Σχήμα 6.18a) και πέτρας αορτικής βαλβίδας (Σχήμα 6.18b).



**Σχήμα 6. 18** FT-IR φάσματα: *a*; έκτοπου οστού αριστερού ισχίου ασθενούς 31 έτους και *b*; Επασβεστωμένης αορτικής βαλβίδας στην περιοχή  $4000-400\text{ cm}^{-1}$ .

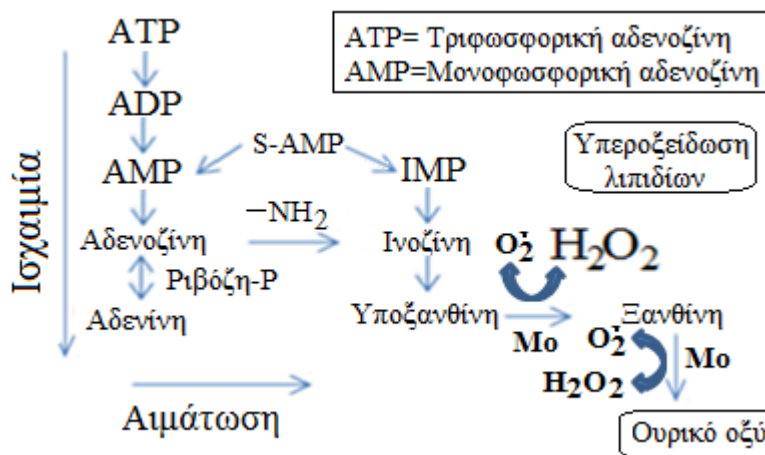
Παρατηρείται από την σύγκριση των φασμάτων ότι τόσο στην επασβέστωση των μαλακών μορίων πλησίον του ισχίου όσο και στην περίπτωση της αορτικής βαλβίδας ο μηχανισμός παραγωγής οστού συνδέεται με μηχανισμούς όπου επικρατούν έντονες ανόξυ συνθήκες και οξειδωτικού στρες.

Στο Σχήμα 6.19 αναλύεται η περιοχή του υπέρυθρου φάσματος  $1200-800\text{ cm}^{-1}$ , όπου εμφανίζονται οι δονήσεις τάσης των φωσφορικών ομάδων του υδροξυαπατίτη,



**Σχήμα 6. 19** FT-IR φάσματα: *a*; υγιούς οστού, *b* έκτοπου οστού αριστερού ισχίου ασθενούς 31 έτους και *c*; Επασβεστωμένης αορτικής βαλβίδας στην περιοχή 4000-400  $cm^{-1}$ .

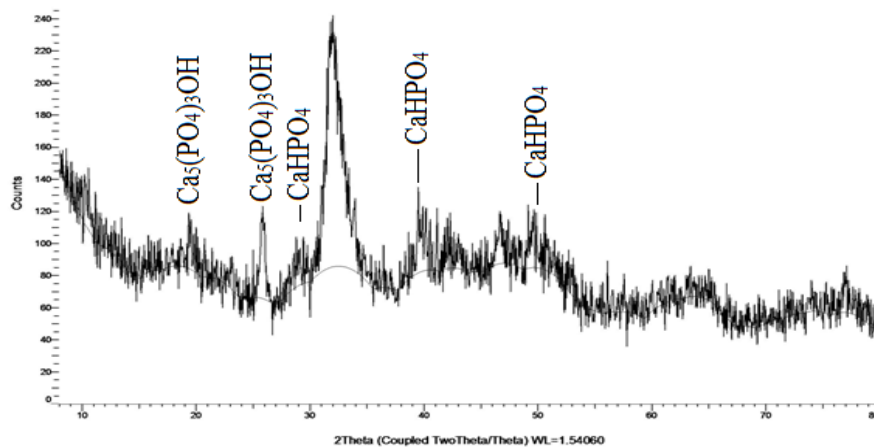
Έχει αποδειχθεί βιοχημικά ότι ο καταβολισμός της ATP κατά την διάρκεια ισχαιμικού συμβάντος έχει ως αποτέλεσμα την εκροή (efflux) της αδενοζίνης και των μεταβολιτών της, ινοζίνη, υποξανθίνη, ξανθίνη και ουρικό οξύ, που καταλύονται από το ένζυμο ξανθίνη οξειδοοδουκτάση (Σχήμα 6.20). Αποδείχθηκε ότι τα προϊόντα αυτά συγκεντρώνονται στον εγκέφαλο (Parks et al., 1998, Phillis et al., 1991).



**Σχήμα 6. 20** Καταβολισμός της ATP κατά την διάρκεια ισχαιμικού συμβάματος (Πισσαρίδη 2012)

Η ενεργειακή καταβολή της ATP οδηγεί στην αύξηση της συγκέντρωσης των ενδοκυττάρων (cytosolic) ιόντων ασβεστίου, με αποτέλεσμα τα ιόντα ασβεστίου να αντιδράσουν με τις ελεύθερες φωσφορικές ομάδες που παράγονται από το ATP και να σχηματίσουν διάφορα φωσφορικά άλατα του ασβεστίου. Τα άλατα ασβεστίου ερμηνεύουν

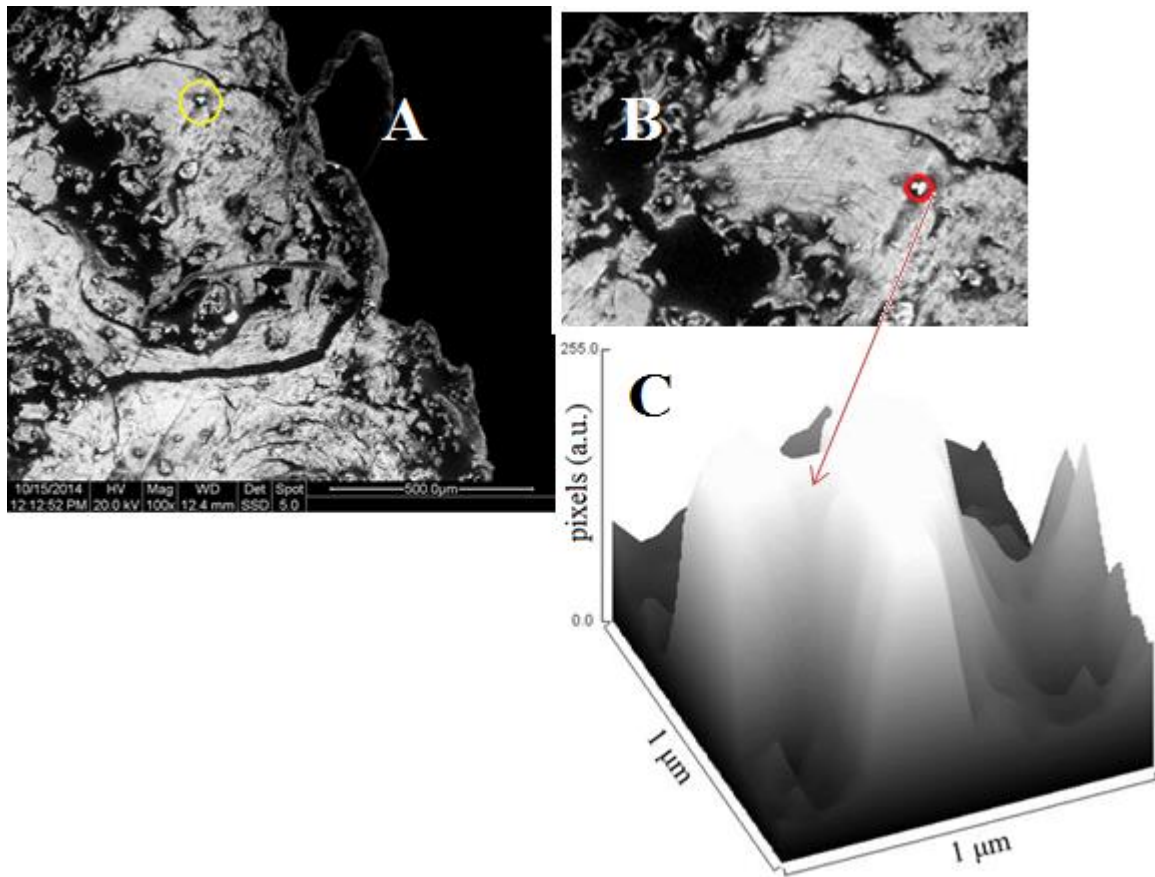
τις μετατοπίσεις των ταινιών των δονήσεων τάσης των  $\nu\text{PO}_4^{3-}$  και την απόκλισή τους από τον βιολογικό υδροξυαπατίτη. Πέραν αυτών, η είσοδος των ιόντων ασβεστίου στην ευρύτερη κυκλοφορία του αίματος και τον κύκλο του διοξειδίου του άνθρακα οδηγεί στον σχηματισμό ανθρακικών αλάτων του ασβεστίου. Αυτό δεν αποκλείει τον σχηματισμό και άλλων συμπλόκων ενώσεων του ασβεστίου σε άλλες θέσεις μαλακών ιστών του σώματος, τα οποία είναι προφανές ότι δεν μπορούν να ανιχνευθούν στο δείγμα το οποίο αφαιρείται από την θέση έκτοπης οστεοποίησης. Η XRD ανάλυση έδειξε σχηματισμό απατίτη  $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_5\text{OH}]$  και την επικράτηση όξινου φωσφορικού ασβεστίου (Κουτουλάκης 2014, Κυριακίδου 2014).



**Σχήμα 6.21** XRD διαγράμμα έκτοπου οστού. Τονίζεται ο σχηματισμός μη βιολογικού υδροξυαπατίτη  $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_5\text{OH}]$  και  $\text{CaHPO}_4$ .

Επειδή όμως η μέθοδος δεν παρέχει πληροφορίες για μη κρυσταλλικές ενώσεις, πράγματι όπως έδειξε η FT-IR φασματοσκοπία συνεπάγεται ότι τα σχηματιζόμενα άλατα είναι κυρίως άμορφα άλατα του φωσφορικού ασβεστίου.

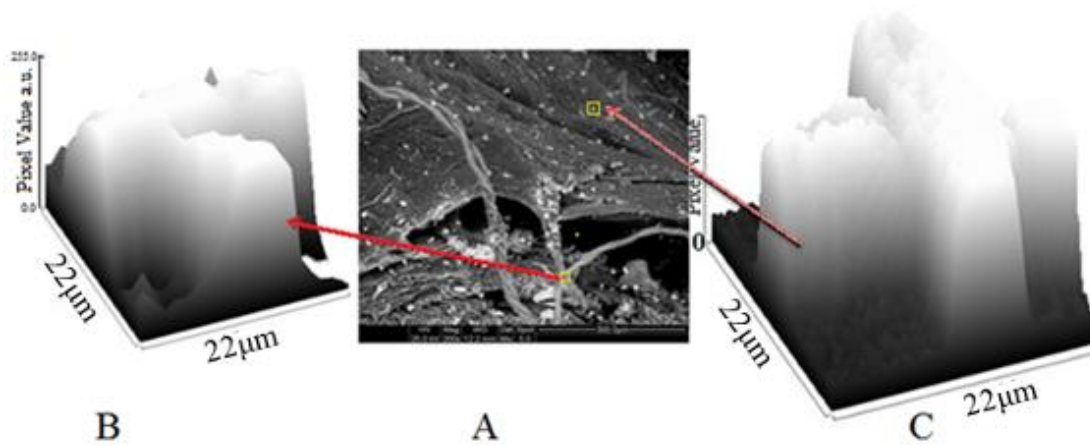
Στην Εικόνα 6.6 φαίνεται η SEM γενική μορφολογική απεικόνιση της επιφάνειας έκτοπου οστού (A) και τα σχηματισθέντα ινίδια. Με κύκλο τονίζεται η θέση όπου οι πρωτεΐνες σχηματίζουν παράπλευρο πολυμερισμό (B). Η Εικόνα C παρέχει την ImageJ ανάλυση στην θέση του παράπλευρου πολυμερισμού.



**Εικόνα 6. 6.** SEM μορφολογική απεικόνιση της επιφάνειας έκτοπου οστού. A; γενική μορφολογία της επιφάνειας του έκτοπου οστού και τα σχηματισθέντα ινίδια, B; Ο κύκλος δείχνει την εμφανή θέση παράπλευρου πολυμερισμού, C; ImageJ ανάλυσης στην θέση του παράπλευρου πολυμερισμού. (Κλίμακα 500  $\mu\text{m}$ , M100x).

Όπως διακρίνεται στην θέση του παράπλευρου πολυμερισμού (το ίδιο ισχύει και για διασταυρούμενο πολυμερισμό) αρχίζει η εναπόθεση ασβεστίου. Πιστεύουμε ότι ο πολυμερισμός λαμβάνει χώρα μεταξύ ατόμων θείου (διθειόλες, S-S) δύο θειούχων αμινοξέων. Η παρουσία των ατόμων θείου με αυξημένο αρνητικό φορτίο είναι θέσεις επασβέστωσης των μαλακών μορίων.

Στην Εικόνα 6.7 φαίνεται η SEM γενική μορφολογική απεικόνιση της επιφάνειας της επασβεστωμένης αορτικής βαλβίδας (A), όπου φαίνονται οι επιμεταλλώσεις και τα ινίδια. Τα βέλη δείχνουν τις θέσεις όπου έγινε ImageJ ανάλυση παράπλευρου πολυμερισμού (B) και διασταυρούμενου πολυμερισμού (C). (Mamarelis et al 2016).



