



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ: ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΤΟΜΑΤΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΟΝ ΚΟΝΔΥΛΟ ΤΗΣ ΚΑΤΩ ΓΝΑΘΟΥ ΩΘΗΚΕΚΤΟΜΗΜΕΝΩΝ ΜΥΩΝ

Κωνσταντίνα Χατζηδημητρίου - Οδοντίατρος - Υπότροφος Ι.Κ.Υ

Αθήνα, 2015

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΟΔΟΝΤΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ: ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΤΟΜΑΤΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΤΟΝ ΚΟΝΔΥΛΟ
ΤΗΣ ΚΑΤΩ ΓΝΑΘΟΥ ΩΟΘΗΚΕΚΤΟΜΗΜΕΝΩΝ ΜΥΩΝ**

Κωνσταντίνα Χατζηδημητρίου – Οδοντίατρος - Υπότροφος Ι.Κ.Υ

Αθήνα, 2015

Επιβλέπων Καθηγητής για την εκπόνηση της Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας: κ. Κιτράκη Ευθυμία

Τριμελής Επιτροπή για την αξιολόγηση της Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας:

1. Κιτράκη Ευθυμία, Καθηγήτρια Βιολογίας, Οδοντιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ
2. Λυγιδάκη-Θεολόγη Νάντια, Επίκουρη Καθηγήτρια στην Κλινική Στοματικής και Γναθοπροσωπικής Χειρουργικής, Οδοντιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ
3. Τόσιος Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας και Χειρουργικής Στόματος, Εργαστήριο Στοματολογίας, Οδοντιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία εκπονήθηκε κατά τη διάρκεια της διετούς φοίτησής μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα της Βιολογίας Στόματος του τμήματος Οδοντιατρικής του ΕΚΠΑ, υπό την επίβλεψη της καθηγήτριας Βιολογίας, κας Ευθυμίας Κιτράκη. Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους αυτούς τους ανθρώπους που συνέβαλλαν στην ολοκλήρωση αυτής της πορείας μου.

Πρώτα από όλους, στην καθηγήτρια μου, κα Ευθυμία Κιτράκη, για την καθοδήγηση, τις πολύτιμες γνώσεις που απέκτησα δίπλα της και την υποστήριξή της καθ' όλη τη διάρκεια της διεκπεραίωσης της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή Παθολογίας και Χειρουργικής Στόματος του Εργαστηρίου Στοματολογίας, κ. Κωνσταντίνο Τόσιο, για το χρόνο που με τόση προθυμία μου αφιέρωσε κατά την πραγματοποίηση του πειραματικού μέρους και για τη διόρθωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια του τμήματος Βιολογίας Στόματος κα Ελένη Βασταρδή, για τη συνεχή ενθάρρυνση και υποστήριξη κατά τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος.

Ευχαριστώ, επίσης, τον Απεικονιστή Μαστού, Διευθυντή του Τμήματος Απεικόνισης Μαστού του Ιατρικού Κέντρου Αθηνών, Δρ Σπύρο Λαζάρου, χάρη στον οποίο αποκτήσαμε τη δυνατότητα αξιοποίησης του ψηφιακού μαστογράφου του ιδιωτικού του ιατρείου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών και κυρίως το Διευθυντή Ερευνών του Ινστιτούτου Βιολογικών Ερευνών και Βιοτεχνολογίας / ΕΙΕ Μ. Αλέξη για το σχεδιασμό του πειραματικού μέρους, την παροχή αντισώματος, καθώς και τις πολύτιμες γνώσεις και εμπειρία του.

Βέβαια, αξίζει να σημειωθεί πως η ολοκλήρωση αυτής της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας συγχρηματοδοτήθηκε μέσω του Έργου «Υποτροφίες ΙΚΥ» από πόρους του ΕΠ «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση», του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου (ΕΚΤ) του ΕΣΠΑ, 2007-2013.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους γονείς μου, Δημήτρη και Φανή και στην αδερφή μου, Βασιλική για την αμέριστη αγάπη, συμπαράσταση και προ πάντων κατανόηση και ανοχή που έδειξαν και δείχνουν όλα αυτά τα χρόνια, καθώς και στον Κώστα, τον άνθρωπο που πάντοτε με στηρίζει. Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω την πνευματική μου οικογένεια, τον κύριο Νίκο και την κυρία Νάντια, για τη συνεχή στήριξη, τις συμβουλές και την εμπιστοσύνη τους, που αδιάκοπα και απλόχερα μου έχουν προφέρει. Και βέβαια, ευχαριστώ όλους μου τους φίλους που είναι δίπλα μου κάθε στιγμή.

ΑΘΗΝΑ, 2015

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ	9
1.1. ΚΟΝΔΥΛΟΣ ΚΑΤΩ ΓΝΑΘΟΥ	9
1.1.1. Ανατομία.....	9
1.1.2. Εμβρυολογία κονδύλου	10
1.1.3. Ιστολογία κονδύλου	12
1.1.4. Χονδρογενής οστεογένεση στον κόνδυλο της κάτω γνάθου.....	16
1.1.5. Σύγκριση κονδυλικού χόνδρου με χόνδρο μακριών οστών	18
1.1.6. Κόνδυλος - κέντρο αύξησης κάτω γνάθου	19
1.2. ΚΡΟΤΑΦΟΓΝΑΘΙΚΗ ΔΙΑΡΘΡΩΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ	20
1.2.1. Ανατομία κροταφογναθικής διάρθρωσης	20
1.2.2. Σημασία αρμονικής δομής και ανάπτυξης της ΚΓΔ	21
1.2.3. Επιπολασμός διαταραχών της ΚΓΔ	22
1.2.4. Αιτιολογία διαταραχών της ΚΓΔ	24
1.3. ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ.....	25
1.3.1. Ορισμός και ρόλοι	25
1.3.2. Επιπτώσεις της ανεπάρκειας οιστρογόνων στα οστά.....	28
1.3.3. Επίδραση της χορήγησης οιστρογόνων στα οστά	29
1.3.4. Κλασσικός μηχανισμός δράσης των οιστρογόνων	30
1.3.5. Εκλεκτικοί ρυθμιστές οιστρογονικών υποδοχέων (SERMs)	33
1.3.6. Φυτικά ανάλογα των οιστρογόνων.....	34
1.4. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΣΤΟΝ ΚΟΝΔΥΛΟ ΤΗΣ ΚΑΤΩ ΓΝΑΘΟΥ ΚΑΙ Η ΣΧΕΣΗ ΤΟΥΣ ΜΕ ΤΙΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΤΗΣ ΚΓΔ	35

1.4.1. Επίδραση ανεπάρκειας οιστρογόνων στον κόνδυλο της κάτω γνάθου	35
1.4.2. Επίδραση χορήγησης οιστρογόνων στον κόνδυλο της κάτω γνάθου	36

ΣΚΟΠΟΣ	
---------------------	--

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	43
---	-----------

2.1. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	43
2.1.1. Επεξεργασία οστών γνάθου	46
2.2 ΑΚΤΙΝΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΙ ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ.....	48
2.2.1. Με χρήση ακτινογραφικού μηχανήματος	48
2.2.2. Με χρήση ψηφιακού μαστογράφου	49
2.2.3. Με χρήση ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής	50
2.3. ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ	51
2.3.1. Ποσοτικοποίηση ακτινογραφιών	51
2.3.2. Ποσοτικοποίηση απεικονίσεων μαστογράφου	53
2.3.3. Ποσοτικοποίηση φωτογραφιών.....	54
2.4. ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ.....	56
2.4.1. Χρώση Αιματοξυλίνης-εωσίνης.....	59
2.4.2. Κυτταροχημική χρώση όξινης φωσφατάσης ανθεκτικής στο τρυγικό (TRAP)	60
2.4.3. Ανοσοϊστοχημική εντόπιση του οιστρογονικού υποδοχέα β (ERβ).....	61
2.5. ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΚΑΙ ΙΣΤΟΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΑ.....	62
2.5.1. Τομές χρωσμένες με αιματοξυλίνη-εωσίνη.....	62
2.5.2. Τομές χρωσμένες με TRAP	66
2.5.3. Τομές με ανοσοϊστοχημεία για τον ERβ.....	67
2.6. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	67

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	68
3.1. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΟΣΤΙΚΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΚΟΝΔΥΛΟΥ.....	68
3.1.1. Δεδομένα από τις ακτινογραφίες	
3.1.2. Δεδομένα από τις απεικονίσεις με μαστογράφο	69
3.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥ ΣΥΝΟΛΙΚΟΥ ΕΜΒΑΔΟΥ ΤΟΥ ΚΟΝΔΥΛΟΥ.....	71
3.2.1. Δεδομένα από τις ακτινογραφίες	71
3.2.2. Δεδομένα από τις φωτογραφίες	72
3.3. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥ ΠΛΑΤΟΥΣ ΤΟΥ ΚΟΝΔΥΛΙΚΟΥ ΑΥΧΕΝΑ.....	74
3.3.1. Δεδομένα από τις απεικονίσεις με μαστογράφο	74
3.3.2. Δεδομένα από τις φωτογραφίες	76
3.4. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥ ΚΟΝΔΥΛΙΚΟΥ ΧΟΝΔΡΟΥ.....	77
3.4.1. Πάχος του κονδυλικού χόνδρου	77
3.4.2. Πάχος των επιμέρους στιβάδων του κονδυλικού χόνδρου.....	78
3.4.3. Αριθμός των χονδροκυττάρων της πολλαπλασιαζόμενης στιβάδας του κονδυλικού χόνδρου	80
3.5. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΡΙΘΜΟΥ TRAP-ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	83
3.6. ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΝΤΟΠΙΣΗ ΤΟΥ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ β (ΕΡβ)	84
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	86
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	100
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	102
SUMMARY	105
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	108

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Στο Γενικό μέρος, που αποτελεί βιβλιογραφική ανασκόπηση, γίνεται αρχικά μία αναλυτική περιγραφή σχετικά με την περιοχή του κονδύλου της κάτω γνάθου και της Κροταφογναθικής διάρθρωσης (ΚΓΔ) στο σύνολό της. Περιλαμβάνονται στοιχεία ανατομικής, εμβρυολογίας, ιστολογικά, καθώς και λειτουργικά της άρθρωσης. Ακολουθεί η παρουσίαση των οιστρογόνων και η επίδρασή τους στα οστά με επικέντρωση στην περιοχή του κονδύλου.

Στο Ειδικό μέρος περιλαμβάνεται η ερευνητική μελέτη με Υλικό και Μέθοδο, Αποτελέσματα, Συζήτηση και Συμπεράσματα.

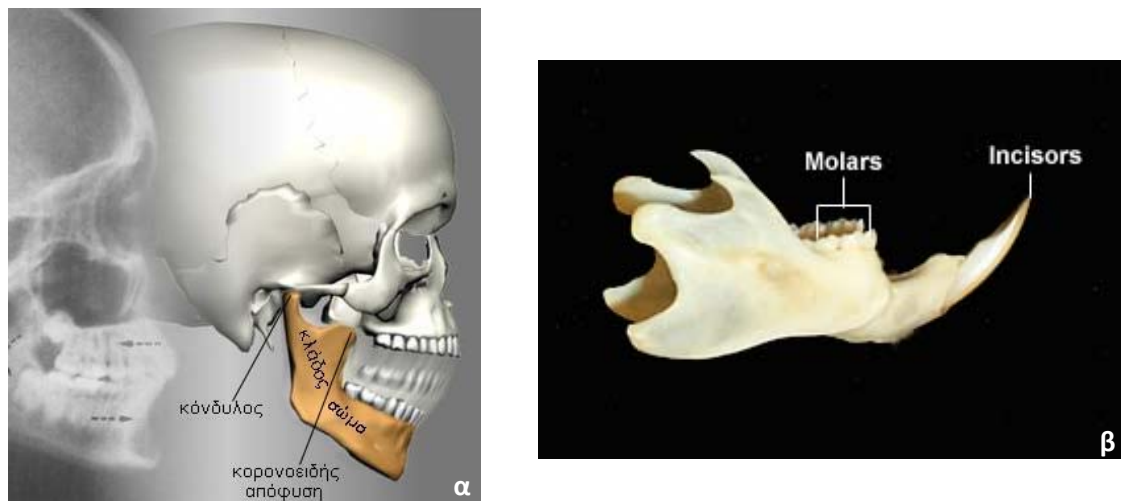
1.1. ΚΟΝΔΥΛΟΣ ΚΑΤΩ ΓΝΑΘΟΥ

1.1.1. Ανατομία

Η κάτω γνάθος αποτελεί ελεύθερο οστό του σπλαχνικού κρανίου και συνδέεται με αυτό με την ΚΓΔ. Τα οστικά τμήματα της άρθρωσης είναι η κροταφική γλήνη από πλευράς κρανίου και ο κόνδυλος της κάτω γνάθου. Η ανθρώπινη κάτω γνάθος είναι ένα οστό σχήματος U, το οποίο ανατομικά αποτελείται από το σώμα και τους δύο κλάδους, οι οποίοι έχουν σχεδόν κάθετη σχέση με αυτό, στην περιοχή της γωνίας της κάτω γνάθου. Ο κάθε κλάδος στο ελεύθερο άκρο του έχει δύο αποφύσεις, την κονδυλοειδή και την κορωνοειδή, ενώ το σώμα περιλαμβάνει τη φατνιακή απόφυση και τα δόντια (Εικόνα 1.1 α). Η κονδυλοειδής απόφυση απολήγει στον κόνδυλο, ο επιμήκης άξονας του οποίου κατευθύνεται προς τα έσω και πίσω. Η

ένωση κονδύλου και γνάθου γίνεται στον αυχένα, ενώ η κεφαλή του κονδύλου κλίνει ελαφρά προς τα εμπρός, έτσι που η επιφάνεια που αρθρώνεται με την κροταφική γλήνη να στρέφεται προς τα πάνω και εμπρός (Hinton, 1983).

Στα ποντίκια, η κάτω γνάθος έχει παρόμοια ανατομία με του ανθρώπου. Η διαφορά έγκειται στο ότι στην κάτω γνάθο των ποντικών τα δόντια είναι διαφορετικά (ένας τομέας και 3 γομφίοι), καθώς και ότι υπάρχει και μία τρίτη απόφυση της κάτω γνάθου, αρκετά εξεσημασμένη, στη γωνία της κάτω γνάθου (Εικόνα 1.1 β).



<http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/pathphys/digestion/pregastric/rodentpage.html>

Εικόνα 1.1: α) Ανατομία κονδύλου κάτω γνάθου στον άνθρωπο β) Ανατομία κονδύλου κάτω γνάθου στα ποντίκια.

1.1.2. Εμβρυολογία κονδύλου

Αρχικά, ο κόνδυλος αναπτύσσεται ως ανεξάρτητος επιμήκης κωνικός χόνδρος, ο οποίος προέρχεται από τοπικά αδιαφοροποίητα μεσεγχυματικά κύτταρα και από το γνήσιο πρωτογενή χόνδρο των βραγχιακών τόξων και για αυτό μπορεί να θεωρηθεί

ως δευτερογενής χόνδρος. Δευτερογενείς ή επικουρικοί είναι οι χόνδροι που σχηματίζονται στα άκρα υμενογενών οστών και συμπληρώνουν το σκελετό. Στην κάτω γνάθο σχηματίζουν την κεφαλή του κονδύλου και μέρος της κορωνοειδούς απόφυσης. Η εμφάνισή τους είναι ανεξάρτητη του χόνδρου του Meckel, των χόνδρων του χονδροκρανίου και των υπόλοιπων πρωτογενών χόνδρων του σκελετού (Μιχαήλ, 1982).