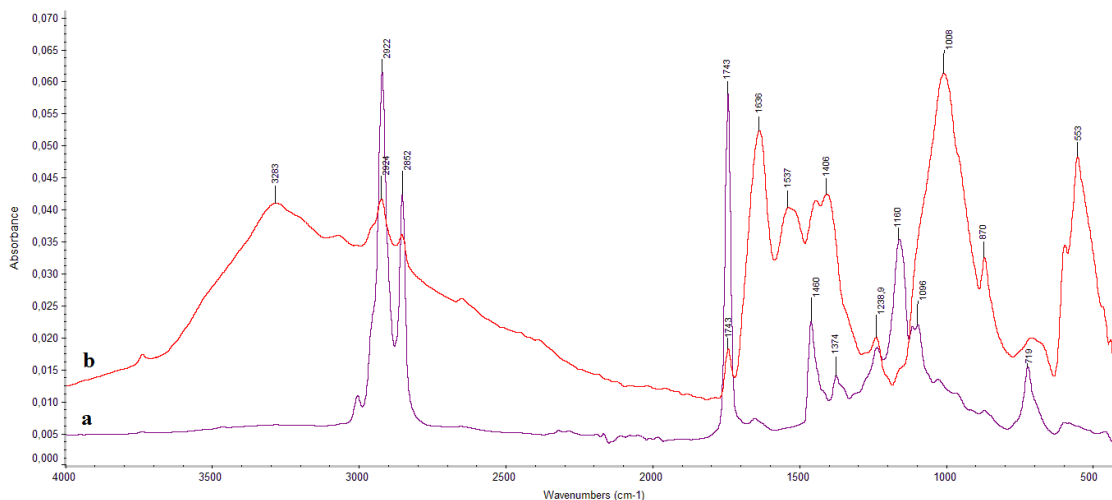
**Εικόνα 6. 7** SEM μορφολογική απεικόνιση της επιφάνειας επασβεστωμένης αορτικής βαλβίδας. A; γενική μορφολογία των επιμεταλλώσεων και ινιδίων, B; Το βέλος δείχνει την θέση του παράπλευρου πολυμερισμού των πρωτεϊνών και το αποτέλεσμα της ImageJ ανάλυση και C; Θ θέση του διασταυρούμενου πολυμερισμού με την αντίστοιχη ImageJ ανάλυση. (Κλίμακα 300  $\mu\text{m}$ , M200x). (Mamarelis et al 2016)

Από την σύγκριση των Σχημάτων διαπιστώνεται ότι το έκτοπο οστό αρχίζει να αναπτύσσεται σε θέσεις όπου οι πρωτεΐνες παρουσιάζουν βλάβη. Κυρίως ευνοούνται θέσεις S-S οι οποίες τοπικά παρουσιάζουν αυξημένο αρνητικό φορτίο. Οι δεσμοί των διθειολών έχουν εντοπισθεί και στα υπέρυθρα φάσματα περίπου στα  $521\text{ cm}^{-1}$ . Επιπλέον, η ταινία στα  $2891\text{ cm}^{-1}$  η οποία αντιστοιχεί στην δόνηση τάσης του δεσμού νCH τεταρτοταγούς ατόμου άνθρακα συνηγορεί για τον σχηματισμό παράπλευρων πολυμερικών αλυσίδων (Bellamy 1975).

#### 6.4 FT-IR ΦΑΣΜΑΤΑ ΟΣΤΩΝ ΑΠΟ ΧΑΛΑΡΩΣΗ ΟΛΙΚΗΣ ΑΡΘΡΟΠΛΑΣΤΙΚΗΣ ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΓΟΝΑΤΟΣ ΚΑΙ ΙΣΧΙΟΥ

Η μακροσκοπική χαλάρωση ενός εμφυτεύματος μπορεί να οφείλεται σε σημαντικές βλάβες των οστεοδοκίδων της οστικής επιφάνειας πρόσφυσης της αρθροπλαστικής σε μοριακό επίπεδο. Για τον λόγο αυτό θεωρήθηκε απαραίτητο να μελετηθεί το υπέρυθρο φάσμα οστού από το οποίο αφαιρέθηκε το εμφύτευμα λόγω χαλάρωσης ολικής αρθροπλαστικής γόνατος, ώστε να φανούν οι μοριακές μεταβολές. Στο Σχήμα 6.22 φαίνεται το υπέρυθρο φάσμα οστού από περιοχή οστεόλυσης-χαλάρωσης της ολικής αρθροπλαστικής. Παρατηρείται ότι το δείγμα είναι πλούσιο σε λιπαρά κυρίως συστατικά, όπως φαίνεται από την ένταση των ταινιών στην περιοχή του φάσματος μεταξύ  $3000-2850\text{ cm}^{-1}$ , όπου, όπως προαναφέρθηκε, εμφανίζονται οι απορροφήσεις των δονήσεων τάσης

των μεθυλ και μεθυλενομάδων των λιπιδίων και άλλων μακρομορίων των οστών. Η ένταση της ταινίας στα  $1743\text{ cm}^{-1}$ , η οποία αντιστοιχεί στην υπεροξείδωση των λιπαρών συστατικών του οστού, είναι αρκετά υψηλή. Παράλληλα εμφανίζεται μία νέα έντονη ταινία στα  $1160\text{ cm}^{-1}$ , η οποία αντιστοιχεί σε γλυκοζυλιώσεις των οστών.



**Σχήμα 6. 22.** FT-IR φάσμα οστού από την περιοχή της χαλάρωσης της αρθροπλαστικής *a* και *b* μετά από απομάκρυνση των οργανικών συστατικών

Δεδομένου ότι δεν εμφανίζονται καθόλου οι χαρακτηριστικές δονήσεις των Amide I και Amide II των πρωτεϊνών και των φωσφορικών ομάδων του υδροξυαπατίτη προβήκαμε στην διάλυση των οργανικών συστατικών του οστού.

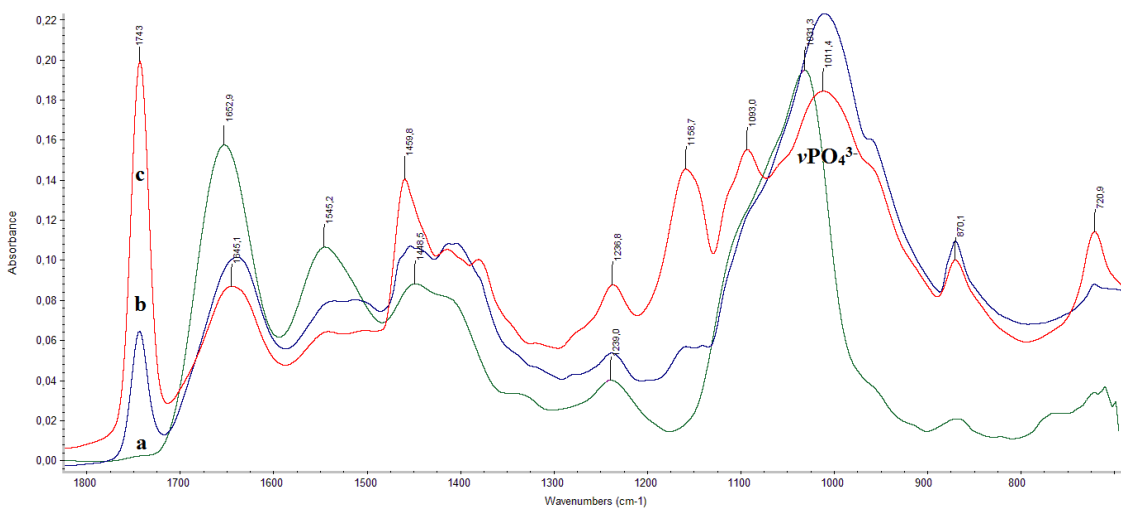
Στο Σχήμα 6.22 *b* φαίνεται το FT-IR φάσμα μετά από τοποθέτηση του οστού σε διάλυμα πετρελαϊκού αιθέρα επί 30 min. Μετά την απομάκρυνση των θραυσμάτων και οξειδωμένων οργανικών συστατικών του οστού στο φάσμα φάνηκαν όλες οι χαρακτηριστικές ταινίες των οργανικών και ανοργάνων συστατικών των οστών. Παρόλα αυτά, από τις μετατοπίσεις των απορροφήσεων των φωσφορικών ομάδων του υδροξυαπατίτη φαίνεται ότι ο απατίτης χάνει αρκετά από την βιολογική δομή του.

Μακροσκοπικά κατά τη διάρκεια του χειρουργείου αντικατάστασης διαπιστώθηκε σε όλες τις περιπτώσεις η φθορά του υποκείμενου οστού, το οποίο είχε χάσει την σκληρότητά του. Το οστό αυτό ήταν εύθραυστο, πλούσιο σε λιπαρά στοιχεία και ακατάλληλο για την υποδοχή της νέας αρθροπλαστικής. Ήταν απαραίτητο σε όλες τις περιπτώσεις η απομάκρυνσή του και η ανάγκη χρήσης μοσχευμάτων για τη δημιουργία σταθερότερης επιφάνειας υποδοχής.



## 6.5. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΦΑΣΜΑΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΜΕ ΡΕΥΜΑΤΟΕΙΔΗ ΑΡΘΡΙΤΙΔΑ ΚΑΙ ΑΡΘΡΙΤΙΔΑ

Επειδή το αίτιο πρόκλησης της ρευματοειδούς αρθρίτιδας διαφέρει της απλής αρθρίτιδας θεωρήσαμε αναγκαία την σύγκριση των υπέρυθρων φασμάτων οστών προερχόμενα από ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα και απλή αρθρίτιδα. Στο Σχήμα 6.23 δίνονται τα υπέρυθρα φάσματα υγιούς οστού (Σχήμα 6.23 a), οστού με ρευματοειδή αρθρίτιδα (Σχήμα 6.23b) και οστού με οστεοαρθρίτιδα (Σχήμα 6.23c) στην περιοχή 1800-700  $\text{cm}^{-1}$  επειδή στην περιοχή αυτή δίνονται πληρέστερες πληροφορίες σχετικά με την δευτεροταγή διαμόρφωση των πρωτεϊνών και του υδροξυαπατίτη.



**Σχήμα 6. 23** FT-IR φάσματα οστών: a; Υγιές, b; με ρευματοειδή αρθρίτιδα και c με οστεοαρθρίτιδα στην περιοχή 1800-700  $\text{cm}^{-1}$ .

Από την σύγκριση των υπέρυθρων φασμάτων φαίνονται καθαρά οι σημαντικές διαφορές τις οποίες εμφανίζει το υπέρυθρο φάσμα το οποίο λήφθηκε από οστό με ρευματοειδή αρθρίτιδα από τα αντίστοιχα φάσματα του υγιούς και με απλή αρθρίτιδα.

Σημαντική είναι η υπεροξείδωση των μεμβρανών την οποία προκαλεί η ρευματοειδής αρθρίτιδα στο οστό, όπως συνάγεται από την εμφάνιση της ταινίας στα 1743 . Η ταινία αυτή εμφανίζεται ως ώμος στο φάσμα του ασθενούς με αρθρίτιδα και απουσιάζει από το φάσμα του υγιούς.

Ανάλυση του φάσματος του οστού από ρευματοειδή αρθρίτιδα στην περιοχή 1700-1500  $\text{cm}^{-1}$  δείχνει ότι οι ταινίες δεν είναι απλές αλλά περιέχουν τις δονήσεις των (1693, 1664, 1635, 1571, 1546, 1506) β-παράλληλων και β-αντιπαράλληλων επιπέδων. Η παρατήρηση αυτή δείχνει ότι κατά την ανάπτυξη της ρευματοειδούς αρθρίτιδας επικρατεί έντονο οξειδωτικό στρες το οποίο επηρεάζει την υπεροξείδωση των κυττάρων.

Παρατηρείται επίσης ότι η ευαισθησία της δευτεροταγούς δομής των Amide II είναι περισσότερο ευαίσθητη από εκείνη των Amide I, δεδομένου ότι μεταβάλλεται περισσότερο η έντασή της. Οι μετατοπίσεις των απορροφήσεων δόνησης των Amide I και Amide II προς μικρότερους κυματαριθμούς συνδέονται με την μεταβολή της διαμόρφωσης της α-έλικας σε τυχαία περιέλιξη, ως αποτέλεσμα της ασθένειας και της γήρανσης των οστών (Κολοβού, Anastassopoulou & Κολονου)

Η ταινία η οποία εμφανίζεται  $1459\text{ cm}^{-1}$  αποδίδεται στις δονήσεις κάμψης των μεθυλ ( $\delta\text{CH}_3$ ) και μεθυλενομάδων ( $\delta\text{CH}_2$ ) των αλειφατικών αλυσίδων των λιπιδίων και φωσφολιπιδίων των μεμβρανών. Η αύξηση της έντασης στο φάσμα του οστού από ρευματοειδή αρθρίτιδα συνδέεται και με την αύξηση των αντίστοιχων ταινιών των δονήσεων τάσης των ιδίων ομάδων στην περιοχή του φάσματος  $3000\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$  και γενικά συνδέεται με το έντονο λιπόφιλο περιβάλλον το οποίο παράγεται λόγω του οξειδωτικού στρες. Η άποψη αυτή ενισχύεται από την εμφάνιση των ταινιών οι οποίες αποδίδονται στα β-επίπεδα παράλληλα και αντιπαράλληλα, ως αποτέλεσμα των σχηματιζόμενων αμυλοειδών πρωτεϊνών. Το υπέρυθρο φάσμα των οστεοαρθρικών οστών δείχνει παρόμοιες μεταβολές συγκρινόμενο με το αντίστοιχο φάσμα του οστού με ρευματοειδή αρθρίτιδα, αλλά οι βλάβες είναι σε μικρότερο βαθμό.

Η μεγάλης έντασης ταινίας στα  $1158\text{ cm}^{-1}$  συνδέεται με την αυξημένη γλυκοζυλίωση η οποία επικρατεί κατά την ανάπτυξη της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Η γλυκοζυλίωση προέρχεται από τις σχάσεις των γλυκοζαμινογλυκανών των χόνδρων των οστών, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως (παράγραφος, σελ). Παρόλα αυτά, τα οστεοαρθρικά οστά δεν δείχνουν να υφίστανται στον ίδιο βαθμό γλυκοζυλίωση. Τα φάσματα των οστών με ρευματοειδή αρθρίτιδα προσομοιάζουν περισσότερο με οστά υγιή που ακτινοβολήθηκαν με δόση ακτινοβολίας μεγαλύτερη των  $4\text{ Gy}$  (Κολοβού, Μαυρογένης 2016, Mavrogenis et al 2016). Η εμφάνιση ταινίας απορρόφησης περίπου στα  $1123\text{ cm}^{-1}$  δείχνει ότι στην ρευματοειδή αρθρίτιδα παράγονται όξινα φωσφορικά άλατα ασβεστίου  $\text{HPO}_4^{2-}$  (El Feki & Vignoles 1991).

Οι επόμενες κορυφές που εμφανίζονται στα  $1096\text{ cm}^{-1}$  και στα  $1028\text{ cm}^{-1}$ , αποδίδονται αντίστοιχα στην αντισυμμετρική δόνηση τάσης  $\nu_3\text{PO}_4^{3-}$  και στην συμμετρική δόνηση τάσης  $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$  της ομάδας  $-\text{PO}_4^{3-}$ , των φωσφορικών ιόντων του υδροξυαπατίτη. Σύμφωνα με τους Gadaleta et al η μικρή κορυφή που παρουσιάζεται στα  $1116\text{ cm}^{-1}$ , (Nyquist & Kagel 1971) έχει βρεθεί σε ώριμους υδροξυαπατίτες με μικρό βαθμό κρυσταλλικότητας. Είναι δε πιθανόν να υπήρχε και στο φάσμα του μη ακτινοβολημένου

δείγματος, αλλά να επικαλυπτόταν από τις πλατιές κορυφές στα  $1096\text{ cm}^{-1}$  και στα  $1026\text{ cm}^{-1}$ , οι οποίες μετά την ακτινοβολήση σχεδόν εξαφανίστηκαν.