Ο δευτερογενής χόνδρος του κονδύλου εμφανίζεται περίπου την 10^η – 12^η εμβρυϊκή εβδομάδα στον άνθρωπο και αρχίζει να διαμορφώνεται το χαρακτηριστικό ημισφαιρικό σχήμα του κονδύλου (Gardner, 1971). Από τη 10^η -12^η εβδομάδα ο κονδυλικός χόνδρος αρχίζει να αυξάνει σε μέγεθος και μετά τη 14η εβδομάδα περίπου, αρχίζει η ενδοχόνδρια οστεογένεση, δηλαδή η συνεχιζόμενη αντικατάσταση του χόνδρου του κονδύλου από οστό, με κατεύθυνση προς τον κλάδο της κάτω γνάθου. Το μεγαλύτερο τμήμα του χόνδρου έχει ήδη αντικατασταθεί από οστό μέχρι το μέσο της εμβρυϊκής περιόδου (Furstman, 1963).

Με το σχηματισμό της κροταφογναθικής διάρθρωσης στον άνθρωπο, ο χόνδρος του Meckel, που μέχρι τότε στήριζε την κάτω γνάθο στο χονδροκράνιο, παύει να έχει λειτουργική σημασία και αρχίζει να υποστρέφεται. Ουσιαστικά, ο δεύτερος εμβρυϊκός μήνας αποτελεί την κρίσιμότερη περίοδο για τη διαμόρφωση του κρανιοπροσωπικού συμπλέγματος. Το πρώτο βραγχιακό τόξο ή γναθιαίο τόξο συμβάλλει στο σχηματισμό της κάτω γνάθου και στη δημιουργία της ΚΓΔ (Moore, 1978; Morimoto και συν, 1987; Yang και συν, 1992; Otha και συν, 1993).

Στον ποντικό, ο Bhaskar (1953) μελετώντας τον τρόπο αύξησης της γνάθου κατέληξε ότι ο χόνδρος του Meckel διαφοροποιείται από το μεσέγγχυμα και το

πρόσθιο άκρο του αποτελεί ένα πρόσθιο αυξητικό κέντρο της γνάθου, ενώ η οστεοποίηση αρχίζει τη 16η ημέρα της γονιμοποίησης. Οι χόνδροι του κονδύλου και της γωνίας της κάτω γνάθου διαφοροποιούνται τη 17η ημέρα από κοινό βλάστημα, αλλά η κατεύθυνση αύξησής τους είναι διαφορετική κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, ενώ ο χόνδρος της κορωνοειδούς απόφυσης διαφοροποιείται την 20η ημέρα. Η κατεύθυνση αύξησης των χόνδρων του κονδύλου και της γωνίας παίζουν σημαντικό ρόλο όχι μόνο στην αύξηση, αλλά και στη διαμόρφωση του οριστικού σχήματος της γνάθου (Bhaskar, 1953).

1.1.3. Ιστολογία κονδύλου

Τα ιστολογικά χαρακτηριστικά του κονδύλου της κάτω γνάθου είναι παρόμοια στον άνθρωπο και στα ποντίκια. Πιο συγκεκριμένα, ο κόνδυλος της κάτω γνάθου αποτελείται από σπογγώδες οστό, το οποίο καλύπτεται από λεπτή στιβάδα συμπαγούς οστού. Η εγκάρσια διάμετρός του είναι μεγαλύτερη της προσθιοπίσθιας. Οι οστικές δοκίδες είναι προσανατολισμένες κατά τη φορά των δυνάμεων που ασκούνται και διατρέχουν κυρίως προς τα εμπρός και άνω, κάθετα προς την επιφάνεια της κεφαλής του κονδύλου (Boering, 1979).

Η κατανομή και οριοθέτηση των *στιβάδων του χόνδρου στον κόνδυλο* της κάτω γνάθου μυών, παραμένει αμφιλεγόμενη. Ο Blackwood (1966) και οι Hansson και συν (1977) περιγράφουν την αρθρική, ενδιάμεση και υπερτροφική ζώνη, ενώ οι Luder και συν (1988) χώρισαν τον κονδυλικό χόνδρο σε 5 στιβάδες, την αρθρική, την πολυμορφική, τη ζώνη αποπλατυσμένων κυττάρων, την άνω και κάτω υπερτροφική

ζώνη. Οι Heeley και συν (1983) διέκριναν πιο απλά τη ζώνη ηρεμίας, την πολλαπλασιαστική και την υπερτροφική, ενώ οι Durkin και συν (1973) την ινώδη ζώνη ή αρθρική ή ζώνη ηρεμίας, τη ζώνη πολλαπλασιασμού ή μεταβατική ή ενδιάμεση, τη ζώνη υπερτροφικών κυττάρων ή υπερτροφική ζώνη, τη ζώνη διάβρωσης και τη ζώνη υποχόνδριας οστεοποίησης ή υποχόνδριας κατασκευής οστού. Ο κονδυλικός χόνδρος σύμφωνα με τους Yamashiro και Takano-Yamamoto (1998) ταξινομήθηκε σε 4 διακριτές στιβάδες, την αρθρική, την πολλαπλασιαστική, την υπερτροφική και τέλος το μεταλλικοποιημένο στρώμα. Σύμφωνα με άλλη κατηγοριοποίηση, ο οστίτης ιστός του κονδύλου καλύπτεται από τέσσερις στιβάδες διαφορετικών ιστών, οι οποίες ξεκινώντας από την κάτω αρθρική κοιλότητα προς το εσωτερικό του κονδύλου είναι η στιβάδα ινώδους συνδετικού ιστού, η στιβάδα προχονδροβλαστών, κατόπιν η στιβάδα χονδροκυττάρων και η στιβάδα ενδοχονδρίου οστεογένεσης (Bravetti και συν, 2004; Obrez και Gallo, 2006; Scapino και συν, 2006). Άλλοι ερευνητές προτείνουν και άλλες κατηγοριοποιήσεις ανάλογα με τα ιστολογικά τους ευρήματα (Silbermann και συν, 1990; Inoue και συν, 2002; Teramoto και συν, 2003). Δεν υπάρχει, λοιπόν, ακόμα καμία σταθερή διάκριση του κονδυλικού χόνδρου ανά περιοχή. Παρόλα αυτά οι περισσότεροι ερευνητές συμφωνούν στην ύπαρξη της υπερτροφικής στιβάδας, λόγω του μεγάλου μεγέθους των χονδροκυττάρων.

Στη συνέχεια, περιγράφεται διεξοδικότερα μία ταξινόμηση που έχει χρησιμοποιηθεί σε προηγούμενες μελέτες (Fujita και συν, 2001; 2006), στις οποίες οι στιβάδες διακρίνονται σε ινώδη, πολλαπλασιαζόμενη και υπερτροφική στιβάδα.

- Η **ινώδης στιβάδα** αντιστοιχεί στην επιφάνεια του κονδύλου και είναι χαρακτηριστική, αφού στις άλλες διαρθρώσεις, (εκτός των διαρθρώσεων της κλείδας), αντί αυτής υπάρχει υαλοειδής χόνδρος. Τα κύτταρά της είναι μικρά και επίπεδα, ενώ πολλαπλασιάζονται ανεξάρτητα από τη ζώνη πολλαπλασιασμού (Duterloo, 1967; Frommer και συν, 1968; Durkin και συν, 1973; Appleton, 1975). Αποτελείται από πυκνές ίνες κολλαγόνου, μεταξύ των οποίων βρίσκονται κύτταρα που μοιάζουν με ινοβλάστες. Οι κολλαγόνες ίνες διατάσσονται κατά το προσθιοπίσθιο επίπεδο, αλλά στην επιφάνεια υπάρχουν ινίδια κολλαγόνου, τα οποία δεν είναι οργανωμένα. Η ινώδης κατασκευή της στιβάδας αυτής, πιστεύεται ότι προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι του υαλοειδούς χόνδρου, όπως καλύτερες επουλωτικές δυνατότητες και μεγαλύτερη αντοχή στις μεταβολές της ηλικίας. Με την πάροδο της ηλικίας, η ζώνη αυτή γίνεται όλο και περισσότερο ινώδης, αποτελούμενη πλέον από πυκνές δομές κολλαγόνων ινών, που το μεγαλύτερο ποσοστό τους προσανατολίζεται παράλληλα προς την αρθρική επιφάνεια, ενώ μεταξύ των κολλαγόνων αυτών ινών βρίσκονται και μερικές ελαστικές ίνες.
- Η **πολλαπλασιαζόμενη στιβάδα** είναι κάτω από την ινώδη στιβάδα και συμβάλλει στην αυξητική δραστηριότητα του κονδύλου μέσω του μηχανισμού υπερτροφίας των χονδροκυττάρων. Η πολλαπλασιαζόμενη στιβάδα είναι το κύριο κέντρο χονδρογένεσης και αύξησης. Αποτελείται από μεγαλύτερα, πιο στρογγυλά κύτταρα με λιγότερη μεσοκυττάρια ουσία μεταξύ τους. Στην αρχή της ζώνης, τα κύτταρα είναι αδιαφοροποίητα

μεσεγγυματικά, ενώ προς το τέλος εμφανίζουν ενδιάμεσους χαρακτήρες μεταξύ αδιαφοροποίητων μεσεγγυματικών και χονδρικών κυττάρων (Thilander και συν, 1976). Η αύξηση του χόνδρου του κονδύλου χαρακτηρίζεται ως ανάπτυξη με επίθεση, διότι τα αδιαφοροποίητα μεσεγγυματικά κύτταρα της πολλαπλασιαζόμενης στιβάδας διαιρούνται και στη συνέχεια διαφοροποιούνται σε χονδροκύτταρα, οπότε δεν παρουσιάζουν πλέον μιτώσεις (Duterloo και Wolters, 1971). Σε μελέτες που έγιναν σε ΚΓΔ αναπτυσσόμενων ποντικών, αποδείχθηκε ότι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός περιορίζεται κυρίως στην πολλαπλασιαζόμενη στιβάδα. Από τη στιβάδα αυτή τα κύτταρα εισέρχονται στην υπερτροφική στιβάδα και τελικά αποβάλλονται μέσα σε μυελικές κοιλότητες κατά τη διαδικασία του ενδοχόνδριου οστικού σχηματισμού (Blackwood, 1966).

- Η **υπερτροφική στιβάδα** περιλαμβάνει χονδροκύτταρα που φαίνονται διογκωμένα με τυχαία διάταξη στο χώρο. Τα διαφοροποιημένα αυτά χονδροκύτταρα παράγουν διαφοροποιημένη μεσοκυττάρια ουσία χόνδρου και υπερτρέφονται. Προς το τέλος της στιβάδας αυτής, η μεσοκυττάρια ουσία αρχίζει να ενασβεστιώνεται. Η ενασβεστίωση γίνεται γύρω από τα κύτταρα, τα οποία με αυτόν τον τρόπο παγιδεύονται, χωρίς όμως να δείχνουν στοιχεία εκφύλισης. Πιστεύεται ότι τα χονδροκύτταρα αυτά έχουν τη δυνατότητα να μετατρέπονται, στη συνέχεια, σε πρόδρομα κύτταρα ή σε χονδροκλάστες (Blackwood, 1969; Silbermann και Frommer, 1972β, 1973; Moore, 1975), που μετέχουν στην αποδόμηση του χόνδρου πριν να αρχίσει η

οστεοποίηση. Υπάρχει όμως και η άποψη ότι τα κύτταρα αυτά μετατρέπονται σε οστικά κύτταρα (Silbermann και Frommer, 1974).

Στον άνθρωπο, με την πρόοδο της ηλικίας, το πάχος του χόνδρου στον κόνδυλο ελαττώνεται, ενώ το ίδιο συμβαίνει και μετά από περιόδους έντονης ανάπτυξης, όπως είναι το τέλος της περιόδου της μικτής οδοντοφυΐας. Από όλες τις στιβάδες του χόνδρου του κονδύλου, στα αρχικά στάδια η στιβάδα των υπερτροφικών κυττάρων είναι η παχύτερη, στη συνέχεια όμως και κατά την ηλικία των 10-11 χρόνων έχει το ίδιο πάχος με τη στιβάδα πολλαπλασιασμού. Μετά τα 19 έτη, η στιβάδα των υπερτροφικών κυττάρων παύει να διακρίνεται. Υπάρχουν μόνο λίγα νησίδα χονδρικών κυττάρων στην άνω και πρόσθια πλευρά του κονδύλου, που μετέχουν στη διαδικασία ανακατασκευής της άρθρωσης ανάλογα με τα ερεθίσματα που δέχεται αυτή (Blackwood, 1966; Thilander και συν, 1976; Richards και συν, 1984).

Γενικά, επειδή η θεμέλια ουσία του χόνδρου δεν περιέχει αιμοφόρα αγγεία, τα θρεπτικά συστατικά και τα προϊόντα του μεταβολισμού διαχέονται κατευθείαν, μέσω της μαλακής θεμέλιας ουσίας, προς και από τα κύτταρα. Σε αυτή την ιδιότητα του χόνδρου οφείλεται η αυξημένη αντοχή του στις πιέσεις, διότι αν υπήρχαν αγγεία, θα συνθλίβονταν και θα αποκλείονταν οι δίοδοι τροφοδοσίας λόγω πίεσης. Εκτός αυτού, η εύκαμπτη θεμέλια ουσία προστατεύει τα χονδροκύτταρα (Moyers, 1988; Enlow, 1990).

1.1.4. Χονδρογενής οστεογένεση στον κόνδυλο της κάτω γνάθου

Η χονδρογενής οστεογένεση παρατηρείται σε περιοχές, οι οποίες υπόκεινται σε υψηλού βαθμού συμπίεση, όπως η περιοχή του κονδύλου της κάτω γνάθου. Όπως προαναφέρθηκε, ο κονδυλικός χόνδρος της κάτω γνάθου σχετίζεται με ενδοχόνδριο οστικό σχηματισμό (Blackwood, 1966; Beresford, 1981; Weiss και συν, 1990; Inoue και συν, 2002).

Σήμερα, πιστεύεται ότι κατά τη διαδικασία της χονδρογενούς οστεογένεσης, τα μεσεγχυματικά κύτταρα μεταπίπτουν σε χονδροβλάστες, οι οποίοι με συνεχείς ταχείες διαιρέσεις πολλαπλασιάζονται, σχηματίζοντας επιμήκεις σειρές αποπλατυσμένων χονδροκυττάρων. Η παροχή των χονδροκυττάρων γίνεται από την πολλαπλασιαζόμενη στιβάδα και στη συνέχεια, ορισμένα από τα θυγατρικά χονδροκύτταρα υπερτρέφονται και εκφυλίζονται, ενώ παράλληλα η μεσοκυττάρια ουσία αποσυντίθεται και απορροφάται μερικώς, επιτρέποντας τη διήθηση της μάζας του χόνδρου από αιμοφόρα αγγεία προερχόμενα από το περίοστεο. Από τα αιμοφόρα αγγεία εξέρχονται αδιαφοροποίητα κύτταρα, τα οποία μεταπίπτουν σε οστεοβλάστες, οι οποίοι με τη σειρά τους εναποθέτουν λεπτές δοκίδες οστίτη ιστού στα υπολείμματα του ενασβεστιωμένου χόνδρου. Επομένως, γίνεται αντικατάσταση του χόνδρου από οστό, στην ένωση χόνδρου και οστού στην υπερτροφική στιβάδα (Kimura και συν, 2008). Οι Sasaki και συν (1996) ανέφεραν ότι η εν λόγω αντικατάσταση περιλαμβάνει τις ακόλουθες φάσεις: α) αντικατάσταση του απασβεστιωμένου χόνδρου και δημιουργία κενών στα χονδροκύτταρα, μέσω φαγοκυττάρωσης των χόνδρινων τμημάτων από περιαγγειακά μονοκύτταρα, β) εναπόθεση οστού από οστεοβλάστες και γ) απορρόφηση οστού και ενασβεστιωμένου χόνδρου από οστεοκλάστες. Η προαναφερθείσα διαδικασία είναι

συνεχής και επαναλαμβανόμενη και κατά αυτόν τον τρόπο, ολόκληρος ο χόνδρος αυξάνεται με γραμμική κατεύθυνση και αντικαθίσταται από οστό (Moyers, 1988; Enlow, 1990; Proffit, 1993).