Η κορυφή στα  $1026\text{ cm}^{-1}$  οφείλεται στην συμμετρική δόνηση τάσης των φωσφορικών ιόντων  $\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$ . Η δόνηση αυτή σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα (Κολοβού κ.ά. 2003, Κολονου & Anastassopoulou, 2004,2007, Anastassopoulou et al 2007) δεν είναι απλή, αλλά αποτελείται από δύο κορυφές πολύ κοντινές μεταξύ τους, στα  $1020\text{ cm}^{-1}$  και στα  $1030\text{ cm}^{-1}$ . Ο λόγος των δύο αυτών κορυφών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό του μέτρου κρυσταλλικότητας του υδροξυαπατίτη. Συγκεκριμένα η κορυφή στα  $1020\text{ cm}^{-1}$  είναι χαρακτηριστική του μη στοιχειομετρικού και με μικρό βαθμό κρυσταλλικότητας βιολογικού απατίτη που περιέχει όξινα φωσφορικά και ανθρακικά ιόντα ενώ η κορυφή στα  $1030\text{ cm}^{-1}$  αντιστοιχεί σε στοιχειομετρικό υδροξυαπατίτη με μεγάλο βαθμό κρυσταλλικότητας.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζουν τα φάσματα στην περιοχή του φάσματος από  $1100\text{-}850\text{ cm}^{-1}$ , όπου εμφανίζονται οι δονήσεις τάσης των φωσφορικών ομάδων ( $\nu\text{PO}_4^{3-}$ ) του υδροξυαπατίτη. Από την μείωση των εντάσεων των ταινιών των φωσφορικών ομάδων στο φάσμα του οστού με ρευματοειδή αρθρίτιδα συμπεραίνεται ότι στην ρευματοειδή αρθρίτιδα επικρατεί έντονη οστεόλυση. Επιπλέον, από τις μετατοπίσεις των συχνοτήτων απορρόφησης των φωσφορικών ομάδων διαπιστώνεται ότι στα οστά με ρευματοειδή αρθρίτιδα δεν επικρατεί πλέον ο βιολογικός υδροξυαπατίτης. Αντίθετα το φωσφορικό ασβέστιο γίνεται περισσότερο ανόργανο και προφανώς με διαφορετικές εμβιομηχανικές ιδιότητες, οι οποίες ακολουθούν το ιστορικό του εκάστοτε ασθενούς. Πρέπει να τονισθεί ότι τα οστεοαρθρικά οστά δεν εμφανίζουν οστεόλυση.

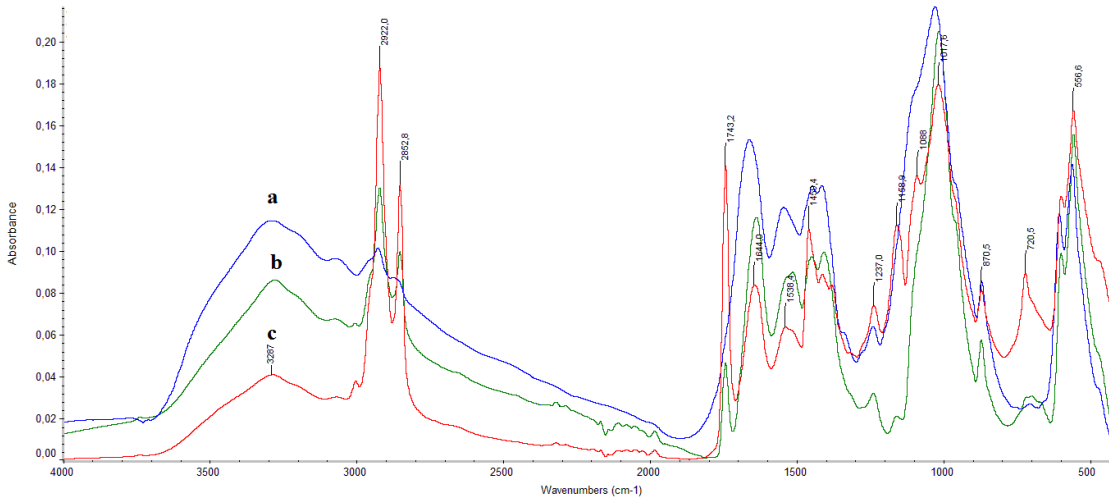
Είναι γνωστό ότι στις κρίσεις ρευματοειδούς αρθρίτιδας επικρατούν συνθήκες φλεγμονής, με υπεραιμάτωση, πάχυνση και καταστροφή του αρθρικού θυλάκου. Σε ένα δεύτερο στάδιο καταστρέφεται ταχέως ο αρθρικός χόνδρος και το υποκείμενο υποχόνδριο οστό. Μακροσκοπικά οι μεταφύσεις αυτών των οστών είναι οστεοπενικές και βρίθουν οστεολύσεων.

## 6.6 FT-IR ΦΑΣΜΑΤΑ ΟΣΤΕΟΝΕΚΡΩΤΙΚΩΝ ΟΣΤΩΝ

Η νέκρωση του οστού μπορεί να προέλθει από πολλούς παράγοντες, όπως ανεπιτυχής αποκατάσταση της αιμάτωσης του οστού έπειτα από ισχαιμικά επεισόδια ή έπειτα από άμεση διακοπή της αιμάτωσης του οστού έπειτα από ατύχημα. Οποιοδήποτε

και αν είναι το αίτιο στο τέλος απαιτείται αφαίρεση του νεκρωμένου οστού. Για να μελετήσουμε τις αποκλίσεις από την φυσιολογική κατάσταση λάβαμε τα φάσματα οστεονεκρωτικών οστών, τα οποία συγκρίθηκαν με αντίστοιχα υγιών οστών.

Στο Σχήμα 6.24 παρουσιάζονται τα υπέρυθρα φάσματα υγιούς οστού (καμπύλη a) οστεονεκρωτικού φλοιώδους οστού (καμπύλη b) και από υποχόνδριο οστεονεκρωτικού οστού (καμπύλη c).



**Σχήμα 6. 24** FT-IR φάσμα οστού a; Υγιές b; Χόνδρος οστού με οστεονέκρωση και c; Υποχόνδριο νεκρωτικού οστού

Παρατηρούνται από τη σύγκριση των φασμάτων διαφορές στην περιοχή του φάσματος από  $4000-2850\text{ cm}^{-1}$  οι οποίες προκύπτουν από μεταβολές τόσο στην ανόργανη όσο και στην οργανική φάση του οστού. Ο όμως στην περιοχή του φάσματος περίπου στα  $3500\text{ cm}^{-1}$ , που αποδίδονται στις δονήσεις τάσης των ομάδων υδροξυλίου  $\nu\text{OH}$  του υδροξυαπατίτη και των μορίων του νερού των βιολογικών μορίων μειώνεται σημαντικά στα πάσχοντα οστά (Kolovou & Anastassopoulou 2004, 2007, Anastassopoulou et al 2005, 2008, Petra et al, 1999, 2005, 2007, Theophanides 1984, 2012, 2012a, 2015). Η μείωση αυτή αποδίδεται στην καταστροφή του υδροξυαπατίτη των οστών, η οποία προκλήθηκε από την νέκρωση. Επίσης διαφοροποιήσεις παρατηρούνται και στις δονήσεις τάσης των ομάδων  $\nu\text{NH}$  των πρωτεϊνών. Ιδιαίτερα, στην περίπτωση του φάσματος του υποχόνδριου εμφανίζεται μία νέα ταινία στα  $3008\text{ cm}^{-1}$ , η οποία αποδίδεται στην δόνηση τάσης  $\nu=\text{C}-\text{H}$  των δακτυλίων των αμινοξέων των πρωτεϊνών με αρωματικό χαρακτήρα. Φαίνεται δηλαδή ότι η νέκρωση οδηγεί σε σχάση των αλυσίδων των πρωτεϊνών και πολλά αμινοξέα με κυκλικό δακτύλιο γίνονται τερματικά.

Στην περιοχή του φάσματος από  $3500 - 2700\text{ cm}^{-1}$  εμφανίζονται κορυφές που οφείλονται στην παρουσία κυρίως των οργανικών συστατικών του οστού, καθώς και οι

ταινίες δόνησης τάσης των μορίων του νερού που περιέχουν τα βιολογικά μόρια παράλληλα με τους δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζουν (Kolonou & Anastassopoulou, 2007, 2004, Anastassopoulou et al 2005, 2008, Petra et al, 1999, 2005, 2007, Theophanides 1984, 2012, 2012a, 2015). Επίσης η αύξηση των εντάσεων απορρόφησης της αντισυμμετρικής και συμμετρικής δόνησης τάσης στα των μεθυλενομάδων ( $\nu\text{CH}_2$ , ) στα  $2922\text{ cm}^{-1}$  και  $2852\text{ cm}^{-1}$ , δείχνουν τον σχηματισμό έντονου λιπόφιλου περιβάλλοντος. Αυτό επιβεβαιώνεται και από την σχεδόν απουσία των απορροφήσεων τάσης των μεθυλομάδων ( $\nu\text{CH}_3$ ). Είναι γνωστό ότι σε αυξημένο λιπόφιλο περιβάλλον επικρατεί μία μεγαλύτερη τάξη (order) των μακρομορίων των λιπόφιλων ομάδων των λιπιδίων των μεμβρανών (Anastassopoulou & Theophanides, 1992).

Η περιοχή του φάσματος από  $1800\text{-}400\text{ cm}^{-1}$  παρουσιάζει επίσης έντονες διαφοροποιήσεις. Η ένταση της ταινίας στα  $1743\text{ cm}^{-1}$  αυξάνει ιδιαίτερα στην περίπτωση του φάσματος του υποχόνδριου ιστού. Η αύξηση αυτή συνδέεται με την αύξηση του οξειδωτικού στρες που ισχύει κατά την βιολογική διαδικασία ανάπτυξη της νέκρωσης του οστού. Επίσης η αύξηση της έντασης της ίδιας ταινία μεταξύ υποχόνδριου και σπογγώδους οστού αποδίδεται στην αυξημένη οργανική φάση την οποία περιέχει ο υποχόνδριος ιστός.

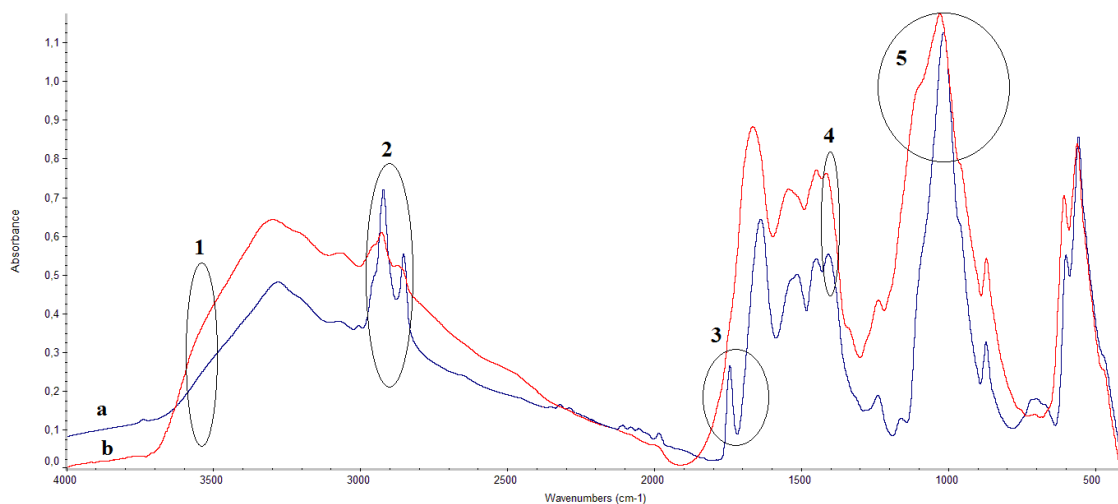
Οι δονήσεις των εντάσεων απορρόφησης των Amide I και Amide II προς μικρότερους κυματαριθμούς δείχνει την μεταβολή της  $\alpha$ -έλικας των πρωτεϊνών προς τυχαία διαμόρφωση. Όπως είδαμε και στην περίπτωση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας το τελικό αποτέλεσμα είναι η μετατροπή της διαμόρφωσης των πρωτεϊνών. Διαφαίνεται επίσης ότι η μετατροπή της διαμόρφωσης των πρωτεϊνών από  $\alpha$ -έλικα σε τυχαία διαμόρφωση πρέπει να είναι ένα από τα αίτια παρεμπόδισης της επασβέστωσης των οστών. Φαίνεται δηλαδή ότι οι δεσμοί υδρογόνου οι οποίοι καθορίζουν την διαμόρφωση της έλικας διαμορφώνουν και τις δυνάμεις σύνδεσης του ασβεστίου στα ενεργά κέντρα των κολλαγονούχων πρωτεϊνών. Η ταινία η οποία εμφανίζεται στα φάσματα του οστεονερωτικού οστού στην θέση περίπου  $1507\text{ cm}^{-1}$  αποδίδεται στις δονήσεις τάσης των ιοντικών ομάδων  $\nu_{\text{as}}\text{COO}^-$  των και  $\nu_3\text{CO}_3^{2-}$ , δηλώνοντας ότι υπάρχει υδροξυαπατίτης τύπου AB.

Η παραπάνω άποψη ενισχύεται και από την μεταβολή των εντάσεων και των μετατοπίσεων απορρόφησης των ταινιών στην περιοχή του φάσματος μεταξύ  $1300\text{-}850\text{ cm}^{-1}$ . Στην περιοχή αυτή του φάσματος, όπως προαναφέρθηκε, αναμένονται οι δονήσεις τάσης των απορροφήσεων των φωσφορικών ( $\nu\text{PO}_4^{3-}$ ) και ανθρακικών ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) ομάδων του υδροξυαπατίτη. Οι μετατοπίσεις των απορροφήσεων των δονήσεων τάσης των ομάδων  $\nu\text{PO}_4^{3-}$  από  $1098\text{ cm}^{-1}$  και  $1025\text{ cm}^{-1}$  προς μικρότερους κυματαριθμούς δηλαδή στα  $1088\text{ cm}^{-1}$  και  $1017\text{ cm}^{-1}$ , αντίστοιχα, δείχνουν την μετατροπή του υδροξυαπατίτη από

βιολογικό σε περισσότερο ανόργανο φωσφορικό ασβέστιο.

Από τη σύγκριση των φασμάτων των ασθενών οι οποίοι έπασχαν από οστεοαρθρίτιδα και άσηπτη νέκρωση της κεφαλής του μηριαίου οστού φαίνεται ότι τα οστά (δείγματα) δίδουν σημαντικά διαφορετικά υπέρυθρα φάσματα κυρίως ως προς τις εντάσεις των ταινιών. Η διαφορά τους αποδίδεται στα ποσοστά της οργανικής κυρίως φάσης που περιέχουν τα δείγματα. Διαφορές όμως παρατηρήθηκαν και μεταξύ των υπέρυθρων φασμάτων σε ασθενείς με την ίδια επικείμενη νόσο. Η παρατήρηση αυτή δείχνει τόσο την πολυπλοκότητα των βιολογικών μορίων, όσο και τους βιολογικούς παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την μοριακή δομή του κάθε ατόμου.

Στο Σχήμα 6.25 δίνονται για σύγκριση τα υπέρυθρα φάσματα φλοιώδους οστών προερχόμενων από άσηπτη οστεονέκρωση κεφαλής μηριαίου ασθενούς ηλικίας 20 ετών (καμπύλη a) που είχε υποβληθεί σε οστεοσύνθεση κατάγματος του μηριαίου αυχένος έπειτα από τροχάιο ατύχημα και ασθενούς με οστεοαρθρίτιδα (καμπύλη b).



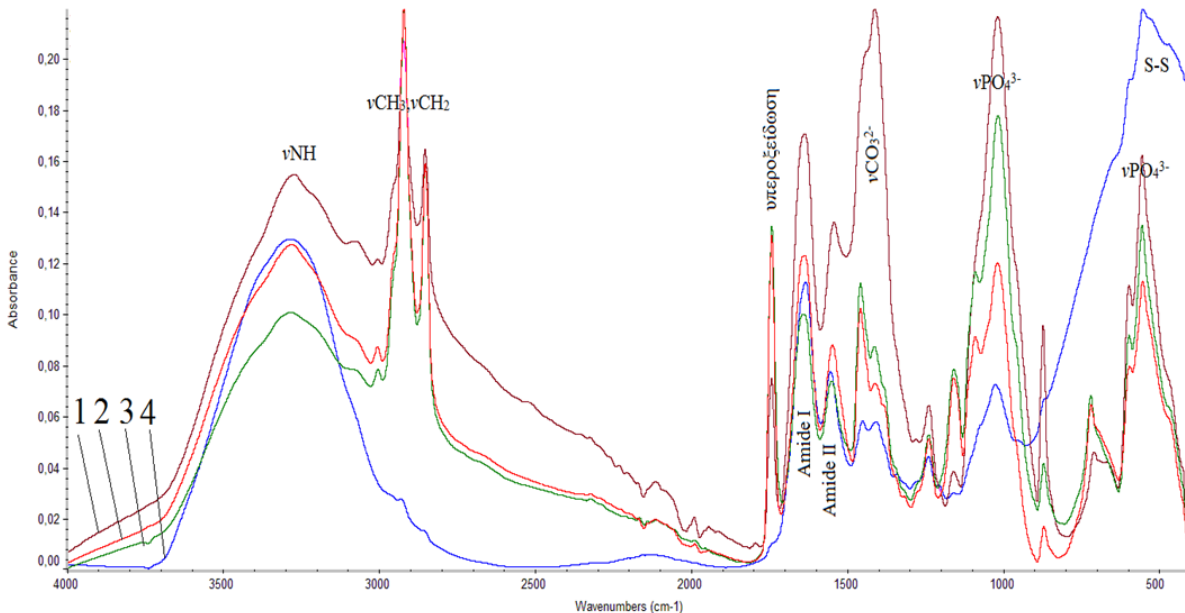
**Σχήμα 6. 25** FT-IR φάσμα οστού δύο διαφορετικών ασθενών: a: με οστεονέκρωση και b: με οστεοαρθρίτιδα

Από τη σύγκριση των φασμάτων διαπιστώνεται ότι οι ασθένειες προκαλούν βλάβες σε διαφορετικό βαθμό στην μοριακή δομή των οστών. Με κύκλους σημειώνονται οι σημαντικότερες διαφορές μεταξύ των δύο φασμάτων. Οι θέσεις 1, 2 και 3 δείχνουν ότι στην οστεονέκρωση επικρατεί οξειδωτικό στρες. Σημαντική είναι η διαφορά στην θέση 4 των φασμάτων περίπου στα  $1410\text{ cm}^{-1}$ . Η ένταση της ταινία αυτής αναστρέφεται στην περίπτωση του φάσματος του οστεονεκρωτικού οστού. Η ταινία αυτή αποδίδεται στην δόνηση τάσης των ανθρακικών ιόντων. Φαίνεται δηλαδή ότι στον υδροξυαπατίτη των οστεονεκρωτικών οστών γίνονται περισσότερες αντικαταστάσεις των φωσφορικών

ομάδων από ανθρακικές.

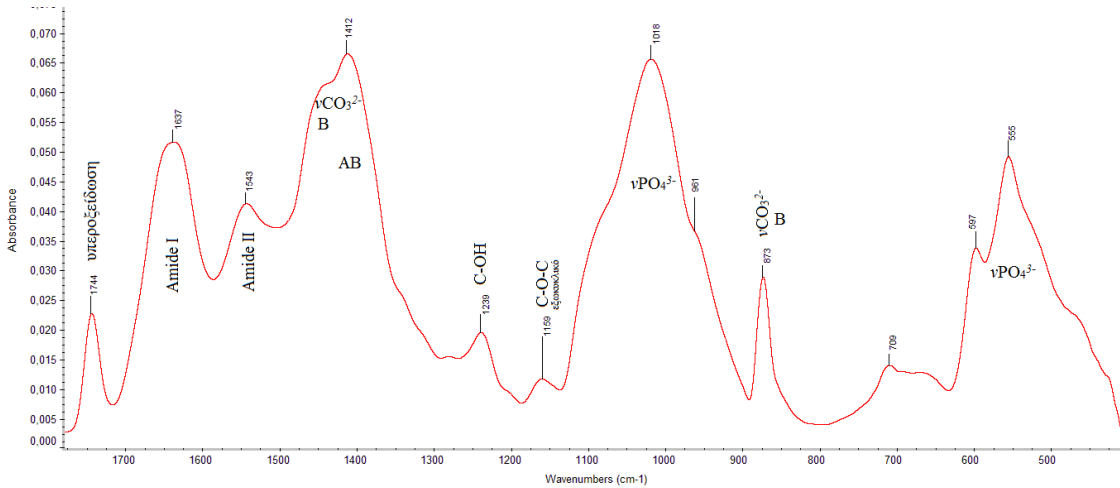
## 6.7 FT-IR ΦΑΣΜΑΤΑ ΟΣΤΩΝ ΑΣΘΕΝΟΥΣ ΜΕ ΣΥΓΓΕΝΕΣ ΕΞΑΡΘΡΗΜΑ

Στο Σχήμα 6.26 συγκρίνονται τα υπέρυθρα φάσματα οστών προερχόμενα από ασθενείς με συγγενές εξάρθημα. Τα φάσματα 1 και 3 προέρχονται από το σπογγώδες τμήμα του οστού και τα φάσματα 2 και 4 από τον χόνδρο και το φλοιώδες, αντίστοιχα, στην περιοχή 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ . Από την σύγκριση των φασμάτων στις διάφορες θέσεις του οστού του ασθενούς με συγγενές εξάρθημα φαίνεται ότι πέραν των φυσιολογικά αναμενόμενων διαφορών ως προς την συγκέντρωση των συστατικών του οστού, διακρίνονται διαφορές οι οποίες προκαλούνται από την ασθένεια και την κατάσταση του ασθενούς.



**Σχήμα 6. 26** FT-IR φάσματα οστού ασθενούς με συγγενές εξάρθημα: 1; Σπογγώδες, 2; Χόνδρος, 3; Σπογγώδες και 4; Φλοιώδες στην περιοχή 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ .

Για μεγαλύτερη ευκρίνεια των φασμάτων διαχωρίστηκε το φάσμα, το οποίο με βάση τις εντάσεις των ταινιών έδειχνε την μεγαλύτερη συγκέντρωση βιολογικού υδροξυαπατίτη (Σχήμα 5.27).

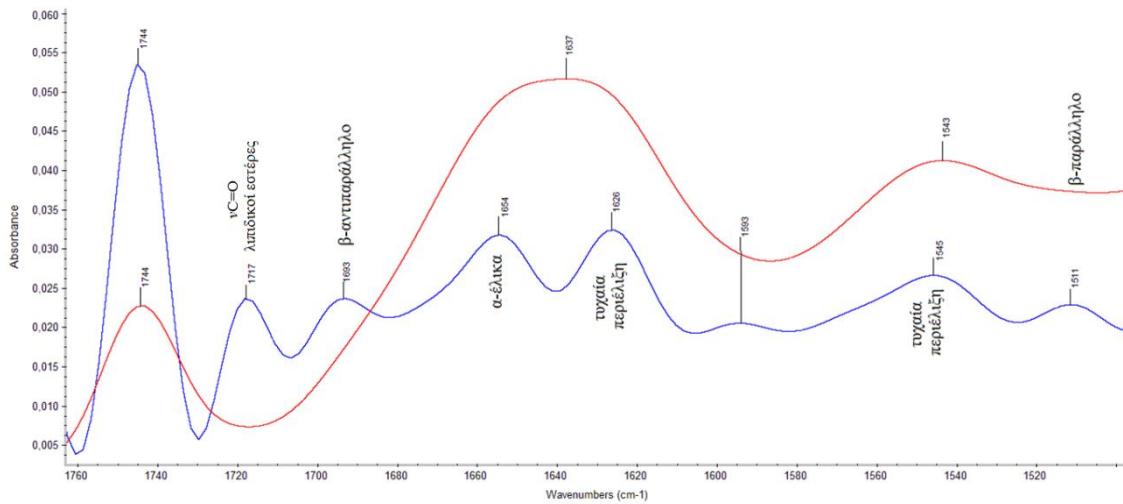


**Σχήμα 6. 27** FT-IR φάσματα οστού ασθενούς με συγγενές εξάρθημα στην περιοχή του φάσματος  $1800-400\text{ cm}^{-1}$ .  $\delta\text{CH}_2$  &  $\nu_3\text{CO}_3^{2-}$ , ανθρακικός απατίτης τύπου B

Όπως φαίνεται από τις χαρακτηριστικές ταινίες του οστού, οι εντάσεις των ταινιών των ανθρακικών ιόντων στις συχνότητες  $1450-1410\text{ cm}^{-1}$  αυξάνουν σημαντικά. Σε συνδυασμό με την ένταση της ταινίας στα  $873\text{ cm}^{-1}$  διαπιστώνεται ότι σχηματίζεται απατίτης τύπου AB και B. Γνωρίζουμε ότι όταν η δόνηση τάσης των ανθρακικών ιόντων  $\nu_2(\text{CO}_3^{2-})$  εμφανίζεται στα  $879\text{ cm}^{-1}$  έχουμε υδροξυαπατίτη τύπου A, δηλαδή τα ανθρακικά ιόντα έχουν αντικαταστήσει τα υδροξυλιόντα του υδροξυαπατίτη (Κολοβού, 2009, Πετρά 2003). Εάν όμως η ταινία μετατοπίζεται προς μικρότερους κυματαριθμούς και εμφανίζεται στα  $872\text{ cm}^{-1}$ , τότε επικρατεί ο υδροξυαπατίτης τύπου B, όπου τα ανθρακικά ιόντα έχουν αντικαταστήσει τα φωσφορικά του υδροξυαπατίτη (Πετρά 2003, Petra et al 2000, 2005)

Στο Σχήμα 6.28 δίνεται το υπέρυθρο φάσμα οστού στην περιοχή  $1800-1500\text{ cm}^{-1}$ , όπου εμφανίζονται οι δονήσεις των ταινιών κάμψης των Amide I και Amide II των πρωτεϊνών και η deconvolution ανάλυση του ίδιου φάσματος.

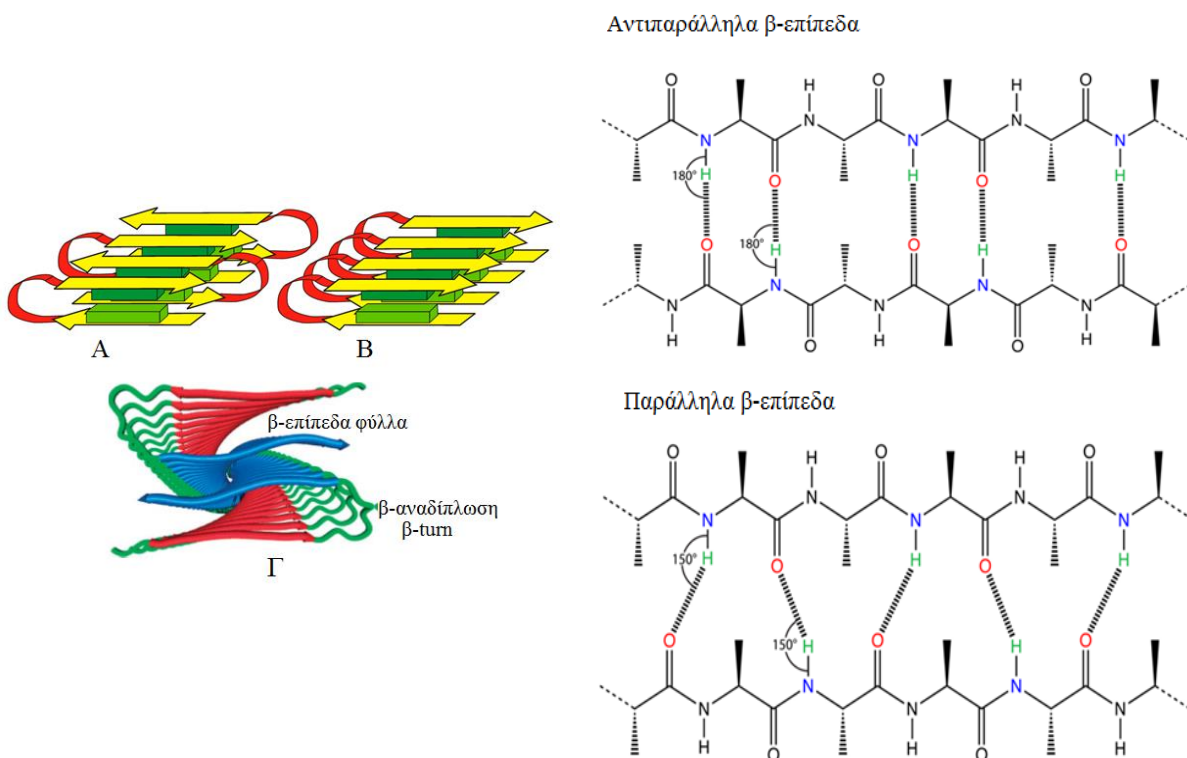




**Σχήμα 6. 28** FT-IR φάσματα οστού ασθενούς με συγγενές εξάρθρημα στην περιοχή του φάσματος των δονήσεων Amide I και Amide II στην περιοχή  $1800-1500\text{ cm}^{-1}$ .

Η deconvolution ανάλυση έδειξε το αποτέλεσμα, λόγω της ασθένειας, του οξειδωτικού στρες στην θέση της βλάβης. Η ταινία στα  $1717\text{ cm}^{-1}$  αποδίδεται στις ομάδες καρβonyλίου (C=O) λιπιδικών εστέρων (LDL). Είναι γνωστό ότι σε κάθε φλεγμονή σχηματίζεται LDL (Mamarelis et al 2010, 2011, 2011a, 2016, Pissaridi et al 2011).