1.1.5. Σύγκριση κονδυλικού χόνδρου με χόνδρο μακρών οστών

Θεωρείται δεδομένο από πολλούς ερευνητές (Moore, 1949; Bjork, 1963; Gianelly και Moores, 1965; Hayes, 1967; Koski, 1968) ότι ο χόνδρος του κονδύλου διαφέρει από το χόνδρο των μακρών οστών και οι αντιδράσεις του στους διάφορους ορμονικούς, χημικούς, χειρουργικούς και διαιτητικούς παράγοντες είναι διαφορετικές. Οι διαφορές αυτές τον κατατάσσουν στους δευτερογενείς ή εμβρυϊκούς τύπους των χόνδρων, όπως προαναφέρθηκε, ενώ οι επιφύσεις των μακρών οστών κατατάσσονται στους πρωτογενείς τύπους. Η προέλευση του δευτερογενούς χόνδρου κατά κάποιους συγγραφείς (Murray, 1963; Hall, 1967), οφείλεται σε μειωμένη τάση και πίεση, δηλαδή σε μηχανικά αίτια, ενώ άλλοι συγγραφείς πιστεύουν ότι ο δευτερογενής χόνδρος προέρχεται από μεταναστευτικά κύτταρα του χόνδρου του Meckel. Πολύ σημαντική διαφορά ανάμεσα στους δύο αυτούς τύπους χόνδρων είναι ότι στους πρωτογενείς χόνδρους, η ώριμη μορφή τους και το τελικό τους μέγεθος είναι γενετικά προκαθορισμένο, ενώ στους δευτερογενείς δεν είναι (Bertolini και συν, 1967; Trevisan και Scapino, 1976).

Διαφορετικό είναι επίσης, το σχήμα και η διάταξη των κυττάρων μεταξύ των δύο τύπων χόνδρων, όπως παρουσιάζεται στα ιστολογικά παρασκευάσματα. Ο κονδυλικός χόνδρος της κάτω γνάθου διαφέρει από το χόνδρο των μακρών οστών στα στάδια διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων, καθώς και σε κάποια από τα συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας (Silbermann και Frommer, 1972; Mizoguchi και

συν, 1990). Η αρθρική επιφάνεια των μακρών οστών αποτελείται από χονδρογενετικά κύτταρα, χωρίς καμία δραστηριότητα αλκαλικής φωσφατάσης (ALP). Αντίθετα, η δραστηριότητα της ALP και η σύνθεση της οστεοποντίνης λαμβάνουν χώρα στην υπερτροφική στιβάδα. Ο κονδυλικός χόνδρος περιέχει μεγάλη ποσότητα τύπου I κολλαγόνου στην αρθρική περιοχή (Silbermann και συν, 1987; Mizoguchi και συν, 1990), σε αντίθεση με την απουσία του στην αρθρική περιοχή του χόνδρου των μακρών οστών.

Από την άλλη, το κολλαγόνο τύπου I, εκφράζεται και στην υπερτροφική στιβάδα, όπου τα χονδροκύτταρα λαμβάνουν την τελική τους διαφοροποίηση και στους δύο τύπους χόνδρου. Επιπρόσθετα και στους δύο τύπους, το κολλαγόνο τύπου X είναι εμφανές στην υπερτροφική στιβάδα (Gibson και Flint, 1985; Poole και Pidoux, 1989; Silbermann και von der Mark, 1990; Ohashi και συν, 1997; Shibata και συν, 1997). Αυτά τα στοιχεία δείχνουν ότι η υπερτροφική στιβάδα στον κονδυλικό χόνδρο έχει μάλλον τα ίδια εξωκυττάρια συστατικά με το χόνδρο των μακρών οστών (Livne και συν, 1985; Copray και Liem, 1989; Luder και Schroeder, 1992; Mizoguchi και συν, 1996).

1.1.6. Κόνδυλος - κέντρο αύξησης κάτω γνάθου

Η αύξηση του σώματος της κάτω γνάθου και ειδικά του κονδύλου, εξακολουθεί και σήμερα να είναι ένα από τα πιο αμφιλεγόμενα σημεία στον όλο μηχανισμό της αυξήσεως της γνάθου. Επικρατεί η άποψη ότι η κύρια λειτουργία του κονδύλου είναι να προσφέρει την απαιτούμενη αύξηση στην περιοχή, έτσι ώστε να μη διαταράσσεται η λειτουργική ισορροπία της ΚΓΔ, καθώς η γνάθος αναπτύσσεται

προς τα εμπρός και κάτω, εξαιτίας των δυνάμεων που εξασκούνται σε αυτήν από τους μαλακούς ιστούς που την περιβάλλουν. Ο κονδυλικός χόνδρος, λοιπόν, δεν αποτελεί κυρίαρχο κέντρο ελέγχου της αύξησης, αλλά ένα σημαντικό ανατομικό στοιχείο, το οποίο με τη μεγάλη προσαρμοστική αυξητική ικανότητα που διαθέτει, επιτυγχάνει την αρμονική τοποθέτηση της κάτω γνάθου σε σχέση με τη βάση του κρανίου και το σύμπλεγμα της άνω γνάθου. Η θεωρία αυτή προτείνει ότι ο κόνδυλος είναι δευτερογενής πυρήνας αυξήσεως, με διαφορετικό τρόπο οστεώσεως, αγγειώσεως και ιστολογικής δομής από τον αυξητικό χόνδρο των μακρών οστών (Enlow, 1983).

1.2. ΚΡΟΤΑΦΟΓΝΑΘΙΚΗ ΔΙΑΡΘΡΩΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ

1.2.1. Ανατομία κροταφογναθικής διάρθρωσης

Η κροταφογναθική διάρθρωση (ΚΓΔ) η σύνδεση μεταξύ του κρανίου και της κάτω γνάθου, είναι ιδιαίτερα εξειδικευμένη κατασκευή με υψηλό βαθμό ανατομικής ακρίβειας και δυνατότητα σύνθετης κίνησης (Sicher, 1964; Ermshar, 1977). Η διάρθρωση της κάτω γνάθου με το κρανίο είναι αμφίπλευρη, κατά τη διάρκεια δε των κινήσεων της λειτουργούν ταυτόχρονα και οι δύο αρθρώσεις και δεν είναι δυνατή φυσιολογικά η ετερόπλευρη λειτουργία. Τα οστικά μέρη της κροταφογναθικής διάρθρωσης είναι: α) η κροταφική γλήνη του λεπιδοειδούς οστού με το πρόσθιο αρθρικό φύμα και β) ο κόνδυλος της κάτω γνάθου. Μεταξύ των δύο αρθρικών επιφανειών παρεμβάλλεται ο διάρθριος χόνδρος ή δίσκος ή μηνίσκος. Η άρθρωση περιβάλλεται από τον αρθρικό θύλακο, ο οποίος περιέχει το αρθρικό

υγρό και χωρίζεται από το δίσκο σε δύο χώρους, τον άνω και τον κάτω αρθρικό. Η ΚΓΔ προέρχεται από δύο ξεχωριστά βλαστήματα, το «κονδυλικό» και το «κροταφικό», που ενσωματώνονται σε ένα υμενογενές και σε ένα χονδρογενές οστό, ενώ οι άλλες αρθρώσεις προέρχονται από ένα βλάστημα (Keith, 1982).

Η ΚΓΔ Χαρακτηρίζεται από μία αξιοσημείωτη ικανότητα αναδιαμόρφωσης, που θεωρείται απαραίτητη λειτουργική προσαρμογή στην αύξηση της κάτω γνάθου ή σε αλλαγές κατά την εξέλιξη της οδοντοφυΐας (McNamara και Carlson, 1979; Mongini, 1980; Peltola, 1993). Έχει αποδειχθεί από προηγούμενες μελέτες ότι οι δομικές αλλαγές αναδιαμόρφωσης της ΚΓΔ σχετίζονται με τη σύγκλειση (Ehrlich και συν, 1980; 1982; Gazit και συν, 1987). Ωστόσο, οι μοριακές διαδικασίες που υποκινούν την αναδιαμόρφωση και προσαρμογή της ΚΓΔ, καθώς και το αν οι οιστρογονικοί υποδοχείς (ERs) εμπλέκονται σε αυτές τις διαδικασίες δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως.

1.2.2. Σημασία αρμονικής δομής και ανάπτυξης της ΚΓΔ

Η διαμόρφωση του κονδύλου και η αύξηση της κάτω γνάθου παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην επίτευξη φυσιολογικής λειτουργίας της γνάθου, η οποία σχετίζεται με αρμονική μορφολογία του κρανιοπροσωπικού συμπλέγματος. Η κρανιοπροσωπική, βέβαια, ανάπτυξη παρουσιάζει μεγάλη ποικιλία ανάμεσα στα άτομα και η αύξηση της κάτω γνάθου σχετίζεται με διάφορους παράγοντες, όπως αυξητικές ορμόνες, αυξητικούς παράγοντες, κληρονομικότητα και μηχανικό stress (Bresin και συν, 1999; Hwang και Cha, 2004; Delatte και συν, 2004; Oshikawa και συν, 2004).

Αλλαγή του μεγέθους ή του σχήματος του κονδύλου οποιασδήποτε αιτιολογίας, όπως μία υπερπλασία του κονδύλου, που χαρακτηρίζεται από προοδευτική αύξηση του κονδύλου και εκδηλώνεται άλλοτε ως διόγκωση της κονδυλικής κεφαλής, άλλοτε ως επιμήκυνση του κονδυλικού αυχένα και άλλοτε ως συνδυασμός και των δύο αυτών, επηρεάζει την ΚΓΔ (Sarnat, 1969). Όταν συμβαίνει, παρατηρούνται και άλλες διαταραχές στη στοματοπροσωπική χώρα, όπως μετατόπιση της μέσης γραμμής του κάτω οδοντικού τόξου, ανευγμένη δήξη της πάσχουσας πλευράς και σταυροειδής σύγκλειση της αντίθετης πλευράς. Αντίθετα, η υποπλασία του κονδύλου, δηλαδή το μικρό μέγεθος και ύψος του σε σχέση με το φυσιολογικό, ή/και ο κοντύτερος αυχένας του, συνήθως συνοδεύεται από ασυμμετρία και οπισθογναθισμό της κάτω γνάθου (Slootweg και Muller, 1986). Μία άλλη διαταραχή είναι η απορρόφηση του κονδύλου, που συνδέεται και με τα επίπεδα των οιστρογόνων και οδηγεί επίσης σε συγκλεισιακές διαταραχές (Abubaker και συν, 1993).

Η ΚΓΔ είναι μία από τις πιο σύνθετες αρθρώσεις του ανθρώπινου σώματος και αποτελεί πεδίο μελέτης, καθώς οι παθήσεις ή οι κλινικές καταστάσεις που την αφορούν μπορεί να έχουν επιπτώσεις ανατομικές και λειτουργικές στη στοματογναθοπροσωπική χώρα. Οι παθολογικές καταστάσεις αφορούν τόσο στους σκληρούς και όσο και στους μαλακούς ιστούς που την αποτελούν και συνήθως και εντάσσονται στις παθήσεις του μυοσκελετικού συστήματος (Bell, 1983; 1990; Mc Neil, 1993; Okeson, 1996; Nekora-Azak, 2004).

1.2.3. Επιπολασμός διαταραχών της ΚΓΔ

Οι διαταραχές της ΚΓΔ είναι η δεύτερη πιο συχνή μυοσκελετική νόσος στις ΗΠΑ, με 10,8 εκατομμύρια ανθρώπους να υποφέρουν από προβλήματα στην περιοχή αυτή. Η συχνότητα γυναικών που αναζητούν θεραπεία για κρανιογναθική δυσλειτουργία είναι 2-5 φορές ψηλότερη συγκριτικά με τους άνδρες, ενώ αυτή η διαφορά είναι ακόμα μεγαλύτερη σε κάποιες πληθυσμιακές ομάδες (LeReche και συν, 2003; Karila, 2003; Johanson και συν, 2003), όπου υπολογίζεται σε 8-10 φορές μεγαλύτερη (Farman και συν, 1982; Aufdemorte και συν, 1986).

Ποσοστό 80% των ατόμων που χρειάζονται θεραπεία για διαταραχές της ΚΓΔ είναι γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας, μεταξύ 15-45 ετών, γεγονός που παρουσιάζει διαφορά με παρόμοιες νόσους άλλων αρθρώσεων, οι οποίες εμφανίζουν προτίμηση στο γυναικείο φύλο, αλλά στην μετεμμηνοπαυσιακή περίοδο (Karila, 2003). Η συχνότητα των διαταραχών της ΚΓΔ κορυφώνεται σε δύο ηλικιακές ομάδες, στην ηλικία των 15-25 ετών και στην ηλικία των 45-55 ετών (Rasmussen, 1981). Η πρώτη κορυφή φαίνεται να συνάδει με την εφηβεία και η δεύτερη με την εμμηνόπαυση. Η συχνότητα των διαταραχών της ΚΓΔ έχει πρόσφατα αυξηθεί στα αναπτυσσόμενα και νεαρά ενήλικα άτομα. Σε αιτιολογικές μελέτες, περίπου 20% - 40% του γενικού πληθυσμού είχε στο παρελθόν κάποιο ιστορικό διαταραχών της ΚΓΔ (Helkimo, 1976; Heloe και Heloe, 1978). Οι Grosfeld και συν (1985) ανέφεραν την παρουσία διαταραχών της ΚΓΔ σε ποσοστό 68% των εφήβων με μεγαλύτερη μάλιστα συχνότητα στα κορίτσια. Επιπλέον, αυξημένη συχνότητα διαταραχών της ΚΓΔ έχει παρατηρηθεί και στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες που λαμβάνουν θεραπεία αναπλήρωσης με οιστρογόνα (LeResche και συν, 1994).

Επομένως, δημιουργείται η ανάγκη διερεύνησης των παραγόντων που έχουν σχέση με το θηλυκό γένος και της πιθανότητας η εμφάνιση των διαταραχών της ΚΓΔ να σχετίζεται με το επίπεδο των ορμονών του φύλου και συγκεκριμένα με τα οιστρογόνα.

1.2.4. Αιτιολογία διαταραχών της ΚΓΔ

Σήμερα, θεωρείται πλέον αποδεκτή η πολυπαραγοντική αιτιολογία των εν λόγω δυσλειτουργιών, που μπορεί να είναι αποτέλεσμα τραυματισμού στην περιοχή του προσώπου, τοπικών ενδοαρθρικών προβλημάτων, νευρομυικών και ανατομικών διαταραχών, συγκλεισιακών ανωμαλιών και οργανικών ή/ και ψυχολογικών προβλημάτων, τα οποία ενδεχομένως επιδρούν με διάφορους συνδυασμούς ή σαν ξεχωριστές οντότητες (Green και συν, 1969; De Boever, 1973; Helkimo, 1976, Carlsson και Oberg, 1979; Greene, 1981; Carlsson και Droukas, 1983; Parker, 1990).

Λόγω, όμως, της υψηλής συχνότητας των διαταραχών της ΚΓΔ σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας, όπως προαναφέρθηκε, διερευνάται ο ρόλος των οιστρογόνων (Audfemorte και συν, 1986; Milam και συν, 1987; Abubaker και συν, 1993; LeResche και συν, 1997; Meisler, 1999; Yamada και συν, 2003; Landi και συν, 2005; Wang και συν, 2006; Kang και συν, 2007).

Δεν είναι ακόμα ξεκάθαρο, αν τα οιστρογόνα ή/ και η δυσλειτουργία του μασθητηρίου συστήματος μπορούν να επηρεάσουν με διαφορετικό τρόπο το καθένα την εσωτερική δομή του οστού (Bresin και συν, 1999; Huiskes και συν, 2000).

Δεδομένου ότι η αύξηση του κονδύλου προσαρμόζεται σε λειτουργικούς παράγοντες και φόρτιση, η σύγκριση των διαφόρων πειραματικών μελετών είναι

αρκετά δύσκολη, εξ' αιτίας της έλλειψης λεπτομερούς ανάλυσης της κατανομής των φορτίσεων στον κόνδυλο.