Διαπιστώνεται επίσης από την μετατόπιση των δονήσεων κάμψης των Amide I και Amide II και τις νέες ταινίες ο σχηματισμός αμυλοειδούς τύπου πρωτεϊνών (Σχήμα 6.29).



**Σχήμα 6. 29** Δευτεροταγής δομή αμυλοειδούς τύπου πρωτεϊνών. Α: αντιπαράλληλη διάταξη, Β: παράλληλη διάταξη σε β-επίπεδα και Γ: Σχηματισμός β-έλικας

Στην περιοχή του φάσματος 600-500  $\text{cm}^{-1}$  ιδιαίτερα τονίζεται η ταινία η οποία εμφανίζεται περίπου στα 520  $\text{cm}^{-1}$ , η οποία αποδίδεται στην δόνηση του δισουλφονικού δεσμού (S-S). Η εμφάνιση δισουλφονικής ομάδας S-S δείχνει ότι οι προστατευτικές ενώσεις του οργανισμού έχουν καταστραφεί στην προσπάθεια να αντιμετωπίσουν ένα έντονο οξειδωτικό στρες το οποίο επικρατούσε στον ασθενή. Η παρατήρηση αυτή ενισχύεται από την όλη μεταβολή του φάσματος και στις δονήσεις τάσης του υδροξυαπατίτη και την έντονη μείωση των εντάσεων.

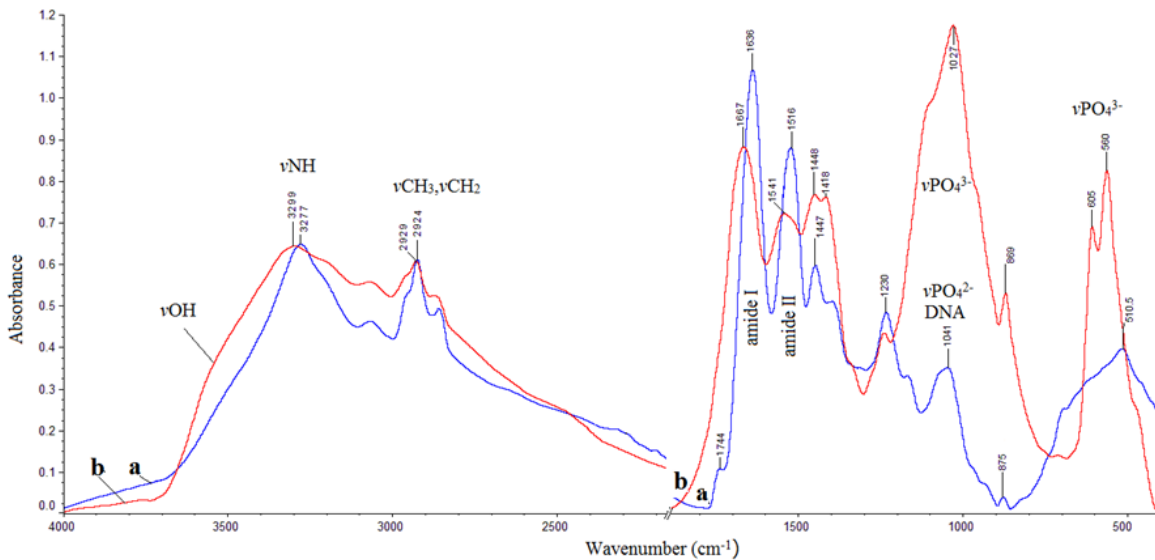
. Η μορφή και οι θέσεις των απορροφήσεων αποδίδονται κυρίως στις ομάδες C-S των S-S των θειολών. Φαίνεται δηλαδή ότι οι θειούχες βάσεις των πρωτεϊνών (κυστεΐνη) και οι γλουταθειόλες (GSH) έχουν οξειδωθεί. Οι ενώσεις αυτές αντιδρούν πολύ εύκολα με τις παραγόμενες οξειδωτικές ελεύθερες ρίζες των υδροξυλίων παρέχοντας το ευκίνητο υδρογόνο σύμφωνα με τις αντιδράσεις:



Η γλουταθειόνη είναι τριπεπτίδιο που αποτελείται από L-κυστεΐνη, L-γλουταμινικό οξύ και γλυκίνη και αποτελεί ένα από τα ενδοπροστατευτικά ένζυμα του οργανισμού, το οποίο σε καταστάσεις έντονου οξειδωτικού στρες καταναλώνεται. Η αύξηση της έντασης της ταινίας απορρόφησης των ομάδων S-S δείχνει και την εξέλιξη της ασθένειας, αποτελεί δε αποδεικτικό κριτήριο ότι σε κάποιο από τα στάδια της ασθένειας αναπτύσσεται οξειδωτικό στρες..

## 6.8 FT-IR ΦΑΣΜΑΤΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΟΣΤΩΝ

Η μελέτη καρκινικών οστών έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον όχι μόνο επειδή η ασθένεια είναι ακόμη άγνωστο πώς προκαλείται ή μεθίσταται από άλλες αρχικές θέσεις, αλλά και επειδή πολλές φορές το δείγμα είναι πάρα πολύ μικρό. Στο Σχήμα 6.30 δίνονται τα υπέρυθρα φάσματα καρκινικού και υγιούς οστού.



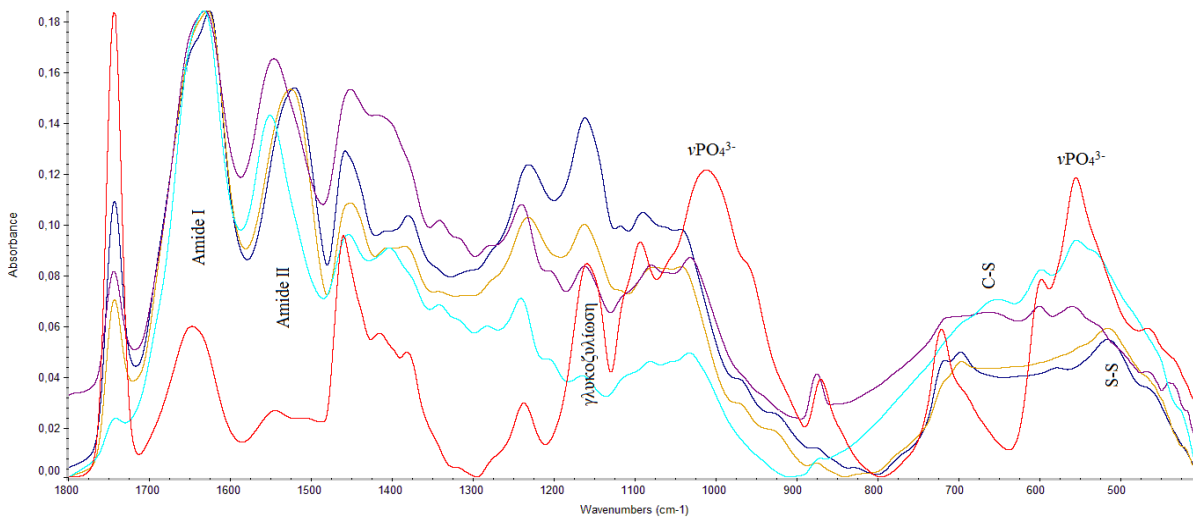
**Σχήμα 6. 30** FT-IR φάσματα *a*: καρκινικού οστού και *b*: υγιούς οστού

Η σύγκριση μεταξύ των φασμάτων δείχνει σημαντικές διαφορές σε όλη την έκταση του φάσματος από 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ . Παρατηρείται στο καρκινικό οστό μείωση των εντάσεων των ταινιών της δόνησης τάσης των ομάδων  $\nu\text{OH}$  του νερού και του υδροξυαπατίτη, στα 3550  $\text{cm}^{-1}$  περίπου, ως προς το υγιές οστό. Η μείωση της έντασης των ταινιών αυτών εξαρτάται από την απασβέστωση (αφαλάτωση) των οστών λόγω της ασθένειας, η οποία τελικά οδηγεί στην οστεόλυση. Η πλατειά ταινία στην περιοχή μεταξύ 3300-3000  $\text{cm}^{-1}$  αποτελείται επίσης από τις ταινίες 3209  $\text{cm}^{-1}$  και 3187  $\text{cm}^{-1}$ , οι οποίες αποδίδονται στις δονήσεις τάσης των  $\nu\text{NH}$  ομάδων. Στα καρκινικά οστά η ταινία από τα 3209  $\text{cm}^{-1}$  μετατοπίζεται προς μεγαλύτερους κυματάρθμους και βρίσκεται στα 3277  $\text{cm}^{-1}$  ενώ η ένταση της δεύτερης ταινίας στα 3187  $\text{cm}^{-1}$  μειώνεται σημαντικά. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι στον μεταστατικό καρκίνο η δομή των πρωτεϊνών μεταβάλλεται από την ασθένεια. Η μετατόπιση προς μεγαλύτερους κυματάρθμους δείχνει την αύξηση των ελευθέρων τερματικών ομάδων  $-\text{NH}_2$  καθώς και την μείωση των ομάδων  $-\text{NH}$  οι οποίες σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου. Η αύξηση του αριθμού των  $\text{NH}_2$  ομάδων δείχνει επίσης ότι η ασθένεια προκαλεί σχάσεις των κλώνων των πρωτεϊνών σε θέσεις πεπτιδικών δεσμών. Η σχάση των κλώνων έχει ως αποτέλεσμα τα θραύσματα των πρωτεϊνών να μη σχηματίζουν πλέον ούτε διαμοριακούς ούτε ενδομοριακούς δεσμούς μέσω δεσμού υδρογόνου. Από τα παραπάνω δεδομένα συμπεραίνεται ότι η απασβέστωση (demineralization) των οστών επηρεάζει την δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών. Δεν μπορεί να απαντηθεί άμεσα αν η απασβέστωση προκαλεί την καταστροφή της δομής των πρωτεϊνών ή αν πρώτα καταστρέφεται η πρωτεΐνη και ακολουθεί η απασβέστωση.

Η αύξηση των εντάσεων των ταινιών των τάσης των μεθυλ και μεθυλενομάδων στην περιοχή  $3000-2850\text{ cm}^{-1}$  του φάσματος των καρκινικών οστών δείχνει επίσης την αύξηση του λιπόφιλου περιβάλλοντος, συνθήκη που συνδέεται με τον σχηματισμό αμυλοειδών πρωτεϊνών.

Η χαρακτηριστική ταινία στα  $1740\text{ cm}^{-1}$ , η οποία όπως προαναφέρθηκε αποδίδεται σε εστερική ομάδα ( $\text{RO-C=O}$ ) των αλδευδών μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως «διαγνωστική ταινία» επισημάνσης του καρκίνου με την υπέρυθη φασματοσκοπία (Κυριακίδου 2014, Anastassopoulou et al, 2014, 2015). Είναι γνωστό ότι οι αλδεύδες αποτελούν δείκτη παρακολούθησης της εξέλιξης του καρκίνου. Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι η υπεροξείδωση των λιπιδίων μπορεί να αποτελεί ένα από τα μονοπάτια ανάπτυξης του καρκίνου στα οστά (Mamarelis et al, 2010, 20011, 2011a, 2016, Dritsa et al 2014, Pissaridi et al 2011). Η υπόθεση αυτή οδηγεί στην παραδοχή ότι απαιτείται ανοσοποιητικού τύπου (μη αντιγονική) διαδικασία για την ανάπτυξη του καρκίνου.

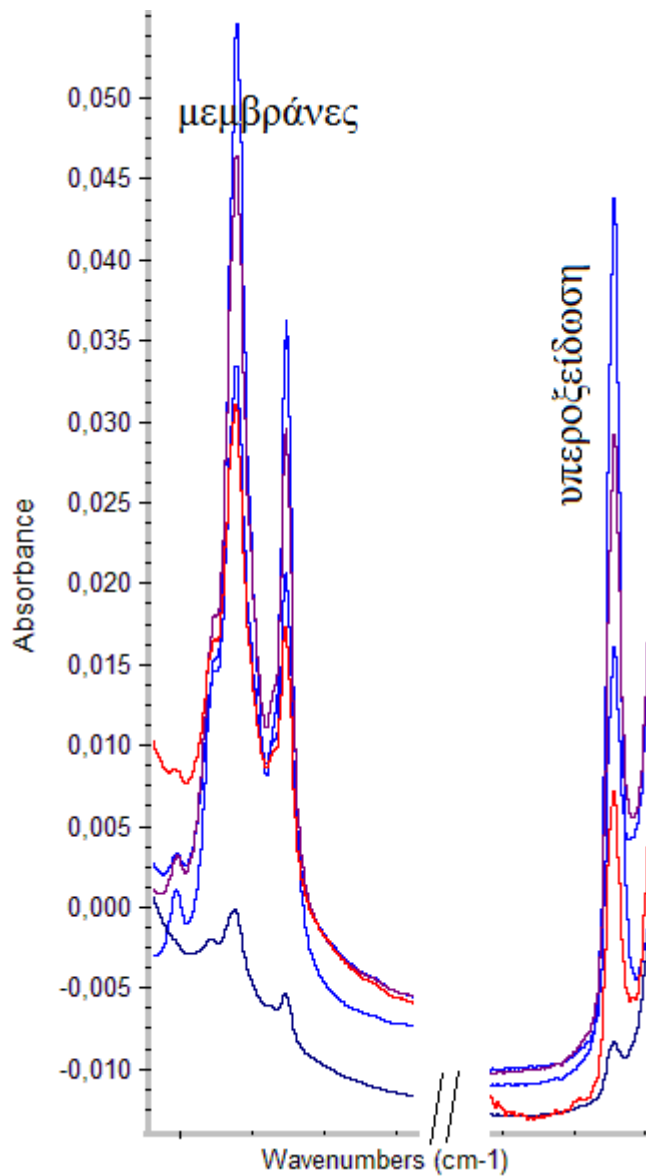
Στο Σχήμα 6.31 δίνονται για σύγκριση με το FT-IR φάσμα καρκινικών οστών με μερικά FT-IR φάσματα από ασθενείς με διαφορετικές ασθένειες



**Σχήμα 6. 31** FT-IR φάσματα από ασθενείς με διαφορετικές ασθένειες

Διαπιστώνεται ότι η ένταση στα  $1743\text{ cm}^{-1}$ , η οποία αποδίδεται στην υπεροξείδωση των λιπιδίων και φωσφολιπιδίων των μεμβρανών εξαρτάται από την ασθένεια και τα κλινικά χαρακτηριστικά του ασθενούς. Στα άτομα όπου το οξειδωτικό στρες για οιονδήποτε λόγο είναι αυξημένο, τότε το φλοιώδες οστό υφίσταται περισσότερες βλάβες. Αυτό οφείλεται στην συνεχή παραγωγή ελευθέρων ριζών οι οποίες οδηγούν τελικά στην εμφάνιση οξείας φλεγμονής η οποία όταν δεν αντιμετωπίζεται υποπίπτει σε χρόνια. Στη συνέχεια παρουσιάζονται δύο υπο-περιοχές του υπέρυθρου φάσματος, οι οποίες φάνηκε να

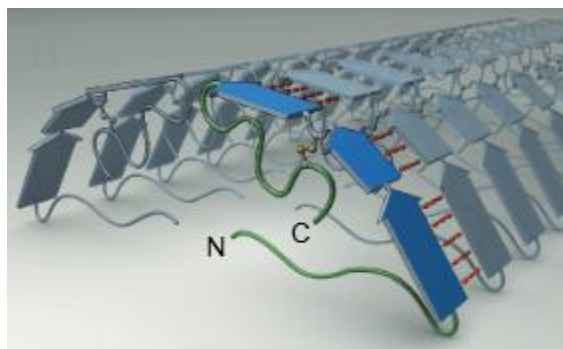
επηρεάζονται από την ασθένεια και το ιατρικό ιστορικό του ασθενούς. Οι υπο-περιοχές περιλαμβάνουν τα φάσματα που εμφανίζονται μεταξύ  $3000-2850\text{ cm}^{-1}$  και  $1800-1700\text{ cm}^{-1}$ ,



**Σχήμα 6. 32** FT-IR φάσματα των περιοχών  $3000-2850\text{ cm}^{-1}$  και  $1800-1700\text{ cm}^{-1}$  όπου εμφανίζονται οι δονήσεις που χαρακτηρίζουν την συμπεριφορά των μεμβρανών και της υπεροξειδωσης, αντίστοιχα.

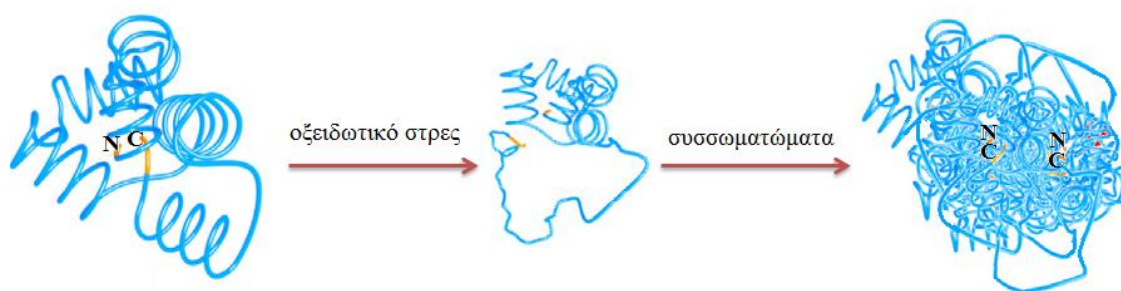
Στις περιοχές αυτές εμφανίζονται οι μεθυλ και μεθυλενομάδες των λιπιδίων των μεμβρανών και αλδευδών, αντίστοιχα. Αυτό έγινε επειδή θέλαμε να επιβεβαιώσουμε ότι η υπεροξειδωση των μεμβρανών οδηγεί και στην αύξηση του λιπόφιλου περιβάλλοντος και επομένως τον σχηματισμό αμυλοειδών πρωτεϊνών. Συνδέοντας τις περιοχές του φάσματος διαπιστώνεται ότι οι αύξεις των εντάσεων είναι ανάλογες. Η αύξηση όμως των ταινιών του φάσματος στην  $3000-2850\text{ cm}^{-1}$  δηλώνει ότι αυξήθηκε το λιπόφιλο περιβάλλον. Η

αύξηση της λιποφιλικότητας συνδέεται, όπως φάνηκε από την μελέτη μας με την δημιουργία των αμυλοειδών πρωτεϊνών. Χαρακτηριστικό των αμυλοειδών πρωτεϊνών είναι η αναστροφή των β-επιπέδων ( $\beta$ -sheets) προς το λιπόφιλο περιβάλλον και τελικά τον σχηματισμό συσσωματώματων.



**Εικόνα 6. 8.** Σχηματική παράσταση των παράλληλων β-επιπέδων τα οποία φέρουν τα υδρόφιλα τμήματα στο εσωτερικό τους (τερματικά N, C)

Στην Εικόνα 6.8 φαίνεται σχηματικά η αναστροφή του λιπόφιλου περιβάλλοντος με τις υδρόφιλες τερματικές ομάδες NH και C=O των πρωτεϊνών προς το εσωτερικό. Λόγω του αυξημένου λιπόφιλου περιβάλλοντος αναγκάζονται οι πρωτεΐνες να σχηματίσουν συσσωματώματα. Στο Σχήμα 6.33 δίνονται σχηματικά τα βήματα σχηματισμού των συσσωματωμάτων



**Σχήμα 6. 33** Σχηματική παράσταση της επίδρασης του οξειδωτικού στρες στην παραγωγή συσσωματωμάτων

Ο σχηματισμός δεν είναι τόσο απλός, αλλά όπως έδειξαν τα υπέρυθρα φάσματα των ασθενών, φαίνεται να αρχίζει με την χάλαση των δεσμών υδρογόνου οι οποίοι συγκρατούν τις έλικες και στη συνέχεια την συσσωμάτωση. Στα συσσωματώματα αυτά, τα οποία φάνηκαν αυξημένα στα καρκινικά οστά αποδίδουμε την μη επίδραση της θεραπείας και της ραδιοθεραπείας.

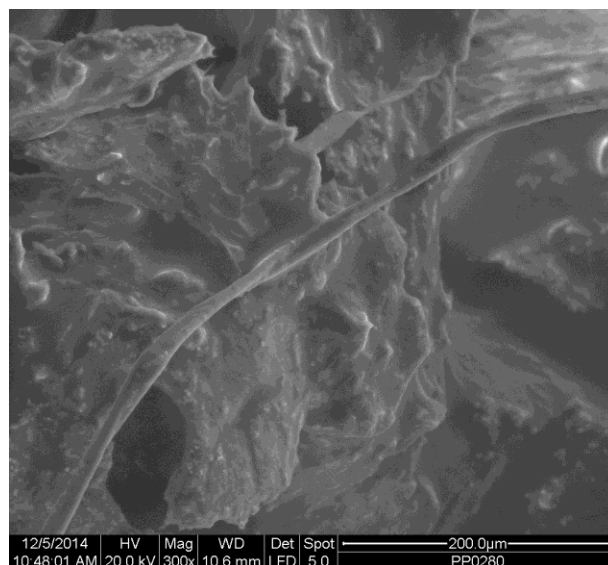
Ο σχηματισμός αμυλοειδών πρωτεϊνών φαίνεται να είναι ένα από τα αίτια

παρεμπόδισης των μηχανισμών του οργανισμού να επαναφέρει στην φυσιολογική δομή. Υπέρ της άποψης αυτής συνηγορεί η εμφάνιση στα φάσματα της ταινίας των δισουλφιδικών δεσμών. Οι ταινίες αυτές εμφανίζονται σε όλα τα μέχρι σήμερα καρκινικά οστά τα οποία μελετήσαμε.

Η έναρξης της βλάβης του υδροξυαπατίτη και η επακόλουθη οστεόλυση διαπιστώνεται ότι αρχίζει με την καταστροφή της διαμόρφωσης της α-έλικας, κυρίως του κολλαγόνου. Η αύξηση των ταινιών της γλυκοζυλίωσης εξαρτάται από το στάδιο του καρκίνου. Η γλυκοζυλίωση όμως είναι έντονη και στις βλάβες των χόνδρων των οστών, χωρίς να υπάρχει απαραίτητα καρκίνος. Οι βλάβες αυτές αποδίδονται και πάλι στην επίδραση του οξειδωτικού στρες, το οποίο οδηγεί στη γήρανση των χόνδρων. Το φαινόμενο είναι πιο έντονο στην περίπτωση της αρθρίτιδας του γόνατος.

## 6.9 SEM-EDX ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΟΣΤΩΝ

Στην Εικόνα 6.9 φαίνεται η μορφολογία του οστού ασθενούς με συγγενές εξάρθημα του ισχίου, όπως απεικονίσθηκε με SEM ανάλυση. Παρατηρούνται οι πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν χάσει την φυσιολογική μορφολογία τους.

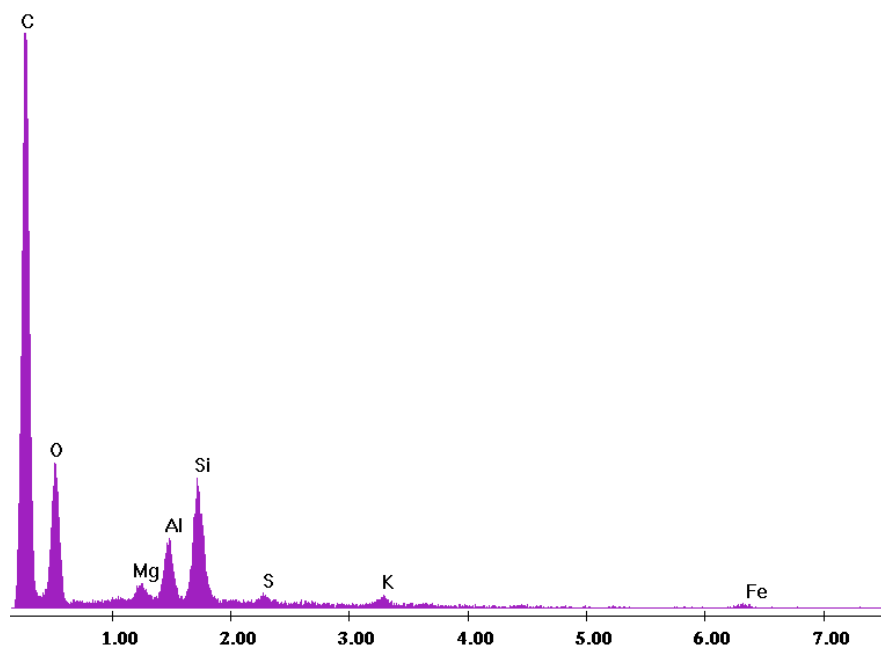


**Εικόνα 6. 9** SEM απεικόνιση της μορφολογίας του οστού ασθενούς με συγγενές εξάρθημα του ισχίου

Από το ιστορικό της ασθενούς έγινε γνωστό ότι είχε στο παρελθόν είχε αφαιρέσει μόρφωμα του μαστού. Η EDX ανάλυση, όπως φαίνεται στο γράφημα του Σχήματος 5.34



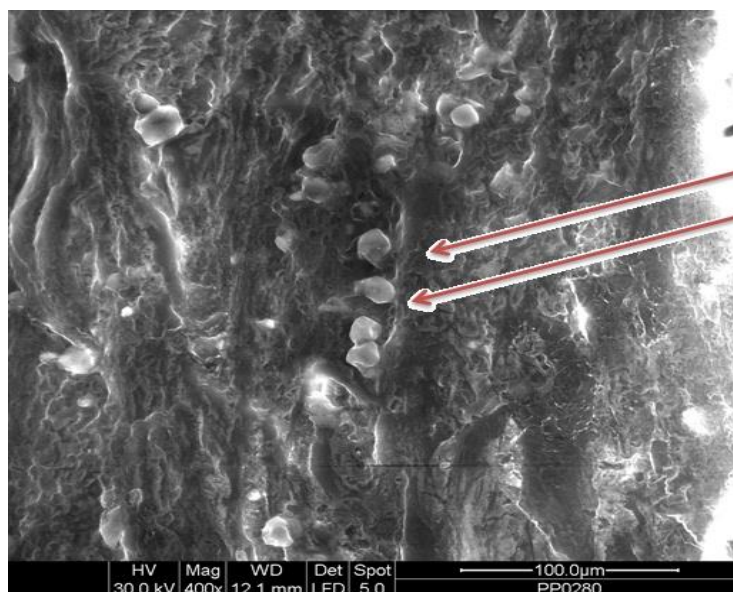
έδειξε μετανάστευση του πυριτίου (Si) στη θέση της βλάβης.



**Σχήμα 6. 34** SEM-EDX ανάλυση οστού από ασθενή με συγγενές εξάρθρημα. Ανιχνεύονται τα στοιχεία Mg, Al και Si, συστατικά σιλικόνης από εμφύτευμα.

Το ίδιο είχε βρεθεί και σε μεταστατικό καρκίνο του μαστού από πρωτογενή καρκίνο του μαστού και η ασθενής είχε εμφύτευμα σιλικόνης (Κυριακίδου 2014).

Ανάλυση καρκινικού οστού με SEM μικροσκόπιο έδειξε σημαντικές μεταβολές της μορφολογίας του καρκινικού οστού (Εικόνα 6.10).

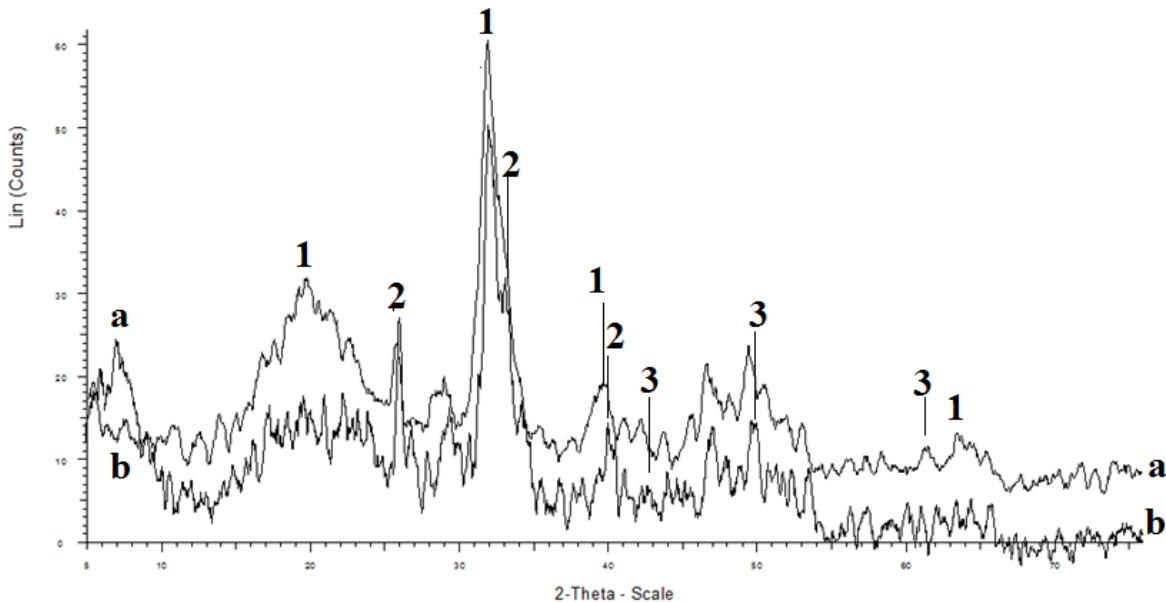


**Εικόνα 6. 10** SEM απεικόνιση οστού ασθενούς με μετάσταση από πρωτοπαθή εστία μαστού. Τα βέλη δείχνουν τα συσσωματώματα των αμυλοειδούς τύπου πρωτεϊνών (Kyriakidou et al 2016)



## 6.10 XRD ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΟΣΤΩΝ

Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε τα αποτελέσματα της υπέρυθρης φασματοσκοπίας και SEM ανάλυσης προβήκαμε σε XRD (X Ray Diffraction) ανάλυση της κρυσταλλικής δομής των καρκινικών οστών. Στο Σχήμα 6.35 δίνεται το XRD φάσμα σπογγώδους μοίρας καρκινικού οστού και για σύγκριση του βιολογικού υδροξυαπατίτη.