Εξάλλου, δεν έχει διευκρινιστεί η διαφαινόμενη φυλετική προτίμηση των διαταραχών της ΚΓΔ, αλλά υπάρχουν ενδείξεις ότι εμπλέκονται και άλλοι οιστρογονοεξαρτώμενοι μηχανισμοί.

1.3. ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΑ

1.3.1. Ορισμός και ρόλοι

Οι ωοθήκες παράγουν και εκκρίνουν ορμόνες του φύλου, από τις οποίες οι κυριότερες είναι τα οιστρογόνα και η προγεστερόνη.

Τα οιστρογόνα είναι στεροειδή παράγωγα του οιστρανίου, με βασικές ουσίες το οξικό οξύ και τη χοληστερόλη. Τα σημαντικότερα οιστρογόνα είναι κατά σειρά σπουδαιότητας και δράσης η 17-β-οιστραδιόλη, η οιστρόνη και η οιστριόλη.

Τα οιστρογόνα κυκλοφορούν στο αίμα, κυρίως συνδεδεμένα με μία ειδική σφαιρίνη, ενώ ελάχιστα ποσά κυκλοφορούν ελεύθερα και τα οποία τελικά με αυτή τη μορφή (βιοενεργή) ασκούν τη βιολογική δράση τους στους ιστούς. Αλλά και τα συμπλέγματα οιστρογόνων-σφαιρίνης διασπώνται εύκολα και είναι ανά πάσα στιγμή διαθέσιμα να αποδώσουν ελεύθερα και δραστικά οιστρογόνα στους ιστούς (Rosenthal και συν, 1975; Wu και συν, 1976).

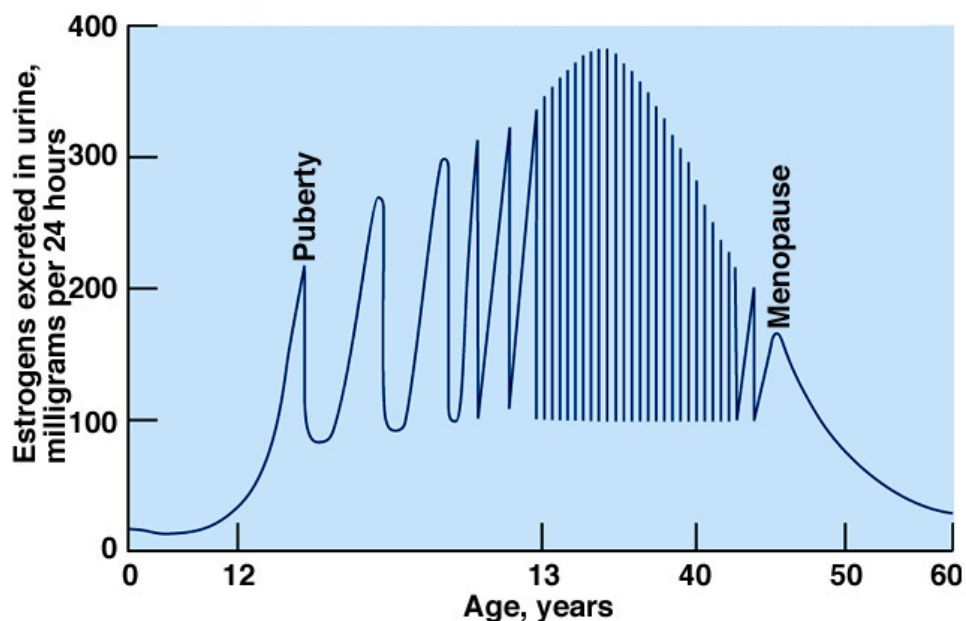
Τα οιστρογόνα παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των περισσότερων λειτουργιών του σώματος, όπως του μεταβολισμού, της αύξησης και της ανάπτυξης, της αναπαραγωγής, της ισορροπίας του νερού και των ηλεκτρολυτών (Guyton και Hall, 2006). Επιπλέον, επιδρούν στο νευρικό και καρδιαγγειακό σύστημα και είναι

απαραίτητα για την ανάπτυξη και δομική ακεραιότητα του σκελετού (Lorenzo, 2003). Τα οιστρογόνα συντελούν επίσης σημαντικά στην αύξηση της οστικής πυκνότητας (Manolagas και συν, 2002) και συντελούν στην επιτάχυνση της ανάπτυξης των οστών σε μήκος. Αφού αυτή ολοκληρωθεί, ρυθμίζουν τη σύγκλειση των επιφύσεων, ενώ παράλληλα ρυθμίζουν την αύξηση του μυϊκού συστήματος. Αναφλερεται ότι η επίδραση των ορμονών του φύλου στην ανάπτυξη των οστών και των μυών μπορεί, μάλιστα, να είναι μεγαλύτερη από αυτή των γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων (Morishima και συν, 1995). Τα οιστρογόνα αναστέλλουν την παραγωγή διαφόρων κυτοκινών, οι οποίες έχουν άμεση σχέση με την απορρόφηση του οστού, μέσω της ενεργοποίησης των οστεοκλαστών και κατά αυτόν τον τρόπο μειώνουν το ρυθμό της οστικής απορρόφησης (Smith και συν, 1994).

Τα οιστρογόνα παρεμβαίνουν στο δίπολο οστεοκλάστης-οστεοβλάστης προκαλώντας μία ισορροπία δράσεων, που καλείται φαινόμενο σύζευξης. Η ποσότητα του οστού που σχηματίζεται σε κάθε κύκλο ανακατασκευής δεν είναι η ίδια σε όλη τη διάρκεια της ζωής, όπως ακριβώς διαφέρουν και τα επίπεδα των εκκρινόμενων οιστρογόνων (Εικόνα 1.3.1). Μέχρι τη σκελετική ωρίμανση, οπότε ο οστίτης ιστός αποκτά τη μέγιστη μάζα του (κορυφαία οστική μάζα), υπερτερεί η οστική παραγωγή. Στη συνέχεια κατά την 3^η και 4^η δεκαετία της ζωής και τα δύο φύλα αρχίζουν να χάνουν φυσιολογικά οστό με ρυθμό 0,3-0,5% ανά έτος. Κατά την εμμηνόπαυση- φυσική ή προκλητή- στις γυναίκες, ο ρυθμός της οστικής απώλειας αυξάνεται υπερβαίνοντας το 3% στα σπογγώδη οστά ως επί το πλείστον, με περιόδους ύφεσης και έξαρσης του φαινομένου. Οι ανωμαλίες στην παραγωγή των

ορμονών του φύλου στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες προκαλούν μείωση της οστικής πυκνότητας (Riggs, 2009). Με τη γήρανση, ελαττώνεται ο ρυθμός οστικής απώλειας κατά 1-2% ανά έτος, απώλεια που θεωρείται φυσιολογική λόγω ηλικίας και για τα δύο φύλα και δε συνοδεύεται από συμπτωματολογία. Έτσι, η ποσότητα του οστού που σχηματίζεται σε κάθε κύκλο ανακατασκευής μειώνεται με την πάροδο της ηλικίας στον άνθρωπο, πιθανόν λόγω μειωμένης στρατολόγησης των οστεοβλαστών. Όμως, η φάση της ταχείας οστικής απώλειας, η οποία ακολουθεί την ανεπάρκεια ορμονών του φύλου, διαφέρει από εκείνη της γήρανσης, όχι μόνο όσον αφορά τη χρονική στιγμή, αλλά και όσον αφορά τις κυτταρικές διαταραχές (Μανώλαγας, 1996) (Εικόνα 1.3.1).

Στην περιοχή της ΚΓΔ, τα οιστρογόνα ρυθμίζουν πολλαπλές βιολογικές διαδικασίες περιλαμβανομένης της φλεγμονής, της δραστηριότητας μεταλλοπρωτεϊνών και της ρύθμισης του πόνου (Craft, 2007; Galal και συν, 2008; Wadha και Kapila, 2008).



<http://BrainMind.com/DevelopmentalPsychology.html>

Εικόνα 1.3.1: Επίπεδα εκκρινόμενων οιστρογόνων ανάλογα με την ηλικία στις γυναίκες. !7

1.3.2. Επιπτώσεις της ανεπάρκειας οιστρογόνων στα οστά

Η ανεπάρκεια των οιστρογόνων αναγνωρίζεται ως αιτία για τη μετεμμηνοπαυσιακή απώλεια οστού. Σε πειραματόζωα, έχει φανεί ότι η ωθηκεκτομή επάγει την οστική απώλεια και ότι τα οιστρογόνα είναι αποτελεσματικά στην εμπόδιση της απώλειας οστού (Fujita και συν, 2001α).

Αντίστοιχα με ότι συμβαίνει στις γυναίκες, οι θηλυκοί αρουραίοι μετά από ωθηκεκτομή, παρουσιάζουν οστεοπόρωση, γεγονός που είναι πολύ καλά τεκμηριωμένο σήμερα (Wronski και συν 1985; 1986; Evans και Turner, 1995, Omi και Ezawa, 1995). Ακόμα και σε αρουραίους νεαρής ηλικίας, παρατηρείται γρήγορη απώλεια σπογγώδους οστού μετά από ωθηκεκτομή, όπως επίσης και μειωμένη οστική ισχύς (Seedor και συν, 1991). Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των οστικών μεταβολών στα σπογγώδη οστά, ύστερα από ωθηκεκτομή στους αρουραίους είναι αντίστοιχα των φαινομένων οστικής ανακατασκευής στις γυναίκες μετά από εμμηνόπαυση. Παρόλα αυτά, η απώλεια οστού δεν είναι η ίδια σε όλα τα σπογγώδη οστά (Ma και συν, 1994; Westerlind και συν, 1997) ούτε όλες οι περιοχές των σπογγωδών οστών παρουσιάζουν απώλεια οστού με τον ίδιο ρυθμό (Li και συν, 1997).

Σύμφωνα με τους Evans και Turner (1995), τα κοινά ευρήματα μεταξύ αρουραίων που έχουν υποστεί ωθηκεκτομή και μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών είναι τα ακόλουθα: α) Αυξημένοι δείκτες οστικής ανακατασκευής στον ορό και τα ούρα, β) Μειωμένη πυκνότητα μεταλλικών στοιχείων στο οστό, γ) Αυξημένη απορρόφηση του ενδοστέου του φλοιού στα μακριά οστά, δ) Οστεοπενία της σπογγώδους μοίρας

των μακρών οστών και των σπονδύλων, εξ αιτίας αυξημένης απορρόφησης, ε) Αποδεδειγμένη ιστολογικά αυξημένη ανακατασκευή του σπογγώδους οστού.

Αντιθέτως, οι διαφορές μεταξύ ωθηκεκτομημένων αρουραίων και μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών συγκεκριμενοποιούνται στα πιο κάτω: α) Στις γυναίκες παρατηρούνται αυτόματα κατάγματα, ενώ κάτι ανάλογο δεν παρατηρείται στους αρουραίους β) Η σπογγώδης οστεοπενία στις γυναίκες οφείλεται σε μείωση του αριθμού και του πάχους των οστεοδοκίδων, ενώ στους αρουραίους οφείλεται κυρίως στη μείωση του αριθμού των οστεοδοκίδων γ) Η σπογγώδης οστεοπενία εξ αιτίας ανεπάρκειας οιστρογόνων στους ανθρώπους, οφείλεται στη μεταβολή της οστικής ανακατασκευής, ενώ στους αρουραίους, εκτός από αυτό, οφείλεται και σε αυξημένη απορρόφηση από χονδροβλάστες δ) Η ωθηκεκτομή έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη ισχύ των οστών σε αναπτυσσόμενους αρουραίους ε) Η ωθηκεκτομή συντελεί σε μεγαλύτερη αύξηση κατά τον επιμήκη άξονα των μακρών οστών σε αναπτυσσόμενους αρουραίους στ) Η ωθηκεκτομή συντελεί σε μεγαλύτερη ακτινική (radial) αύξηση των μακρών οστών σε αναπτυσσόμενους αρουραίους.

1.3.2. Επίδραση της χορήγησης οιστρογόνων στα οστά

Η θεραπεία αναπλήρωσης με οιστρογόνα είναι αποτελεσματική στη μείωση της μετεμμηνοπαυσιακής οστικής απώλειας (Fitzpatrick, 2006). Πέρα από τη χρήση της για τη θεραπεία των μετεμμηνοπαυσιακών συμπτωμάτων, έχει πιθανώς αρκετά πλεονεκτήματα όσον αφορά στη μείωση του κινδύνου για οστεοαρθρίτιδα (Nevitt και συν, 1996; Zhang και συν, 1998; Spector και συν, 1997) και γνωσιακών ελλειμμάτων (Stevenson, 2004). Παρόλα αυτά, πρόσφατες μελέτες δείχνουν πως η

θεραπεία αναπλήρωσης με οιστρογόνα σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού, του ενδομητρίου, των ωοθηκών, καθώς και καρδιαγγειακής νόσου.

In vitro και in vivo μελέτες για το αποτέλεσμα της θεραπείας με οιστρογόνα δείχνουν μια αναβολική δράση των οιστρογόνων στον οστικό σχηματισμό. Η παρουσία οιστρογονικών υποδοχέων στον πυρήνα των οστεοκλαστών, μάλλον δείχνει ότι πραγματοποιείται άμεση ρύθμιση της οστικής αναδιαμόρφωσης από τα οιστρογόνα (Ericson και συν, 1988; Komm και συν, 1988; Pensler και συν, 1990).

1.3.3. Κλασσικός μηχανισμός δράσης των οιστρογόνων

Η βιολογική δράση των οιστρογόνων ασκείται μέσω της ειδικής και με υψηλή συγγένεια σύνδεσής τους με συγκεκριμένες ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες, τους υποδοχείς των οιστρογόνων (Estrogen Receptors – ERs). Οι ERs αποτελούν μέλη της μεγάλης οικογένειας ενδοπυρηνικών πρωτεϊνών – υποδοχέων (Nuclear Receptor Superfamily). Οι οιστρογονικοί υποδοχείς είναι μεταγραφικοί παράγοντες που μπορούν να επάγουν ή να καταστείλουν τη μεταγραφή των γονιδίων που περιέχουν ειδικές αλληλουχίες απόκρισης στα οιστρογόνα (Bord και συν, 2001).

Οι κλασσικοί υποδοχείς οιστρογόνων (ERs) εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων (Mangelsdorf και συν, 1995; Razandi και συν, 1999). Αρκετά όμως ερευνητικά δεδομένα υποστηρίζουν τη δράση των οιστρογόνων διαμέσου υποδοχέων που εντοπίζονται στη μεμβράνη, αν και οι λεπτομέρειες για τη δράση τους είναι ανεπαρκείς. Σχετικά πρόσφατα, μελετήθηκε στις κυτταρικές μεμβράνες η ύπαρξη και άλλων μορίων, τα οποία σχετίζονται με

τους ERs και εκτιμήθηκε η πιθανή μετα-μεταγραφική τροποποίηση της μεμβρανικής τους εντόπισης (Haynes και συν, 2003). Οι επιδράσεις των οιστρογόνων αφορούν άμεσα κύτταρα, τα οποία με τη σειρά τους επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των χονδροκυττάρων, τη διαφοροποίηση και τη σύνθεση της εξωκυττάριας μήτρας και έμμεσα άλλες ορμόνες και τοπικούς παράγοντες που εκκρίνονται από τα κύτταρα ως απάντηση στην οιστρογονική διέγερση (Nasatzky και συν, 1994).