**6.35** XRD διαγράμματα *a*; σπογγώδους οστού από βραχίονα ασθενούς με μεταστατικό καρκίνο των οστών από πρωτοπαθή εστία μαστού και *b*; Υδροξυαπατίτης. 1:βιολογικός υδροξυαπατίτης  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ , 2; ανόργανος απατίτης  $[Ca_5(PO_4)_3OH]$  και 3; όξινο φωσφορικό ασβέστιο  $CaHPO_4$ .

Από την σύγκριση φαίνεται ότι στο οστό υπάρχει βιολογικός υδροξυαπατίτης μικρής κρυσταλλικότητας. Στο συμπέρασμα αυτό οδηγούμαστε λόγω της πλατειάς ταινίας περίπου στα  $2\theta=20$  η οποία αντιστοιχεί στο κολλαγόνο, ενώ ανιχνεύεται δομή ανόργανου απατίτη και αλάτων  $CaHPO_4$ , σε συμφωνία με τα φαστοσκοσκοπικά μας δεδομένα και την βιβλιογραφία. Η πλατειά ταινία, στο  $2\theta=20$  δείχνει την επικράτηση του κολλαγόνου, επιβεβαιώνοντας κρατούσα οστεοπενία, λόγω της ασθένειας. Το σημαντικότερο εύρημα είναι η μείωση του μεγέθους των κρυστάλλων του βιολογικού απατίτη.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η υπέρυθη φασματοσκοπία με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) έδειξε ότι οι ασθένειες επηρεάζουν σημαντικά την μοριακή δομή των συστατικών των οστών. Η επίδραση φάνηκε να εξαρτάται από το στάδιο της ασθένειας και την κλινική κατάσταση του ασθενούς.

Στην περιοχή του φάσματος από  $4000-2850\text{ cm}^{-1}$ , όπου εμφανίζονται οι απορροφήσεις των δονήσεων τάσης των ταινιών των  $\nu\text{OH}$ ,  $\nu\text{NH}$  των ομάδων του νερού των κυττάρων, των υδροξυλίων του υδροξυαπατίτη και των αμινομάδων των πρωτεϊνών διαπιστώθηκε ότι οι ταινίες μειώνουν την έντασή τους ή μετατοπίζονται προς άλλες συχνότητες. Συμπεραίνεται ότι οι ασθένειες προκαλούν τόσο την σχάση των δεσμών υδρογόνου, οι οποίοι συγκρατούν τις έλικες των πρωτεϊνών στην φυσιολογική διαμόρφωση της  $\alpha$ -έλικας, αλλά και τις ίδιες τις έλικες.

Στην ίδια περιοχή εμφανίζονται και οι ταινίες απορρόφησης των δονήσεων τάσης των μεθυλ ( $\nu\text{CH}_3$ ) και μεθυλεν ( $\nu\text{CH}_2$ ) ομάδων των λιπιδίων και φωσφολιπιδίων των μεμβρανών των κυττάρων. Διαπιστώθηκε ότι η ένταση των ταινιών αυξάνει. Η αύξηση αυτή αποδίδεται στην μεταβολή του λιπόφιλου περιβάλλοντος των μεμβρανών, ως αποτέλεσμα της σχάσης των ανθρακικών αλυσίδων και την υπεροξειδωση των μεμβρανών.

Στην περιοχή του φάσματος από  $1800$  μέχρι  $1300\text{ cm}^{-1}$  λαμβάνουμε πληροφορίες σχετικά με την συμπεριφορά της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών. Διαπιστώθηκε ότι μετά την ακτινοβολία περίπου στα  $1743\text{ cm}^{-1}$  εμφανίζεται μία νέα ταινία, της οποίας η ένταση εξαρτάται από την ασθένεια και το στάδιο εξέλιξης. Η ταινία αυτή αποδίδεται στην υπεροξειδωση των λιπιδίων και φωσφολιπιδίων των μεμβρανών. Η ταινία οφείλεται στην παραγωγή μαλοδιαλδεύδης (ή διπλής αλδεύδης,  $\text{O}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{O}$  ένα προϊόν το οποίο αποτελεί δείκτη της πορείας της καρκινογένεσης.

Η μετατόπιση των ταινιών των Amide I και Amide II του κολλαγόνου και των κολλαγονούχων πρωτεϊνών προς μικρότερους κυματάρθμους οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ασθένεια μεταβάλλει την διαμόρφωση των πρωτεϊνών από  $\alpha$ -έλικα σε τυχαία διαμόρφωση. Η τυχαία διάταξη των πρωτεϊνών διευκολύνει στη συνέχεια την περαιτέρω αντίδραση με τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται από το οξειδωτικό στρες με αποτέλεσμα την σχάση των αλυσίδων. Τα παραγόμενα θραύσματα πολυμερίζονται σχηματίζοντας αμυλοειδούς τύπου πρωτεΐνες. Οι ταινίες αυτές είναι σε συμφωνία με τις αντίστοιχες

μεταβολές της περιοχής του φάσματος  $3000-2850\text{ cm}^{-1}$ .

Από τις νέες ταινίες στην περιοχή του φάσματος  $1300-900\text{ cm}^{-1}$  όπου εμφανίζονται οι ταινίες που αποτελούν τα «δακτυλικά αποτυπώματα» των γλυκοζαμινών και του υδροξυαπατίτη των οστών. Οι μεγαλύτερες βλάβες παρατηρήθηκαν στους χόνδρους των οστών και ιδιαίτερα σε αρθρίτιδες του γόνατος. Στις περισσότερες ασθένειες ο υδροξυαπατίτης χάνει τα χαρακτηριστικά του βιολογικού απατίτη και γίνεται ανόργανος. Στην κρυσταλλικότητα των φωσφορικών αλάτων αποδίδεται και η μείωση της αντοχής των οστών.

Η SEM και οπτική ανάλυση της αρχιτεκτονικής των οστών επιβεβαίωσε τις μεταβολές οι οποίες προκλήθηκαν από τις ασθένειες. Χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ImageJ η ανάλυση εικόνας έδειξε τον σχηματισμό διακλαδούμενων και διασταυρούμενων πολυμερισμών.

## ΠΡΟΠΤΙΚΕΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Από τα ενδιαφέροντα ευρήματα της FT-IR φασματοσκοπίας φαίνεται ότι οι ασθένειες προκαλούν βλάβες στην διαμόρφωση των οστών, οι οποίες συνδέονται με το οξειδωτικό στρες. Αν και τα περιστατικά δεν είναι αρκετά για κάθε ασθένεια, όμως διαπιστώνεται ότι η έρευνα θα πρέπει να εστιαστεί σε ασθένειες όπως η έκτοπη οστεοποίηση, η αγκυλοποιητική σπονδυλαρθρίτιδα και η αρθρίτιδα από την ψωρίαση, όπου ο μηχανισμός δεν είναι απόλυτα σαφής.

Οι πληροφορίες θα συμβάλλουν σημαντικά στην ανάπτυξη φαρμάκων τα οποία θα παρεμποδίσουν την καταστροφή που προκαλεί το οξειδωτικό στρες, που φάνηκε έντονο σε μερικές ασθένειες, όπως η δυσπλασία. Στην περίπτωση αυτή η τριβή των μη επάλληλων επιφανειών με ενδιάμεση παρεμβολή του πάσχοντος παχυσμένου θυλάκου αυξάνει το αποτέλεσμα του οξειδωτικού στρες.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aerssens J, Dequeker J, Mbuyi-Muamba JM. Bone tissue composition: biochemical anatomy of bone. *Clin Rheumatol* 1994; 13 Suppl 1: 54-62.
- Aldridge JM, 3rd, Urbaniak JR. Avascular necrosis of the femoral head: etiology, pathophysiology, classification, and current treatment guidelines. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)* 2004; 33: 327-332.
- Anastassopoulou J, Theophanides T. (1990). Raman studies of model vesicle systems”, *J. Appl. Spectrosc.* 44, 523.
- Anastassopoulou J, Kolovou P, Pantzayia A. (2005) Micro-FT-IR Spectroscopy of Irradiated Human bones, 1<sup>st</sup> DASIM workshop, 19-20 July, Daresbury, Warrington, UK
- Anastassopoulou J, Kolovou P, Mavrogenis A. (2008). Bone and Cancer. A synchrotron micro- infrared study, in *Metal Ions Biol Medic*, , Eds. Ph Collery, I. Maynard, T. Theophanides, L. Khassanova, T. Collery, John Libbey, Eurotext, Vo10; 210-213.
- Anastassopoulou J., Kyriakidou M., Kyriazis S., Dritsa V., Kormas T.(2014) Protein folding and cancer, *Anticancer Res*, 34/10, 5806-5709,
- Anastassopoulou J, Kyriakidou M, Kyriazis S, Kormas TH, Mavrogenis AF, Dritsa V, Kolovou P, Theophanides T. (2015) An FT-IR 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, Chapt. 5, pp 89-100.
- Assouline-Dayana Y, Chang C, Greenspan A, Shoenfeld Y, Gershwin ME.(2002) Pathogenesis and natural history of osteonecrosis. *Semin Arthritis Rheum* 32: 94-124.
- Babis GC, Sakellariou V, Parvizi J, Soucacos P. (2011). Osteonecrosis of the femoral head. *Orthopedics.* 34: 39.
- Bellamy JL. (1975). *The infrared spectroscopy of complex molecules*, 3<sup>rd</sup> Edition, Chapman and Hall, London, 1975.
- Bonewald LF. (2011). The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res* 26: 229-238.  
boneresearchsociety.org.
- Brochmann E. J., Duarte M. E., Zaidi H. A., Murray S. S.(2003) Effects of Dietary Restriction on Total Body, Femoral, and Vertebral Bone in SENCAR, C57BL/6, and DBA/2 Mice , *Metabolism*, 52/10, 1265-1273.
- Bronner F. (1992). Bone and calcium homeostasis. *Neurotoxicology.* 13: 775-782.
- Brooker AF, Bowerman JW, Robinson RA, Riley LH, Jr. Ectopic ossification following total hip replacement. Incidence and a method of classification. *J Bone Joint Surg Am* 1973; 55: 1629-1632.
- Buckwalter JA, Cooper RR. (1987). Bone structure and function. *Instr Course Lect.* 36: 27-48.
- Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. (1996). Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instr Course Lect* 45: 371-386.
- Buck DW 2nd, Dumanian GA. (2012). Bone biology and physiology: Part I. The

fundamentals. *Plast Reconstr Surg* 129: 1314-1320.

- Clarke B. Normal bone anatomy and physiology.(2008). *Clin J Am Soc Nephrol* 3 Suppl 3: S131-139.
- Colomb-Lippa D.(2014). Avascular necrosis of the femoral head. *JAAPA*. 27: 40-41.
- Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS.(2008). The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol*. 61: 577-587.
- Del Fattore A, Teti A, Rucci N. (2012). Bone cells and the mechanisms of bone remodelling. *Front Biosci (Elite Ed)* 4: 2302-2321.
- Dritsa V., Pissaridi K., Koutoulakis E., Mamarelis I., Kotoulas C., Anastassopoulou J. (2015) An Infrared spectroscopic study of aortic valve. A possible mechanism of calcification and the role of magnesium salts”, *In Vivo*, 84, 91-98
- El Feki, C. Vignoles R.M.. (1991) Carbonate ions in apatites: infrared investigations in the  $\nu_4\text{CO}_3$  domain. *Calc. Tissue Int.*, 49 269-274
- Hartofilakidis G, Babis GC. Congenital disease of the hip. *Clin Orthop Relat Res* 2009; 467: 578-579; discussion 580-571.
- Hartofilakidis G, Karachalios T, Stamos KG. Epidemiology, demographics, and natural history of congenital hip disease in adults. *Orthopedics* 2000; 23: 823-827.
- Hartofilakidis G, Stamos K, Karachalios T, Ioannidis TT, Zacharakis N. Congenital hip disease in adults. Classification of acetabular deficiencies and operative treatment with acetabuloplasty combined with total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 1996; 78: 683-692.
- Hartofilakidis G, Babis GC, Lampropoulou-Adamidou K, Vlamis J. Results of total hip arthroplasty differ in subtypes of high dislocation. *Clin Orthop Relat Res* 2013; 471: 2972-2979.
- Hartofilakidis G, Karachalios T, Georgiades G, Kourlaba G. Total hip arthroplasty in patients with high dislocation: a concise follow-up, at a minimum of fifteen years, of previous reports. *J Bone Joint Surg Am* 2011; 93: 1614-1618.
- Hartofilakidis G, Karachalios T. Total hip arthroplasty for congenital hip disease. *J Bone Joint Surg Am* 2004; 86-A: 242-250.
- Hartofilakidis G, Stamos K, Karachalios T. Treatment of high dislocation of the hip in adults with total hip arthroplasty. Operative technique and long-term clinical results. *J Bone Joint Surg Am* 1998; 80: 510-517.
- Hartofilakidis G, Babis GC, Georgiades G, Kourlaba G. Trochanteric osteotomy in total hip replacement for congenital hip disease. *J Bone Joint Surg Br* 2011; 93: 601-607.
- Hartofilakidis G, Stamos K, Ioannidis TT. Rotational acetabular osteotomy for severe dysplasia of the hip. *J Bone Joint Surg Br* 1997; 79: 510.
- Herndon JH, Aufranc OE. (1972). Avascular necrosis of the femoral head in the adult. A review of its incidence in a variety of conditions. *Clin Orthop Relat Res*. 86: 43-62.
- Hingham MA . (1984). U.S.A.: D. Reidel ; Sold and distributed in the U.S.A. and Canada by Kluwer Academic Publishers;
- Jawien J. (2008) New insights into immunological aspects of atherosclerosis. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnetrznej*. 118(3), 127-130,
- Jones C. M., Lawrence A., Wardman P., Burkitt M. J., Electron paramagnetic resonance spin trapping Investigation into the kinetics of glutathione oxidation by the

superoxide radical: re-evaluation of the rate constant, *Free Radical Bio Med*, 32/10 (2002) 982–990