Υπάρχουν δύο υπότυποι των ERs, οι ERα και ERβ, οι οποίοι είναι διακριτές πρωτεΐνες, που κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια εντοπισμένα σε διαφορετικά χρωμοσώματα. Ο οιστρογονικός υποδοχέας α (ERα) αποτελείται από 600 αμινοξέα, έχει μοριακό βάρος 66 kDa και περιλαμβάνει πέντε διαφορετικά, από λειτουργικής άποψης, τμήματα. Ο οιστρογονικός υποδοχέας β (ERβ) έχει δομή παρόμοια με εκείνη του ERα, με βραχύτερα όμως τμήματα, αποτελείται από 530 αμινοξέα και το μοριακό του βάρος είναι 54.2 kDa (Mangelsdorf και συν, 1995). Ο ERβ συνδέεται στην ίδια περιοχή του DNA στην οποία συνδέεται και ο ERα. Ο ERα εκφράζεται ευρέως και αποτελεί την επικρατούσα μορφή οιστρογονικού υποδοχέα στο μαστό, τη μήτρα και τα οστά. Αντίθετα, ο ERβ εκφράζεται κυρίως στις ωοθήκες, τον προστάτη, τους όρχεις, τους πνεύμονες, το σπλήνα, το θύμο αδένα και σε ορισμένες περιοχές του εγκεφάλου (Couse και συν, 1997). Οι ERα και ERβ συνυπάρχουν στον κονδυλικό χόνδρο των αρουραίων (Yu και συν, 2009).

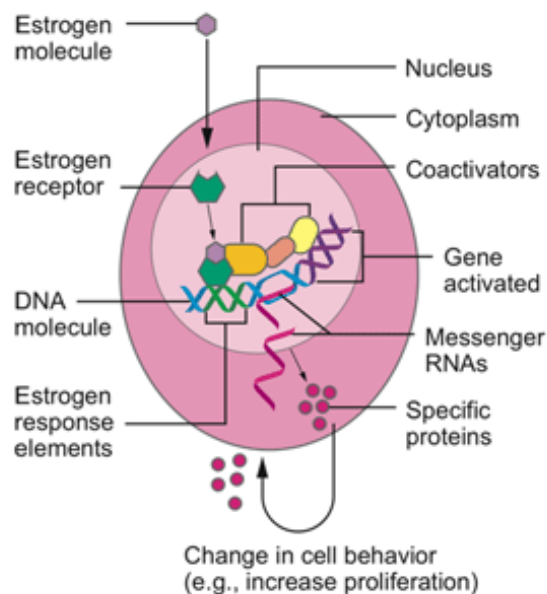
Ο οιστρογονικός υποδοχέας ανευρίσκεται υπό αδρανή μορφή στο κυτταρόπλασμα, συνδεδεμένος με ποικίλες πρωτεΐνες, οι οποίες «αποκρύπτουν» την περιοχή του για σύνδεση στο DNA (White και Parker, 1998). Η κλασική οδός ενεργοποίησης του ER ξεκινάει μετά τη σύνδεσή του με το οιστρογόνο και περιλαμβάνει την αποσύνδεση

της πρωτεΐνης 90 του θερμού shock (heat shock protein-90) και άλλων μικρομοριακών και μεγαλομοριακών ρυθμιστών, τη φωσφορυλίωση και την αλλαγή στη διαμόρφωσή του. Ακολούθως, τα ενεργοποιημένα συμπλέγματα ER/ορμόνης σχηματίζουν διμερή που συνδέονται με ειδικές αλληλουχίες του DNA, τα στοιχεία ανταπόκρισης στα οιστρογόνα (Estrogen Response Elements – EREs). Τα EREs εντοπίζονται στον υποκινητή (promoter) των ελεγχόμενων από τα οιστρογόνα γονιδίων και μεσολαβούν στην έναρξη μεταγραφής γονιδίων που ενέχονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (White και Parker, 1998; Osborne και Schiff, 2005). Πρόσφατα στοιχεία υποστηρίζουν ότι οι μηχανισμοί δράσης των οιστρογονικών υποδοχέων περιλαμβάνουν και ένα μη γενωμικό μονοπάτι (Aronica και συν, 1994; Improt-Brears και συν, 1999; Razandi και συν, 1999) (Εικόνα 1.3.2).

Οι διαφορές στην τρισδιάστατη δομή των δύο κλασσικών υποδοχέων ER στο τμήμα σύνδεσης με τον προσδέτη (LBD), εξηγούν τις διαφορετικές και συχνά αντίθετες δράσεις που εκδηλώνουν μετά την ενεργοποίησή τους. Ο ERβ είναι συχνά ανταγωνιστής της δράσης του ERα, παρεμποδίζοντας την ενεργοποίηση των ανταποκρινόμενων στον ERα γονιδίων (Gustafsson και Warner, 2000).

Τα χονδροκύτταρα των κονίκλων διαθέτουν ειδικούς υποδοχείς για την 17β-οιστραδιόλη, υποστηρίζοντας ότι η άμεση ρύθμιση του κυτταρικού μεταβολισμού από τις ορμόνες του φύλου στα χονδροκύτταρα μεσολαβείται μέσω των υποδοχέων τους (Dayani και συν, 1988). Η ικανότητα της οιστραδιόλης για πρόσδεση στους ERs έχει βρεθεί σημαντικά μεγαλύτερη στα χονδροκύτταρα των θηλυκών, συγκριτικά με τα αρσενικά, ενώ φαίνεται να προάγει τη ρύθμιση της πυρηνικής έκφρασης του ER

στα χονδροκύτταρα, επάγοντας έτσι τις επιδράσεις της σε αυτά (Nasatzky και συν, 1994; Richmond και συν, 2000).



<http://www.ubooks.pub>

Εικόνα 1.3.2: Τρόπος δράσης των οιστρογόνων μέσω των οιστρογονικών υποδοχέων.

1.3.4. Εκλεκτικοί ρυθμιστές οιστρογονικών υποδοχέων (SERMs)

Οι SERMs είναι παράγοντες που δρουν τροποποιητικά στους οιστρογονικούς υποδοχείς. Μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως καλοί αντικαταστάτες στη θεραπεία ορμονικής υποκάστασης, που εφαρμόζεται για την αντιμετώπιση των μετεμμηνοπαυσιακών συμπτωμάτων. Ένα χαρακτηριστικό που διαφοροποιεί αυτές τις ενώσεις από τους απλούς αγωνιστές και ανταγωνιστές των υποδοχέων των οιστρογόνων είναι ότι η δράση τους ποικίλλει στους διάφορους ιστούς-στόχους των οιστρογόνων, με αποτέλεσμα επιλεκτικά να αναστέλλουν ή να διεγείρουν τη δράση των οιστρογόνων σε διάφορους ιστούς. Για παράδειγμα, ένας SERM, η ταμοξιφένη,

λειτουργεί ως ανταγωνιστής οιστρογόνων στο μαστό και ως αγωνιστής στη μήτρα. Από την άλλη, η ραλοξιφένη συμπεριφέρεται ως ανταγωνιστής και στους δύο προαναφερθέντες ιστούς. Πιο συγκεκριμένα, η ραλοξιφένη έχει αντι-οιστρογονικές δράσεις στη μήτρα και στο μαστό και οιστρογονικές δράσεις στο οστό. Χρησιμοποιείται για την πρόληψη της οστεοπόρωσης στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Πιστεύεται ότι η ραλοξιφένη είναι το ίδιο αποτελεσματική με την ταμοξιφένη στη μείωση της συχνότητας του καρκίνου του μαστού στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, ενώ παρουσιάζονται και λιγότερες περιπτώσεις καρκίνου της μήτρας. Από την άλλη, η χρήση της ραλοξιφένης μπορεί να έχει τερατογενετικές δράσεις, ενώ αντενδείκνυται σε γυναίκες με ιστορικό θρομβοεμβολικού επεισοδίου, καθώς εμφανίζει αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης θρομβώσεων (Riggs και Hartmann, 2003; Victor και συν, 2006).

1.3.5. Φυτικά ανάλογα των οιστρογόνων

Τα φυτικά ανάλογα των οιστρογόνων είναι ξενο-οιστρογόνα προερχόμενα από τα φυτά, τα οποία δεν παράγονται από το ενδοκρινικό σύστημα, αλλά προσλαμβάνονται με τη βρώση των αντίστοιχων φυτών και των προϊόντων τους. Τα φυτοοιστρογόνα ανήκουν σε μία μεγάλη ομάδα αποτελούμενη από φυσικές φαινολικές ενώσεις, ενώ ασκούν τις δράσεις τους συνδεδεμένα με τους οιστρογονικούς υποδοχείς. Φυτοοιστρογόνα έχουν βρεθεί σε διάφορα προϊόντα, όπως στη σόγια και τα προϊόντα της, στο σουσάμι, το λιναρόσπορο, τη βρώμη, το

κριθάρι, τα φασόλια, τη φακή, το ρύζι, τα μήλα, τα καρότα, τα ρόδια, το λάδι και άλλα (Yildiz, 2005).

Κλινικές μελέτες υποστηρίζουν ότι τα φυτικά ανάλογα των οιστρογόνων μπορούν αποτελεσματικά να αυξήσουν την πυκνότητα του οστού των σπονδύλων και του ισχίου σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες χωρίς αρνητικές επιδράσεις (Morabito και συν, 2002; Chen και συν, 2004; Wu και συν, 2006; Marini και συν, 2007). Παράλληλα, χορήγηση φυτικών αναλόγων των οιστρογόνων (Oleuropein, OH-tyrosol) σε μοντέλα ποντικών και αρουραίων για μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση οδήγησε σε μείωση της οστικής απώλειας (Saleh και Saleh, 2011; Hagiwara και συν, 2011; Keiler και συν, 2014). Ωστόσο, δεν έχει μελετηθεί έως τώρα η επίδρασή τους στον κόνδυλο της κάτω γνάθου. Διάφορες μελέτες δείχνουν ότι οι γυναίκες από την Ασία που ακολουθούν παραδοσιακές δίαιτες υψηλές σε ισοφλαβόνες από σόγια έχουν χαμηλότερο κίνδυνο μετεμμηνοπαυσιακών καταγμάτων συγκριτικά με τις Καυκάσιες (Setchell και Lydeking-Olsen, 2003; Messina και συν, 2004). Εκ των ανωτέρω συνάγεται ότι η χρήση των φυτοοιστρογόνων μπορεί να παρέχει μία εναλλακτική οδό αντιμετώπισης της οστεοπόρωσης.

1.4. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΣΤΟΝ ΚΟΝΔΥΛΟ ΤΗΣ ΚΑΤΩ ΓΝΑΘΟΥ ΚΑΙ Η ΣΧΕΣΗ ΤΟΥΣ ΜΕ ΤΙΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΤΗΣ ΚΓΔ

1.4.1. Επίδραση ανεπάρκειας οιστρογόνων στον κόνδυλο της κάτω γνάθου

Η επίπτωση της απουσίας οιστρογόνων στον κονδυλικό χόνδρο έχει μελετηθεί από αρκετούς ερευνητές. Στις κροταφογναθικές διαρθρώσεις ωθηκεκτομημένων ζώων έχει παρατηρηθεί αυξημένο πάχος κονδυλικού χόνδρου αλλά και εκφυλιστικές αλλαγές (Okuda και συν, 1996; Yamashiro και Takano-Yamamoto, 1998; Yasuoka και συν, 2000; Cheng και συν, 2000; Fujita και συν, 2001; 2006), ενώ φαίνεται ότι επηρεάζεται η διαμόρφωση της κονδυλικής κεφαλής, λόγω αύξησης των TRAP-θετικών κυττάρων και μείωσης του όγκου του σπογγώδους οστού (Fujita και συν, 1998).

Οι Okuda και συν, το 1996, μελέτησαν την επίδραση της αφαίρεσης των ωθηκών στις κροταφογναθικές διαρθρώσεις αναπτυσσόμενων ποντικών. Κατέληξαν ότι η αποστέρηση οιστρογόνων στα ποντίκια κατά την εφηβεία, προδιαθέτει για αλλοιώσεις στις κροταφογναθικές διαρθρώσεις επηρεάζοντας τα επίπεδα καλσιτονίνης του ορού και τις παραθυρεοειδικές ορμόνες. Επιπρόσθετα, έχει δείχθει ότι στα αναπτυσσόμενα ποντίκια, η ωθηκεκτομή οδηγεί σε διαταραχή της κρανιοπροσωπικής και μηριαίας οστικής αύξησης, καθώς και σε μείωση της έκφρασης των υποδοχέων οιστρογόνων στα χονδροκύτταρα (Fujita και συν, 2004; Márquez Hernández και συν, 2011).

Επιπλέον, οι κόνδυλοι της κάτω γνάθου ενήλικων ωθηκεκτομημένων αρουραίων παρουσίασαν σημαντικά χαμηλότερο όγκο οστού 1 μήνα μετά την ωθηκεκτομή, συγκριτικά με τα ψευδο-χειρουργημένα ποντίκια της ομάδας ελέγχου (Tanaka και συν, 1998; Nakajima και συν, 2000). Παρόλα αυτά, μελέτες σε αρουραίους με σκελετική οστεοπόρωση έχουν δείξει ότι η ωθηκεκτομή από μόνη της δεν οδηγεί σε απώλεια σπογγώδους οστού ή σε αλλαγές στο πάχος του συμπαγούς οστού της

κάτω γνάθου, αλλά απαιτείται συνδυασμός με επιπρόσθετους παράγοντες, ώστε να επαχθεί αξιοσημείωτη απώλεια του οστού της κάτω γνάθου (Moriya και συν, 1998; von Wowern, 2001; Jiang και συν, 2003). Όμως, η πλειοψηφία των μελετών που ασχολούνται με αλλαγές προκαλούμενες από μείωση των οιστρογόνων και με απορρόφηση του φατνιακού οστού δε λαμβάνουν υπόψιν τους τη φόρτιση που προέρχεται από τη μάσηση και τη συνολική επίδρασή της στην οστική μάζα της κάτω γνάθου. Η εν λόγω μηχανική φόρτιση από τη σύγκλειση φαίνεται να επιδρά σημαντικά στη δομή και τη μορφολογία του κονδύλου της κάτω γνάθου. Όταν πραγματοποιήθηκε απομάκρυνση των τομέων αρουραίων ή όταν τους χορηγήθηκε μαλακή δίαιτα, ώστε να μειωθεί η μηχανική φόρτιση στον κόνδυλο, η πυκνότητα του σπογγώδους οστού των κονδύλων μειώθηκε σημαντικά (Hinton και Carlson, 1986). Σε άλλο πείραμα, όπου ακινητοποιήθηκε πλήρως η κάτω γνάθος, παρατηρήθηκε επιπέδωση του κονδύλου και μειωμένη πυκνότητα σπογγώδους οστού (Shimahara και συν, 1991).

Οι Abubaker και συν (1996) βρήκαν ότι τα οιστρογόνα συνδυαζόμενα με προγεστερόνη οδήγησαν σε μείωση της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης στην ΚΓΔ ωοθηκεκτομημένων αρουραίων. Παράλληλα, η αλλαγή στο περιεχόμενο της πρωτεογλυκάνης στον κονδυλικό χόνδρο είναι ένα από τα πρώιμα σημάδια εκφυλιστικής νόσου της ΚΓΔ (Hinton και Stinson, 1997; Hinton, 1988). Εντούτοις, έχει φανεί ότι οι εκφυλιστικές διαταραχές της ΚΓΔ μειώνονται με την ηλικία, ενώ στην εμμηνόπαυση αυξάνεται η συχνότητα των διαταραχών αυτών στις γυναίκες που λαμβάνουν συμπληρώματα οιστρογόνων (Rasmussen, 1981; Boering και συν, 1990; LeResche και συν, 1993; 1994; McNamara, 1997).

Σχετικά πρόσφατα, μετρήθηκε η οστική πυκνότητα του ανθρώπινου κονδύλου με υπολογιστική τομογραφία και φάνηκε ότι μειώνεται γρήγορα μετά την εμμηνόπαυση, γεγονός που υποδεικνύει ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης και των αλλαγών στον κόνδυλο της κάτω γνάθου (Yamada και συν, 1997).

Το περίοστεο παίζει σημαντικό ρόλο στην αύξηση του κονδυλικού χόνδρου, καθώς η ινώδης και πολλαπλασιαζόμενη στιβάδα του κονδύλου προέρχονται από αυτό. Η αναδιαμόρφωση του οστού κάτω από το χόνδρο μπορεί να είναι το «κλειδί» για τη διαλεύκανση των επιδράσεων των ορμονών του φύλου στην παθογένεια των διαταραχών της ΚΓΔ. Όταν παρατηρείται μείωση των οιστρογόνων, παρατηρείται και ανισορροπία στην αναδιαμόρφωση του οστού λόγω αυξημένης οστεοκλαστικής δραστηριότητας (Steiniche και συν, 1989). Τα οιστρογόνα φαίνεται να είναι σημαντικά για τη διατήρηση φυσιολογικού όγκου οστού κάτω από το χόνδρο, καθώς και φυσιολογικού κονδυλικού χόνδρου.

1.4.2. Επίδραση χορήγησης οιστρογόνων στον κόνδυλο της κάτω γνάθου

Μελέτες που αφορούν την επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων εξωγενών οιστρογόνων στον κονδυλικό χόνδρο και στα χονδροκύτταρα δείχνουν πως αυτά παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση της μορφολογίας και της λειτουργίας των κονδυλικών χόνδρων και ως εκ τούτου στις διαταραχές της ΚΓΔ (Yamashiro και Takano-Yamamoto, 1998; Ng και συν, 1999; Yasuoka και συν, 2000; Cheng και συν, 2003; Talwar και συν, 2006). Πιο συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι χορήγηση

οιστρογόνων σε αρουραίους οδηγεί σε μείωση του πάχους και του πολλαπλασιασμού του κονδυλικού χόνδρου (Okuda και συν, 1996; Talwar και συν, 2006). Επιπλέον υποστηρικτικό στοιχείο της συσχέτισης των οιστρογόνων με τις διαταραχές της ΚΓΔ, αποτελεί και η παρουσία οιστρογονικών υποδοχέων (ERs) στους κονδυλικούς χόνδρους, που αναφέρεται από πολλές μελέτες (Yamada και συν, 2003; Yu και συν, 2009).

Από αρχική μελέτη που έγινε από τον Shira το 1986, σε 5 θηλυκές μαϊμούδες, για την ανίχνευση υποδοχέων 17β-οιστραδιόλης αποδείχτηκε ότι το σύμπλεγμα της κροταφογναφικής διάθρωσης περιέχει μεγάλο αριθμό κυττάρων με υποδοχείς για οιστρογόνα και ιδιαίτερα η αρθρική επιφάνεια του κονδύλου, του διαρθρίου δίσκου και της αρθρικής κάψας. Ως αποτέλεσμα μπορεί να υποτεθεί ότι οι ορμόνες αυτές μπορεί να παίζουν κάποιο ρόλο στη διατήρηση, επανόρθωση, ή/ και παθολογία των κροταφογναθικών διαρθρώσεων.

Μεταγενέστερα, με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας και του *in situ* υβριδισμού, οι Yamada και συν (2003) εντόπισαν τον ERα στον κονδυλικό χόνδρο αρσενικών αρουραίων. Φάνηκε, μάλιστα, ότι τα οιστρογόνα έχουν το δυναμικό να διαμορφώσουν την ανάπτυξη και τη λειτουργία του κονδυλικού χόνδρου. Έχει μάλιστα συζητηθεί η πιθανότητα τα οιστρογόνα να παράγονται όχι μόνο από τις γονάδες, αλλά και από το χόνδρο και το οστό, όπου μπορούν να δράσουν τοπικά με έναν παρακρινή ή εσωκρινή τρόπο (Simpson και συν, 2002). Τα οιστρογόνα που συντίθενται από κύτταρα του οστού που εκφράζουν την αρωματάση, (που είναι απαραίτητη για τη σύνθεση των οιστρογόνων) μπορεί να έχουν σημαντική επίδραση σε επίπεδο σκελετικού ιστού, ανεξαρτήτως των κυκλοφορούντων

επιπέδων οιστρογόνων (Yu και συν, 2009; Riancho και συν, 2010). Ένας πιθανός μηχανισμός με τον οποίο επιδρούν τα οιστρογόνα στο μεταβολισμό του κονδυλικού χόνδρου είναι μέσω των ERs στα χονδροκύτταρα (Ushiyama και συν, 1999). Τα χονδροκύτταρα του κονδυλικού χόνδρου εκφράζουν αρωματάση (Yu και συν, 2006) και έτσι η σύνθεση των οιστρογόνων μπορεί να πραγματοποιηθεί και τοπικά. Παρόλα αυτά, στη βιβλιογραφία, λίγες αναφορές υπάρχουν που να εστιάζουν στην τοπική έκφραση των οιστρογόνων στον κονδυλικό χόνδρο.

Η χορήγηση οιστραδιόλης έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με διάβρωση του κονδυλικού χόνδρου σε μεγαλύτερη συχνότητα και σοβαρότητα σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου που έχουν θεραπευτεί με ουσίες placebo (Rosner και συν, 1982; Ng και συν, 1999). Αυτή η επίδραση της οιστραδιόλης στην παθολογία της άρθρωσης συνοδευόταν από επίδραση στο μεταβολισμό του χόνδρου, με αξιοσημείωτη μείωση στη σύνθεση θειϊκής πρωτεογλυκάνης στον κονδυλικό χόνδρο (Rosner και συν, 1979). Αυτές οι παρατηρήσεις για την επίδραση της οιστραδιόλης στην παθολογία του κονδυλικού χόνδρου *in vivo* και στο μεταβολισμό των χονδροκυττάρων *in vitro* προτείνουν ένα ρόλο των οιστρογόνων στην παθογένεση των διαταραχών της ΚΓΔ (Rosner και συν, 1983).

Οι Yasuoaka και συν, το 2000, έκαναν μία έρευνα για να διευκρινιστεί η δράση των οιστρογόνων στην κροταφογναθική διάρθρωση και για να εκτιμηθεί η θεραπευτική δράση της 17β-οιστραδιόλης ως ορμονικό υποκατάστατο σε αναπτυσσόμενα ποντίκια που υπέστησαν ωοθηκεκτομή. Κατέληξαν ότι τα οιστρογόνα σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναδόμηση των κροταφογναθικών διαρθρώσεων.

Από την άλλη, αποδείχθηκε ότι με την έναρξη της ορμονοθεραπείας, ο βαθμός κρανιογναθικής δυσλειτουργίας, στην πλειοψηφία των γυναικών που έπασχαν από σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (ποσοστό 70%), επιδεινώθηκε ανεξαρτήτως ενδοστοματικών συγκλεισιακών ευρημάτων (Ανδρικοπούλου, 2003). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί αυξημένη συχνότητα χρήσης οιστρογόνων στις γυναίκες με διαταραχές της ΚΓΔ συγκριτικά με γυναίκες ίδιας ηλικίας χωρίς τέτοια συμπτώματα (Abubaker και συν, 1992).

Οι Loewit και συν (1973) υποστήριξαν ότι η ανισορροπία των στεροειδών ορμονών και συγκεκριμένα των οιστρογόνων είναι επιβαρυντικός παράγοντας για τη δυσλειτουργία της ΚΓΔ, καθώς βρέθηκε ότι 70% των νεαρών γυναικών που υπέφεραν από μία τέτοια δυσλειτουργία εμφάνιζαν ανωμαλίες στο επίπεδο των ορμονών του φύλου στον ορρό.

Η πιθανότητα, λοιπόν, τα οιστρογόνα να ευνοούν τη λειτουργία της ΚΓΔ φαίνεται παράδοξη εξ' αιτίας της γνωστής επίδρασης των υψηλών θεραπευτικών δόσεων οιστρογόνων στην εμφάνιση διαταραχών της ΚΓΔ. Αυτά τα αντικρουόμενα αποτελέσματα δείχνουν ότι η υπερβολική εξωγενής δόση ορμονών είναι ένας προδιαθεσικός παράγοντας για εμφάνιση διαταραχών της ΚΓΔ, όμως η ενδογενής ορμόνη είναι απαραίτητη για την αναδιαμόρφωση της ΚΓΔ.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν να εξεταστεί η επίδραση της χορήγησης οιστραδιόλης, ραλοξιφένης και φυτικών αναλόγων τους στον κόνδυλο της κάτω γνάθου ωοθηκεκτομημένων θηλυκών μυών.

ΥΠΟΘΕΣΗ

Η υπόθεση της παρούσας μελέτης ήταν ότι οι ωοθηκεκτομημένοι μύες, οι οποίοι θα ελάμβαναν οιστραδιόλη, ραλοξιφένη και φυτικά ανάλογα με οιστρογονική δράση, θα εμφάνιζαν μεταβολές στην οστική πυκνότητα, στη δομή και μορφολογία του κονδύλου της κάτω γνάθου, καθώς και στην έκφραση του οιστρογονικού υποδοχέα β σε σύγκριση με την ομάδα των πειραματόζωνων, στα οποία θα χορηγούνταν μόνο το έκδοχο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο σχεδιασμός της μελέτης αφορά στη δημιουργία ομάδων ενήλικων θηλυκών μυών, στους οποίους πραγματοποιήθηκε ωθηκεκτομή και άμεση ορμονική αναπλήρωση επί 4 εβδομάδες, με διαφορετικές οιστρογονικές ενώσεις, ενώ υπήρχαν και δύο ομάδες ελέγχου (ψευδο-ωθηκεκτομημένα και ωθηκεκτομημένα πειραματόζωα που ελάμβαναν το έκδοχο). Ο σχεδιασμός και η συνολική πειραματική διαδικασία (ανατροφή μυών, ωθηκεκτομή, χορήγηση ενώσεων και θυσία πειραματόζωων) οργανώθηκε και συντονίστηκε από το Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών (Ινστιτούτο Βιολογίας, Ιατρικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Ορμονικών Υποδοχέων, Διευθυντής Δρ Μ.Ν. Αλέξης), στα πλαίσια ενός ευρύτερου ερευνητικού προγράμματος.

Το δείγμα αποτελείτο από 57 θηλυκούς μύες C57, ηλικίας 6 μηνών, στους 50 από τους οποίους πραγματοποιήθηκε ωθηκεκτομή (ovariectomy, OVX), με ραχιαία προσπέλαση υπό γενική αναισθησία. Στα υπόλοιπα 7 πειραματόζωα διενεργήθηκε χειρουργική επέμβαση, χωρίς την αφαίρεση των ωθηκών (sham-operation), προκειμένου να διέλθουν από τη διαδικασία της αναισθησίας, καθώς και του χειρουργείου.

Στη συνέχεια, τα πειραματόζωα διαχωρίστηκαν σε 9 ομάδες ως εξής:

1^η ομάδα ($n = 7$), περιλάμβανε τους μη-ωθηκεκτομημένους μύς, που έλαβαν το έκδοχο (ομάδα SHAM)

2^η ομάδα (n = 7), περιλάμβανε τους ωθηκεκτομημένους μύς που έλαβαν το έκδοχο (ομάδα OVX)

3^η ομάδα (n = 7), περιλάμβανε τους ωθηκεκτομημένους μύς που έλαβαν οιστραδιόλη (Ethinyl Estradiol) σε σχήμα 20mg/κιλό βάρους/ημέρα (ομάδα EE)

4^η ομάδα (n=6), περιλάμβανε τους ωθηκεκτομημένους μύς που έλαβαν ραλοξιφένη (Raloxifen) σε δόση 200mg/κιλό βάρους/ημέρα (ομάδα RAL)

5^η ομάδα (n=6), περιλάμβανε τους ωθηκεκτομημένους μύς που έλαβαν Oleamed σε δόση 50mg/κιλό βάρους/ημέρα (ομάδα OLEAMED)

6^η ομάδα (n=6), περιλάμβανε τους ωθηκεκτομημένους μύς που έλαβαν σησαμέλαιο (Sesame) σε δόση 50mg/κιλό βάρους/ημέρα (ομάδα SESAME)

7^η ομάδα (n=6), περιλάμβανε τους ωθηκεκτομημένους μύς που έλαβαν Onobrychis σε δόση 50mg/κιλό βάρους/ημέρα (ομάδα ONOBRYCHIS)

8^η ομάδα (n=6), περιλάμβανε τους ωθηκεκτομημένους μύς που έλαβαν Oleuropein σε δόση 50mg/κιλό βάρους/ημέρα (ομάδα OLEUROPEIN)

9^η ομάδα (n=6), περιλάμβανε τους ωθηκεκτομημένους μύς που έλαβαν Hydroxy-tyrosol σε δόση 50mg/κιλό βάρους/ημέρα (ομάδα OH-TYROSOL)
(Πίνακας 2.1).

Οι οιστρογονικές ενώσεις (ή το έκδοχο = καλαμποκέλαιο) χορηγήθηκαν υποδόρια από την επόμενη μέρα της επέμβασης και σε ημερήσια βάση, για 7 ημέρες/εβδομάδα και για διάστημα 4 εβδομάδων. Όσον αφορά στην προέλευση

των φυτικών αυτών αναλόγων, το Oleamed προέρχεται από τις πράσινες ελιές, το Sesame από το σουσάμι, το Onobrychis αποτελεί βότανο της οικογένειας των ψυχανθών, το Oleuropein είναι φαινυλιδαντοΐνη στα φύλλα ελιάς και το Hydroxytyrosol είναι, επίσης, φαινυλιδαντοΐνη, που περιέχεται στα φύλλα ελιάς και το ελαιόλαδο. Κατά τη διάρκεια χορήγησης των ουσιών, εφαρμόστηκε για όλα τα πειραματόζωα κοινό διατροφικό πρόγραμμα με ειδική τροφή από την οποία απουσίαζαν τυχόν φυτο-οιστρογόνα (παράγωγα σόγιας), καθώς και καθημερινός έλεγχος φυσικής κατάστασης και σωματικού βάρους.

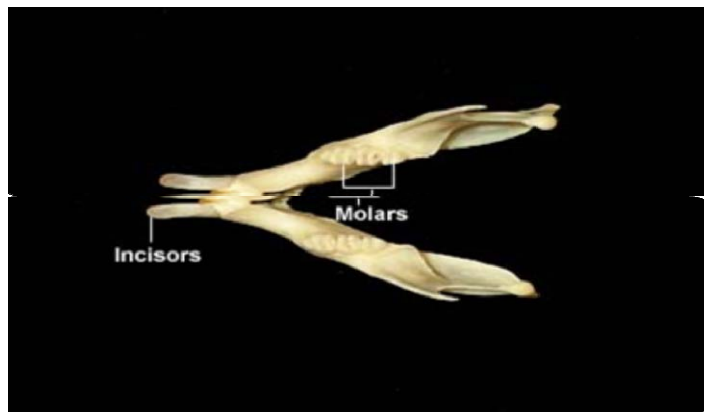
		ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΜΥΩΝ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΜΥΩΝ	ΔΟΣΟΛΟΓΙΑ
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ	1	SHAM + VEHICLE	7	20mg/ κιλό βάρους/ μέρα
	2	OVX + VEHICLE	7	20mg/ κιλό βάρους/ μέρα
	3	OVX+ EE	7	50mg/ κιλό βάρους/ μέρα
	4	OVX+ RALOXIFENE	6	50mg/ κιλό βάρους/ μέρα
	5	OVX+ OLEAMED	6	50mg/ κιλό βάρους/ μέρα
	6	OVX+ SESAME	6	50mg/ κιλό βάρους/ μέρα
	7	OVX+ ONOBRYCHIS	6	50mg/ κιλό βάρους/ μέρα
	8	OVX+ OLEUROPEIN	6	50mg/ κιλό βάρους/ μέρα
	9	OVX+ HYDROXY-TYROSOL	6	50mg/ κιλό βάρους/ μέρα

Πίνακας 2.1: Ομάδες πειραματοζώων της μελέτης και δοσολογία χορηγούμενων ενώσεων.