- Jungueria C L., Carneiro J, Kelley R O., (1989) Basic Histology, 6<sup>th</sup> Edition APPLETON & LANGE Norwalk, Connecticut/SanMateo, California Μετάφραση–Επιμέλεια. Οικονομόπουλος, Αθήνα, σελ. 185.
- Kang JS, Moon KH, Kwon DG, Shin BK, Woo MS. (2013). The natural history of asymptomatic osteonecrosis of the femoral head. *Int Orthop*. 37: 379-384.
- Koch M., Bohrmann B., Matthison M., Hagios C., Trueb B. Chiquet M. (1995) Large and small splite variants of collagene XII: differential expression and ligand bindingm J, *Cell BioloGy*, 130 1005-1014.
- Kolovou P, Anastassopoulou J. (2007). Synchrotron FT-IR spectroscopy of human bones. The effect of aging. *Brilliant Light in Life and Material Sciences*, Eds. V. Tsakanov and H. Wiedemann, Springer, pp. 267-272,
- Kolovou P, Anastassopoulou J. (2004). The influence of gamma rays on the molecularbone structure. A synchrotron FT-IR study. Recent progress and future perspectives. In: *Infrared Microscopy and Spectroscopy with advanced light sources*, Triest, Italy, p. 28-30.
- Koulouvaris P, Tsailas P, Tsiavos K, Soucacos PN. (1010). Clinical observations on surgical details of resection of heterotopic ossification at the hip in traumatic brain-injured adult. *J Surg Orthop Adv*.19: 177-180.
- Kyriakidou M. Mavrogenis AF., Kyriazis S., Markouizou A., Theophanides T., Anastassopoulou J. (2016) An FT-IR spectral analysis of the effects of  $\gamma$ -radiation on normal and cancerous cartilage *In Vivo*, 30(5) 599-604
- Leventouri T. (2006) Synthetic and biological hydroxyapatites: crystal structure questions. *Biomaterials* 27: 3339-3342.
- Macfarlane RJ, Ng BH, Gamie Z, El Masry MA, Velonis S, Schizas C, et al. (2008). Pharmacological treatment of heterotopic ossification following hip and acetabular surgery. *Expert Opin Pharmacother*. 9: 767-786.
- Malizos KN, Karantanas AH, Varitimidis SE, Dailiana ZH, Bargiotas K, Maris T. (2007). Osteonecrosis of the femoral head: etiology, imaging and treatment. *Eur J Radiol*. 63: 16-28.
- Mamarelis I, Pissaridi K., Dritsa V., Kotileas P., Tsiligiris V., Anastassopoulou J. (2010). Oxidative stress and atherogenesis. An FT-IR spectroscopic study, *In Vivo*, 24 883-888.
- Mamarelis I, Pissaridi K, Dritsa V, Koutoulakis E, Cotoulas C, Kotileas P, Tsiligiris V, Tzilalis V, Xaplanteris P, Lazaridis K, Anastassopoulou J. (2011) The effect of molybdenoenzymes on atherosclerotic hyperuricaemic patients, In *Coronary Artery Disease: 2011 Update: from Prevention to intervention* (Eds. B S. Lewis, M Y. Flugelman, D A. Halon) MEDIMOND, International Proceedings, *monduzzi editore*, Bologna, Italy, pp. 83-91
- Mamarelis I, Kotoulas Chr., Tsiligiris V, Tzilalis V, Pissaridi K, Dritsa V, Anastassopoulou J. (2011a), The role of free radicals on hyperoxidation of coronary and carotid arteries, In: *Current research in cardiothoracic surgery in Greece*, Ed. D. Dougenis, University of Patras, Patra, pp 69-73, awarded papers



- Mammarelis I, Koutoulaki E, Kotoulas C, Dritsa V, Mammareli V, Pissaridi K, Kyriakidou M, Anastassopoulou J. Amyloid like formation and aortic valve calcification promoted by oxidative stress. *Hellenic J Atherosclerosis*, 7(2) 84-96, 2016
- Marks SC, Jr., Popoff SN. (1988). Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. *Am J Anat* 183: 1-44.
- Marotti G. (1996). The structure of bone tissues and the cellular control of their deposition. *Ital J Anat Embryol.* 101: 25-79.
- Mavrogenis A F, Soucacos P, Papagelopoulos P J. (2011), Heterotopic Ossification Revisited, *Orthopedics* 34; 177-186. ORTHOSuperSite.com
- McCarthy EF, Sundaram M. Heterotopic ossification: a review. *Skeletal Radiol* 2005; 34: 609-619.
- McMullan D. Scanning electron microscope 1928-1965. *Scanning* 2006; 17: 175-185.
- Mont MA, Jones LC, Hungerford DS. Nontraumatic osteonecrosis of the femoral head: ten years later. *J Bone Joint Surg Am* 2006; 88: 1117-1132.
- Microanatomy Web Atlas <http://microanatomy.net/>.
- Nyquist R. A, Kagel R. O. (1971) *Infrared spectra of inorganic compounds*, Academic Press, New York.
- Okazaki M. (1983). F-CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> interaction in IR spectra of fluoridated CO<sub>3</sub>-apatites, *Calc. Tissue Int*, 35; 78-81
- Oni OO, Gregg PJ. (1990). The relative contribution of individual osseous circulations to diaphyseal cortical blood supply. *J Orthop Trauma.* 4: 441-448.
- Pissaridi K, Dritsa V, Mamarelis I, Koutoulakis E, Kotulas Ch, Anastassopoulou J. (2011), The role of molybdenum on atheromatic plaque formation, *Metal Ions in Biology and Medicine*, 11; 219-224.
- Petra M, Anastassopoulou J, Dovas A, Yfantis D, Theophanides T. (2000) Aging of human bones. An infrared study, *Metal Ion Biol. Med.* 6, 736
- Petra M., Anastassopoulou J., Theologis T., Theophanides T.(2005) Synchrotron micro-FT-IR spectroscopic evaluation of normal paediatric human bone, *J. Mol Structure*, 78;101
- Pissaridi K., Dritsa V., Anastassopoulou J, Koutoulakis E, Mamarelis I, Kotoulas Chr, (2013) Aortic valve calcification—the role of inflammation and fibrosis, *J Cardiothoracic Surgery*, Vo8/sup.1,032.
- Popovic M, Agarwal A, Zhang L, Yip C, Kreder HJ, Nousiainen MT, *et al.* (2014). Radiotherapy for the prophylaxis of heterotopic ossification: a systematic review and meta-analysis of published data. *Radiother Oncol.* 113; 10-17.
- Rajpura A, Wright AC, Board TN. (2011). Medical management of osteonecrosis of the hip: a review. *Hip Int.* 21;385-392.
- Rochefort GY, Pallu S, Benhamou CL.( 2010 ) Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporos Int.* 21; 1457-1469.
- Sandorfy C, Theophanides TM. (1984) *Spectroscopy of biological molecules : theory and applications--chemistry, physics, biology, and medicine.* Dordrecht ; Boston Hingham, MA, U.S.A. D. Reidel Pub. Co. ; Sold and distributed in the U.S.A. and Canada by Kluwer Academic Publishers.
- Shier D., Butler J., Leulis R. (1999). *Hole's Human Anatomy and Physiology*, McGRAW-



Hill.

- Shim SS. (1968). Physiology of blood circulation of bone. *J Bone Joint Surg Am.* 50: 812-824.
- Smith K, Oatley C. (1955) The scanning electron microscope and its fields of application. *British Journal of Applied Physics.* 6; 391-399.
- Stevens A, Lowe J. (1993). *Histology*, ed Mosby 1993, Year Book Europe Limited Μετάφραση –Επιμέλεια Χ.Κίττας, σελ. 233
- Spinks J W T, Woods R J. (1990) *An Introduction to Radiation Chemistry*, Third Edition, John-Wiley and Sons, Inc., New York, Toronto
- Strachan RK, McCarthy I, Fleming R, Hughes SP. (1990). The role of the tibial nutrient artery. Microsphere estimation of blood flow in the osteotomised canine tibia. *J Bone Joint Surg Br.* 72: 391-394.
- Sullivan MP, Torres SJ, Mehta S, Ahn J. (2013). Heterotopic ossification after central nervous system trauma: A current review. *Bone Joint Res.*2: 51-57.
- Suzuki E. High-resolution scanning electron microscopy of immunogold-labelled cells by the use of thin plasma coating of osmium. *J Microscopy* 2002; 208: 153-157.
- Teti A. Bone development: overview of bone cells and signaling. (2011) *Curr Osteoporos Rep* 9: 264-273.
- Theophanides T, Anastassopoulou J. (2002). Copper and carcinogenesis, *Crit Rev Oncology and Heamatology*, *Crit Rev Oncology and Heamatology*, 42, 57-64.
- Theophanides TM, (1984). *Fourier transform infrared spectroscopy: industrial chemical and biochemical applications.* Dordrecht, Holland ; Boston
- Theophanides T. (1978). *Infrared and Raman Spectra of Biological Molecules*”, NATO Advanced Study Institute, D. Reidel Publishing Co. Dodrecht, The Netherlands
- Theophanides T. (1984). *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, D. Reidel Publishing Co. Dodrecht.
- Theophanides T. (2012a) *Infrared Spectroscopy-Life and Biomedical Science*, InTech, Europa.
- Μιχαήλ Σ.Γ. (1991) *ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ* Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη 1991
- Αναστασοπούλου Ι, Θεοφανίδης Θ. *Βιοϋλικά, Χημικός Δεσμός Δότη-Δέκτη*, Αθήνα, ΕΜΠ; 2008.
- Αναστασοπούλου Ι, Θεοφανίδης Θ, Δρίτσα Β, Υφαντής Δ, Υφαντής Κ. (2015) *Βιοϋλικά - Εφαρμογές, Ελληνικά Ακαδημαϊκά Ηλεκτρονικά Συγγράμματα και Βοηθήματα, Κάλλιπος,*
- Κολοβού Π. (2009) *Επίδραση των ακτινοβολιών στην γήρανση των οστών - Ο ρόλος των ελευθέρων ριζών*, Διδακτορική διατριβή, ΕΜΠ
- Κολοβού Π, Ντόβας Α, Ευσταθίου Π, Αναστασοπούλου Ι. (2003). Μελέτη της επίδρασης των ακτινοβολιών στο κολλαγόνο και στην οστική συνοχή οστού με φασματοσκοπία FT-IR, *Οστούν.* 14, 68
- Κουτουλάκης Ε. (2014). *Μελέτη των επιδράσεων των ελευθέρων ριζών στη μοριακή διαμόρφωση του κοιλιακού μυοκαρδίου με φασματοσκοπικές μεθόδους.* Διδακτορική διατριβή, ΕΜΠ

- Κυριακίδου Μ. (2014) Φασματοσκοπική μελέτη καρκινικών οστών, Διδακτορική διατριβή, ΕΜΠ
- Μαμαρέλης Ι. (2010) Φασματοσκοπική μελέτη μηχανισμού της αθηρωματικής πλάκας, Διδακτορική διατριβή, ΕΜΠ
- Πισσαρίδη Α.(2012) Φασματοσκοπική μελέτη ιστών και βιοϋλικών, Διδακτορική διατριβή, ΕΜΠ
- Πετρά Μ., (2003) Μελέτη της εξέλιξης και γήρανσης των οστών με υπέρυθη και μικρο-υπέρυθη φασματοσκοπία. Σύγκριση με παθολογικά οστά και υποκατάστατα οστών. Διδακτορική διατριβή, ΕΜΠ

## ΓΛΩΣΣΑΡΙΟ

$\alpha/\alpha$	: απλή ακτινογραφία
ATR (Attenuated Total Reflectance):	: αποβαίνουσα ολική ανάκλαση
$\beta$ -pleated sheet	: $\beta$ -πτυχωτή επιφάνεια
backscattered electrons, BES	: επανασκεδαζόμενα ηλεκτρόνια
beam splitter	: διαχωριστής δέσμης
bending or scissoring vibrations	: δονήσεις κάμψης ή ψαλλίδισης
bone cells	: οστικά κύτταρα
Bone mineral	: ανόργανη οστική φάση
bone matrix	:θεμέλια ουσία
branch polymerization	: διακλαδούμενος πολυμερισμός
calorific rays	: θερμικές ακτίνες (ακτίνες υπερύθρου φωτός)
chopper	: διαιρέτης δέσμης
crosslinking	δασταυρούμενος πολυμερισμός
deconvolution	: λεπτομερέστερη (μαθηματική) ανάλυση
demineralization	: αφαλάτωση
diffraction	: περίθλαση
diffracted backscattered electrons	:ανασκεδαζόμενα ηλεκτρόνια
dispersive spectrometers	: φασματοφωτόμετρα διασποράς
effective	: αποτελεσματικό
electron storage ring	: δακτύλιος αποθήκευσης ηλεκτρονίων
finger print	: περιοχή του IR φάσματος που χαρακτηρίζεται “δακτυλικό αποτύπωμα” μίας ένωσης.
Fourier Transform Infrared FT-IR	: φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier
fixed Mirror	:σταθερό κάτοπτρο
Image analysis software	: λογισμικό πρόγραμμα ανάλυσης της Εικόνας
Interferogram	: συμβολογράφημα
Infrared – IR	: υπέρυθη ακτινοβολία

in-plane	: εντός επιπέδου
IR-active	: ενώσεις ενεργές στο υπέρυθρο φως
IR-inactive	: ενώσεις μη ενεργές στο υπέρυθρο φως
matrix	:θεμέλια ουσία
mineralized	: επιμετάλλωση
moving mirror	: κινούμενο κάτοπτρο
MRI, MagneticResonance Imaging	: Μαγνητική τομογραφία
normal vibrations or normal modes	: Κανονικές δονήσεις
non dispersive spectrometers	: φασματοφωτόμετρα μη διασποράς
osteocytes	: οστεοκύτταρα
out-of-plane	: εκτός επιπέδου
platelet-derived growth factor	αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας
prooxidants	: προοξειδωτικά
reactive oxygen species,	: δραστικά σωματίδια οξυγόνου
resolution	: διακριτική ικανότητα
rocking vibrations	: δονήσεις αιώρησης
secondary electrons	: δευτερογενή ηλεκτρόνια
SEM (Scanning Electron Microscope)	: ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης
software	: λογισμικό πρόγραμμα
ssb, single strand break	: απλή σχάση της μίας έλικας
stem cells	: αδιαφοροποίητα μεσεγχυματικά κύτταρα
stretching vibrations	: δονήσεις τάσης
synchrotron	: σύγχροτρον
transmission/ reflection	: μετάδοση/αντανάκλασης
turn	: στροφή
twisting vibrations	: δονήσεις συστροφής
wagging vibrations	: δονήσεις σείσης
wave-lengths	: μήκη κύματος