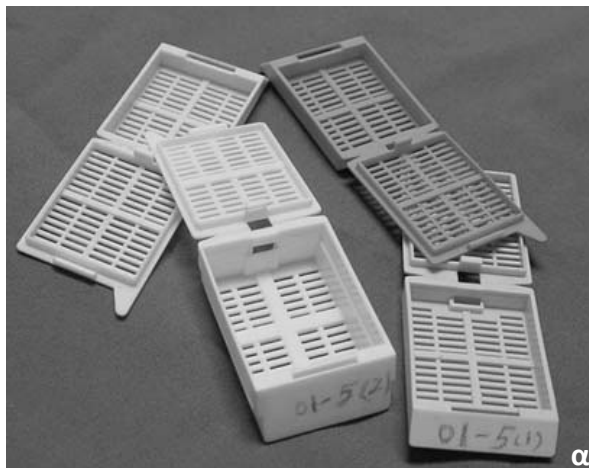
Μετά την παρέλευση των 4 εβδομάδων από την ωθηκεκτομή, την 29^η ημέρα, πραγματοποιήθηκε η θυσία των μυών με την τεχνική της αυχενικής μετατόπισης. Έγινε συλλογή της κεφαλής των μυών, με σκοπό την απομόνωση της κάτω γνάθου, ενώ το υπόλοιπο σώμα χρησιμοποιήθηκε για τη συλλογή ιστών, όπως της μήτρας, των μαστικών αδένων, του ήπατος, των μηριαίων οστών, και παράλληλα, έγινε λήψη αίματος και μυελού των οστών. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, αξιοποιήθηκε η κάτω γνάθος, ενώ τα υπόλοιπα δείγματα, που συλλέχθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν για τη διενέργεια άλλων μετρήσεων του ερευνητικού προγράμματος στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών.

2.1.1. Επεξεργασία οστών γνάθου

Η απομόνωση της κάτω γνάθου πραγματοποιήθηκε με αποκόλλησή της από την κεφαλή του μυός και διαχωρισμό της στη συνέχεια σε δύο ημίσεα (Εικόνα 2.1). Τα δύο ημίσεα τοποθετήθηκαν σε ξεχωριστές κασέτες ιστοτεμαχιδίων (Εικόνα 2.2). Αμέσως μετά, η κασέτα με το ένα ήμισυ της κάτω γνάθου τοποθετήθηκε σε κλειστό δοχείο με αιθανόλη 70% και φυλάχθηκε στο ψυγείο, έως ότου χρησιμοποιηθεί για ακτινολογική ανάλυση. Η κασέτα με το άλλο ήμισυ της κάτω γνάθου τοποθετήθηκε σε διάλυμα ουδέτερης φορμόλης (Neutral Buffered Formalin), για μονιμοποίηση με σκοπό την ιστολογική παρατήρηση (Εικόνες 2.1, 2.2).



Εικόνα 2.1: Διαχωρισμός κάτω γνάθου σε δύο ημίσεα.

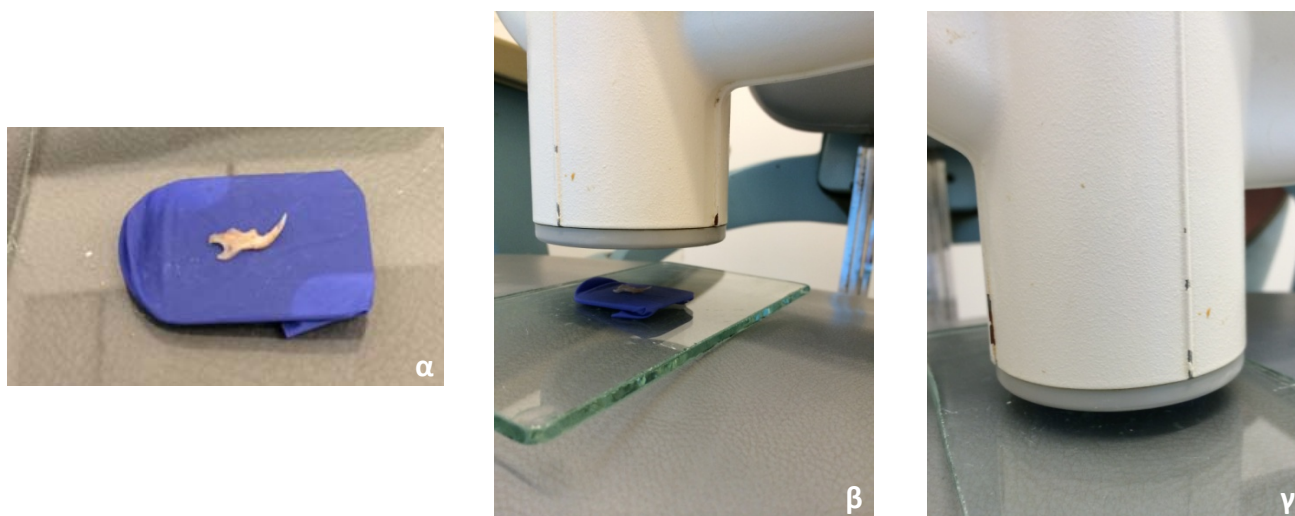


Εικόνα 2.2 α,β,γ: Κασέτες ιστοτεμαχιδίων

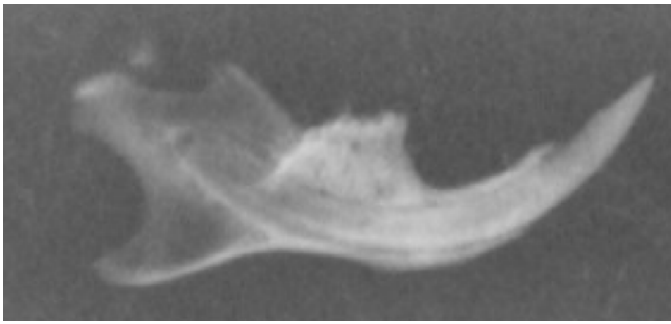
2.2. ΑΚΤΙΝΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΙ ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ

2.2.1. Με χρήση ακτινογραφικού μηχανήματος

Ελήφθησαν ακτινογραφίες στα ημίσεια των κάτω γνάθων όλων των πειραματοζώων. Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ψηφιακής λήψης με πλάκες φωσφόρου του συστήματος Digora Optime UV της Soredex, με επιτοίχιο ακτινογραφικό (Gendex 765DC), αυτόματης ρύθμισης των παραμέτρων έκθεσης σε 0,65kV και 7mA και δυνατότητα σύνδεσης με ψηφιακή ακτινογραφία. Τα ημίσεια των κάτω γνάθων τοποθετήθηκαν με τον ίδιο προσανατολισμό, διαδοχικά, πάνω σε γυάλινη πλάκα παράλληλη με το οριζόντιο επίπεδο, ενώ ο ακτινογραφικός κώνος ρυθμίστηκε με γωνίωση 5° και απόσταση 2mm από τα δείγματα. Ο χρόνος έκθεσης ορίστηκε στα 0.05sec (Εικόνες 2.3, 2.4).



Εικόνα 2.3 α,β,γ: Λήψη ακτινογραφιών στο ήμισυ της κάτω γνάθου των μυών.



Εικόνα 2.4: Χαρακτηριστική ακτινογραφία ημίσεως κάτω γνάθου μυός.

2.2.2. Με χρήση ψηφιακού μαστογράφου

Για την αύξηση της ευκρίνειας και της ακρίβειας των ακτινολογικών μετρήσεων, πραγματοποιήθηκαν και λήψεις σε ψηφιακό μαστογράφο. Τα ημίσεα των κάτω γνάθων που χρησιμοποιήθηκαν προηγουμένως για τη λήψη ακτινογραφιών τοποθετήθηκαν σε ειδικές ταινίες στήριξης από φελιζόλ, με σκοπό την επίτευξη παραλληλότητας με το οριζόντιο επίπεδο και κοινού επιπέδου μεταξύ των κάτω γνάθων. Στη συνέχεια, σε ιδιωτικό κέντρο διάγνωσης παθήσεων μαστού και οστεοπόρωσης (Ιατρός ακτινολόγος Σ. Π. Λαζάρου), πραγματοποιήθηκαν 2 λήψεις όλων ταυτόχρονα των γνάθων με χρήση ειδικού ψηφιακού μαστογράφου υψηλής ευκρίνειας (Selena Hologic Lorad) με την τεχνική της τομοσύνθεσης της Hologic Dimensions (0,0093 dcGy dose, 13mm thickness, 27kV, 100mA, 492ms, 49mAs) (Εικόνα 2.5 α,β).



Εικόνα 2.5: α) Τοποθέτηση των ημίσεων των κάτω γνάθων στο φελιζόλ και β) απεικόνιση με τον ψηφιακό μαστογράφο.

2.2.3. Με χρήση ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής

Πραγματοποιήθηκε λήψη φωτογραφιών με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή (Olympus nr-340, 16mp), στις κάτω γνάθους που διατηρήθηκαν σε αιθανόλη (70%). Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε μαύρο φόντο με σκοπό την αύξηση της αντίθεσης των φωτογραφιών, αλλά και της ευκρίνειας των ορίων των κονδύλων σε αυτές (Εικόνα 2.6).



Εικόνα 2.6: Χαρακτηριστική ψηφιακή φωτογραφία ημίσεως κάτω γνάθου μυός.

2.3. ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Για την ποσοτικοποίηση των απεικονιστικών δεδομένων από ακτινογραφίες, μαστογραφίες και φωτογραφίες των γνάθων, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα ανάλυσης εικόνας Image J 1.41.

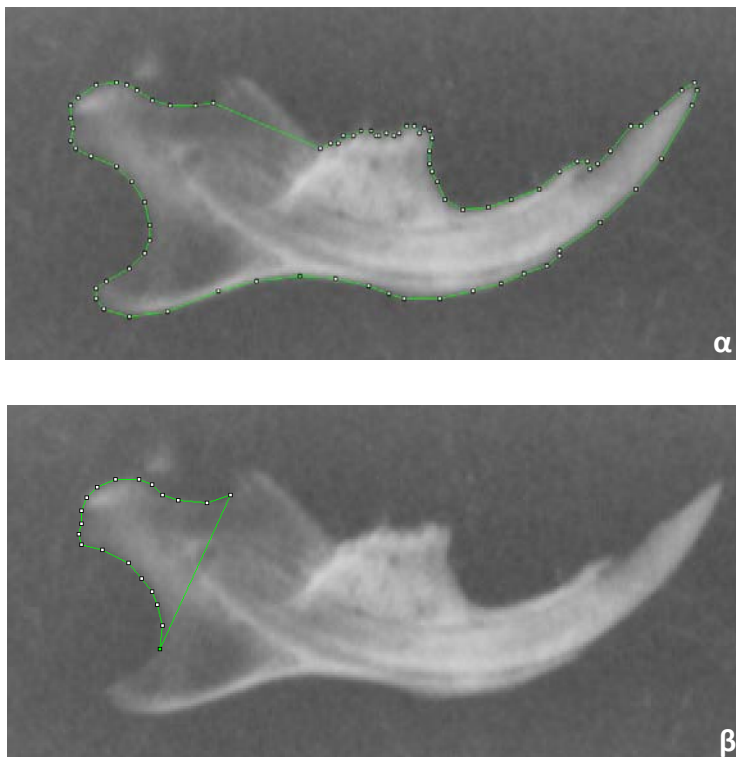
2.3.1. Ποσοτικοποίηση ακτινογραφιών

Από τις ακτινογραφίες των ημίσεων των κάτω γνάθων προσδιορίστηκε το συνολικό εμβαδόν (area) της κάτω γνάθου, καθώς και του κονδύλου. Για τον υπολογισμό του συνολικού μεγέθους της κάτω γνάθου, αρχικά έγινε μεγέθυνση της εικόνας 300% και οριοθετήθηκε η περιοχή της γνάθου προς μέτρηση. Έγινε περιγραφή ολόκληρης της κάτω γνάθου, εξαιρώντας την κορωνοειδή της απόφυση, προκειμένου να είναι συγκρίσιμες οι τελικές μετρήσεις, καθώς η περιοχή αυτή δεν υπήρχε σε όλες τις γνάθους των πειραματοζώων (Εικόνα 2.7 α).

Για τον υπολογισμό του συνολικού μεγέθους του κονδύλου, έγινε μεγέθυνση 300% και στη συνέχεια οριοθετήθηκε η περιοχή του κονδύλου προς μέτρηση. Σχεδιάστηκε ένα ευθύγραμμο τμήμα με αρχή το χαμηλότερο σημείο του κάτω τμήματος του κονδύλου και εφαπτόμενο στο πιο ακτινοσκοιρό σημείο της lamina dura του τομέα του μυός και στη συνέχεια έγινε η περιγραφή του εναπομείναντος τμήματος του κονδύλου. Ειδικότερα για τον κόνδυλο υπολογίστηκε το εμβαδόν του (area), η μέση οπτική πυκνότητα (mean grey value) και ο λόγος τους (mean grey value/area=integrated density), που αντικατοπτρίζει την οστική πυκνότητα λαμβάνοντας υπόψιν και το εμβαδόν της περιοχής (Εικόνα 2.7 β). Οι μετρήσεις για

όλες τις ομάδες των πειραματόζων επαναλήφθηκαν "τυφλά" από δύο ανεξάρτητους παρατηρητές.

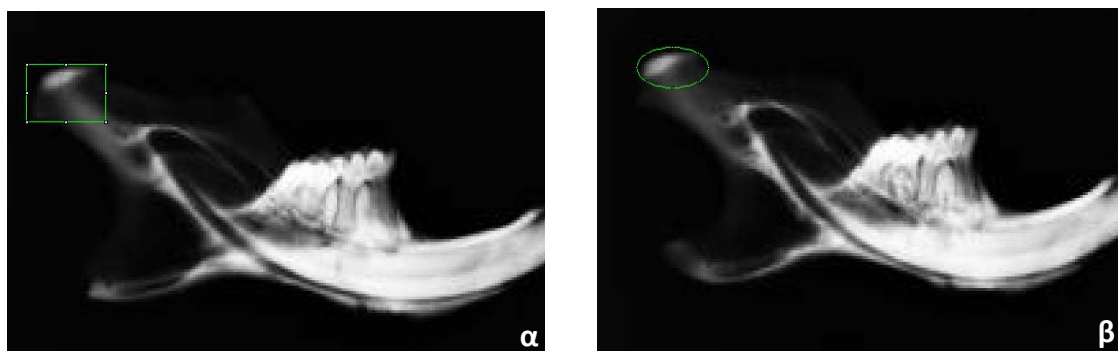
Οι μετρήσεις που αφορούσαν το εμβαδόν του συνολικού κονδύλου διαιρέθηκαν με τις μετρήσεις που αφορούσαν το εμβαδόν της συνολικής γνάθου, ώστε να εξαιρεθεί η πιθανότητα κάποια διαφορά στα αποτελέσματα να οφείλεται σε ήδη υπάρχουσα διαφορά στο μέγεθος γνάθων ανάμεσα στα πειραματόζωα και όχι στη χορηγούμενη θεραπεία.



Εικόνα 2.7: α) Μέτρηση συνολικού εμβαδού κάτω γνάθου μύος - Διακρίνεται η επιλεγμένη περιοχή
β) Μέτρηση συνολικού εμβαδού κονδύλου από τις ακτινογραφίες - Διακρίνεται η επιλεγμένη περιοχή

2.3.2. Ποσοτικοποίηση απεικονίσεων μαστογράφου

Στην ομαδική μαστογραφία των γνάθων, μετρήθηκε το εμβαδόν της κεφαλής του κονδύλου, καθώς και το μήκος του αυχένα του κονδύλου κάθε πειραματοζώου. Ο προσδιορισμός του εμβαδού της κεφαλής του κονδύλου πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του συστήματος ανάλυσης εικόνας Image J. Αρχικά, έγινε μεγέθυνση της ψηφιακής εικόνας 300%. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε κατάλληλο πλαίσιο μέτρησης, (χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά πλαίσια, οβάλ και τετράγωνου σχήματος διαστάσεων 273 και 588 pixels αντίστοιχα και οι μετρήσεις συνέπεσαν), ώστε να περιλαμβάνει πλήρως και επακριβώς την κεφαλή κάθε κονδύλου. Το ίδιο πλαίσιο χρησιμοποιήθηκε για όλους τους κονδύλους των μυών. Μετρήθηκε το εμβαδόν της σκιαγραφούμενης περιοχής (area), η μέση οπτική πυκνότητα (mean gray value) και ο λόγος τους, που αντικατοπτρίζει τη μέση οστική πυκνότητα (integrated density) για κάθε κεφαλή του κονδύλου (Εικόνα 2.8 α,β).



Εικόνα 2.8: Μετρήσεις κεφαλής κονδύλου με τετράγωνο (α) και οβάλ (β) πλαίσιο στην απεικόνιση από τον ψηφιακό μαστογράφο.

Για τον προσδιορισμό του πλάτους του αυχένα του κονδύλου, σχεδιάστηκε σε κάθε κόνδυλο ένα ευθύγραμμο τμήμα με αρχή την αυχενική περίσφιξη του άνω τμήματος του κονδύλου και κατά το δυνατόν κάθετο στην κάτω περιοχή του κονδύλου (Εικόνα 2.9).



Εικόνα 2.9: Μέτρηση του πλάτους του κονδυλικού αυχένα στην απεικόνιση από τον ψηφιακό μαστογράφο.

2.3.3. Ποσοτικοποίηση φωτογραφιών

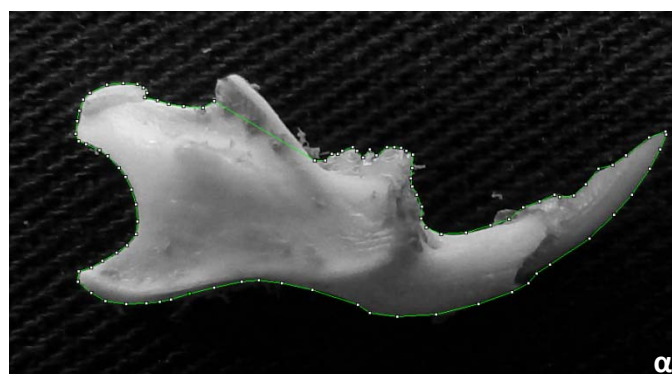
Για την ακριβέστερη μέτρηση του πλάτους του αυχένα του κονδύλου χρησιμοποιήθηκαν φωτογραφίες της κάτω γνάθου. Για τις μετρήσεις αυτές έγινε μεγέθυνση της εικόνας κατά 75%. Στη συνέχεια, με τον τρόπο που προαναφέρθηκε, σχεδιάστηκε ευθύγραμμο τμήμα με αρχή την αυχενική περίσφιξη του άνω τμήματος του κονδύλου και κατά το δυνατόν κάθετο στην κάτω περιοχή του κονδύλου, για υπολογισμό του πάχους του αυχένα του κονδύλου (Εικόνα 2.10).

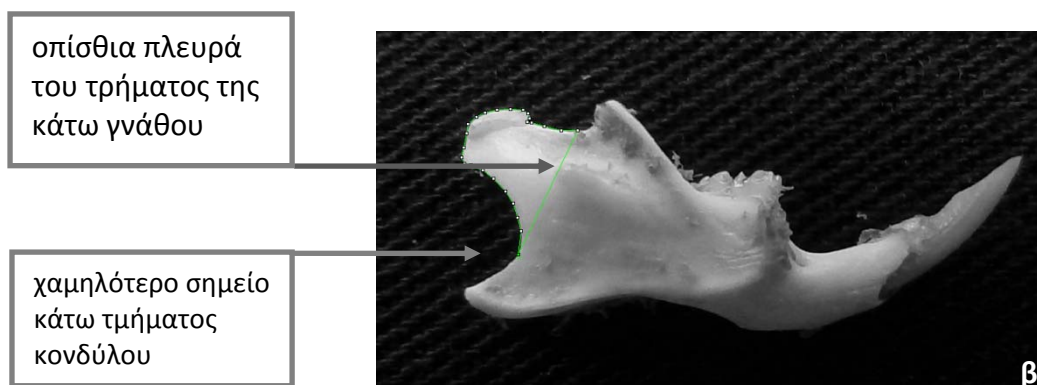


Εικόνα 2.10: Μέτρηση του πλάτους του κονδυλικού αυχένα από τις ψηφιακές φωτογραφίες.

Για τον υπολογισμό του συνολικού εμβαδού της κάτω γνάθου, έγινε μεγέθυνση της εικόνας κατά 51.6% και οριοθετήθηκε η περιοχή της γνάθου. Έγινε περιγραφή ολόκληρης της κάτω γνάθου, εξαιρώντας την κορωνοειδή απόφυση της γνάθου, όπως προηγουμένως (Εικόνα 2.11 α).

Στη συνέχεια, μετρήθηκε το εμβαδον (area), του κονδύλου. Στη μεγέθυνση της εικόνας κατά 51.6% οριοθετήθηκε η περιοχή του κονδύλου ως εξής: Σχεδιάστηκε ένα ευθύγραμμο τμήμα με αρχή το χαμηλότερο σημείο του κάτω τμήματος του κονδύλου και εφαιπτόμενο στην οπίσθια πλευρά του τμήματος της κάτω γνάθου και στη συνέχεια έγινε η περιγραφή του εναπομείναντος τμήματος του κονδύλου. (Εικόνα 2.11 β). Οι μετρήσεις έγιναν από δύο ανεξάρτητους παρατηρητές.





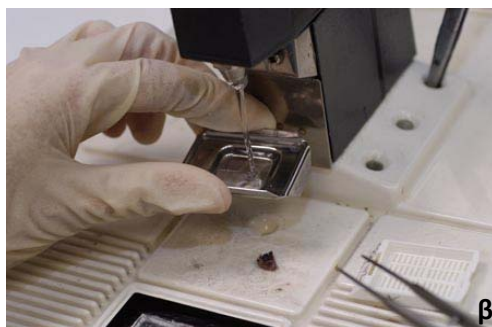
Εικόνα 2.11: α) Μέτρηση συνολικού μεγέθους ημίσεως κάτω γνάθου από τις ψηφιακές φωτογραφίες. β) Μέτρηση συνολικού μεγέθους κονδύλου.

2.4. ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Τα ημίσεα των κάτω γνάθων μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα ουδέτερης φορμόλης (4%) για 48 ώρες στο ψυγείο. Ακολούθησε ξέπλυμα με νερό και απασβεστίωση σε διάλυμα 10% EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ) pH 7,2 επί 20 μέρες, ενώ στο διάστημα αυτό πραγματοποιήθηκαν 5 ανανεώσεις του διαλύματος EDTA. Μετά την απασβεστίωση, που ελέγχθηκε με εμπειρική κάμψη, ακολούθησε ξέπλυμα με τρεχούμενο νερό επί 1 ώρα και αφυδάτωση των γνάθων με εμβάπτισή τους σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις αλκοόλης (50%, 70%, 80%, 90%, 100%). Ακολούθησε διαύγαση των δειγμάτων σε τρία διαφορετικά δοχεία με ξυλόλη, όπου και παρέμειναν για 50 λεπτά στο καθένα. Στη συνέχεια, οι γνάθοι τοποθετήθηκαν σε υγρή παραφίνη στους 60 °C για 4 ώρες. Η διαδικασία αφυδάτωσης και επώασης με παραφίνη έγινε σε ειδικό μηχάνημα ιστοκινέτας (Citadel 1000) του εργαστηρίου Ιστολογίας και Εμβρυολογίας της Ιατρικής σχολής ΕΚΠΑ. Πριν τον εγκλεισμό των

κόνδυλος κάτω γνάθου

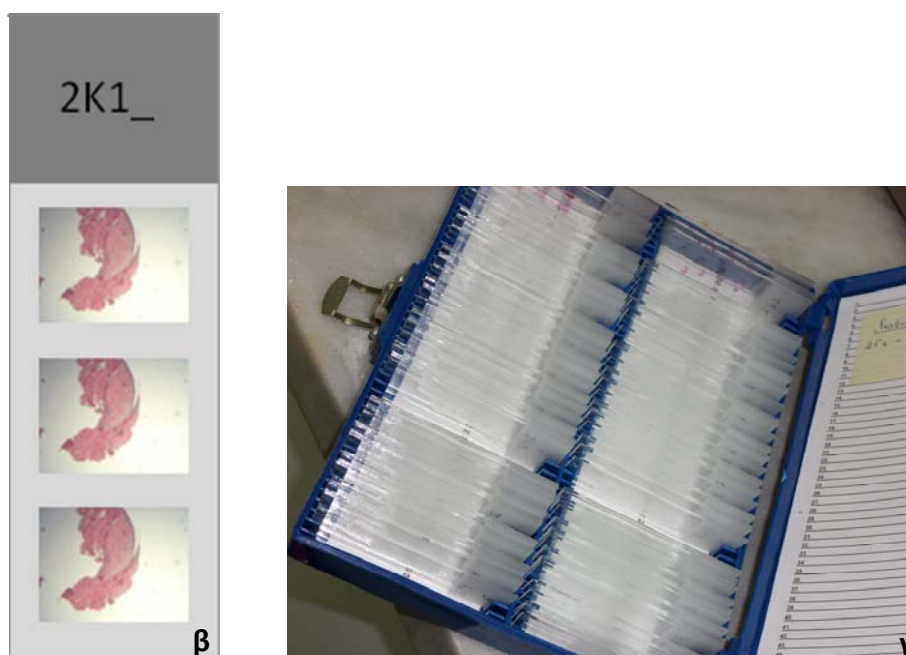
σώμα κάτω γνάθου



57

Τα μπλοκ παραφίνης κόπηκαν σε λεπτές τομές πάχους 5μm σε μικροτόμο παραφίνης (Leica RM2125), που τοποθετήθηκαν σε σιλανιοποιημένες αντικειμενοφόρους πλάκες για ενίσχυση της προσκόλλησής τους και επωάσθηκαν ολονύκτια στους 37 °C. Συνολικά, συλλέχθηκαν 18 τομές (6 αντικειμενοφόρες πλάκες, με 3 τομές σε κάθε μία) για τον κόνδυλο κάθε πειραματοζώου (Εικόνες 2.13 α,β,γ). Στην παρούσα μελέτη, έγινε προσπάθεια συλλογής μόνο των τομών που βρίσκονταν στο επίπεδο στο οποίο ήταν εμφανές το σύνολο του κονδύλου και του κονδυλικού χόνδρου, ώστε να είναι συγκρίσιμες οι μετρήσεις τους. Οι τομές αυτές χρησιμοποιήθηκαν για χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης, χρώση TPAP και ανοσοϊστοχημεία.





Εικόνα 2.13: α) Μικροτόμος παραφίνης β) Συλλογή 3 τομών ανά αντικειμενοφόρο πλάκα και γ) Κασετίνα φύλαξης για αντικειμενοφόρους πλάκες.

2.4.1. Χρώση Αιματοξυλίνης - εωσίνης

Αρχικά, οι τομές τοποθετήθηκαν σε κλίβανο 55°C για 45 λεπτά με σκοπό την τήξη της παραφίνης. Ακολούθησε η αποπαραφίνωση σε δύο διαδοχικά δοχεία με ξυλόλη όπου οι τομές παρέμειναν για 15 λεπτά στο καθένα. Ακολούθησε ενυδάτωση των τομών, σε μία σειρά αλκοολών μειούμενης συγκέντρωσης (100%, 90%, 80%, 70%), με εμβαπτίσεις διάρκειας 5 λεπτών σε κάθε μία και στη συνέχεια ξέπλυμά τους με νερό βρύσης. Ακολούθως οι τομές τοποθετήθηκαν στο διάλυμα της αιματοξυλίνης (Harris hematoxyline, MERCK) για 20 λεπτά και μεταφέρθηκαν σε τρεχούμενο νερό βρύσης για 4 λεπτά. Μετά το πλύσιμο, οι τομές εμβαπτίσθηκαν για 1-2 δευτερόλεπτα σε οξινισμένο οινόπνευμα (3% HCl σε διάλυμα αλκοόλης 70%). Ακολούθησε πλύσιμο σε νερό βρύσης και τοποθέτηση των τομών σε εωσίνη (Eosin,

MERCK, 3gr σε 200 ml απεσταγμένο νερό) για 3 λεπτά και πάλι ξέπλυμα σε νερό βρύσης. Στη συνέχεια, έγινε αφυδάτωση των τομών σε διαδοχικά διαλύματα αλκοολών (50%, 70%, 80%, 90%, 100%), με 10 εμβαπτίσεις σε κάθε μία και διαύγαση σε δύο διαδοχικές ξυλόλες. Τέλος, οι τομές καλύφθηκαν με ρητίνη Derox και καλυπτρίδες για παρατήρηση στο μικροσκόπιο (Εικόνα 2.14 α,β).



Εικόνα 2.14 α, β: Δοχεία χρώσης αιματοξυλίνης-εωσίνης

2.4.2. Κυτταροχημική χρώση όξινης φωσφατάσης ανθεκτικής στο τρυγικό (TRAP)

Αρχικά, οι τομές τοποθετήθηκαν στους 55°C για 45 λεπτά με σκοπό την τήξη της παραφίνης. Στη συνέχεια, ακολούθησε η διαδικασία της αποπαραφίνωσης, όπως περιγράφηκε προηγουμένως (2.4.1). Μετά την αφυδάτωση, οι τομές τοποθετήθηκαν σε δοχείο με απεσταγμένο νερό θερμοκρασίας 37 °C. Παράλληλα, προετοιμάστηκαν κατάλληλα δύο διαλύματα Α και Β. Και τα δύο διαλύματα (Α και Β) περιείχαν απιονισμένο νερό προθερμασμένο στους 37°C, διάλυμα Diazotized Fast Garnet GBC, διάλυμα Napthol AS-BI Phosphate και διάλυμα οξικού οξέος. Το διάλυμα Β περιείχε επιπλέον διάλυμα τρυγικού. Η χρώση έγινε σύμφωνα με τις

οδηγίες του κατασκευαστή του κιτ (Sigma-Aldrich, INC). Συγκεκριμένα, μια αντικειμενοφόρος από κάθε ομάδα (n=9) επώαστηκε στο διάλυμα Α και δύο αντικειμενοφόρες από κάθε ομάδα (n=18) επώαστηκαν στο διάλυμα Β, για μία ώρα σε θερμοκρασία 37°C. Μετά το ξέπλυμά τους με απεσταγμένο νερό, οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετήθηκαν σε διάλυμα αιματοξυλίνης (Harris hematoxyline, MERCK) για 1 λεπτό (για συμπληρωματική χρώση) και ακολούθησε πλύσιμο σε τρεχούμενο νερό βρύσης, αφυδάτωση των τομών και κάλυψη με ρητίνη Derex και καλυπτρίδες, όπως περιγράφηκε προηγουμένως.

2.4.3. Ανοσοϊστοχημική εντόπιση του οιστρογονικού υποδοχέα β (ERβ)

Αρχικά, οι τομές αποπαραφινώθηκαν και αφυδατώθηκαν όπως περιγράφηκε στο 2.4.1. Κατόπιν, οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετήθηκαν σε διάλυμα 3% H₂O₂ σε μεθανόλη για 10 λεπτά στο σκοτάδι. Ακολούθησε πλύσιμο με νερό βρύσης και απεσταγμένο και αποκάλυψη των επιτόπων με θέρμανση σε κιτρικό οξύ (10⁻² Μ pH=6.0) για 3 φορές x3 λεπτά στο φούρνο μικροκυμάτων. Οι τομές παρέμειναν στο κιτρικό για μισή ώρα επιπλέον σε θερμοκρασία δωματίου και μετά ξεπλύθηκαν με απεσταγμένο νερό. Οι τομές στη συνέχεια, αφού περιγράφηκαν με ειδικό μαρκαδόρο ("Dako Pen"), τοποθετήθηκαν σε διάλυμα PBST (1xPBS + Triton 0.2%) για 5 λεπτά. Ακολούθως επώαστηκαν με το διάλυμα παρεμπόδισης (PBST+10% φυσιολογικός ορός κατσίκας) για 1 ώρα και 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με σκοπό την κάλυψη μη-ειδικών θέσεων πρόσδεσης του δευτερογενούς αντισώματος. Οι τομές επώαστηκαν όλη τη νύχτα με το πρωτογενές αντίσωμα

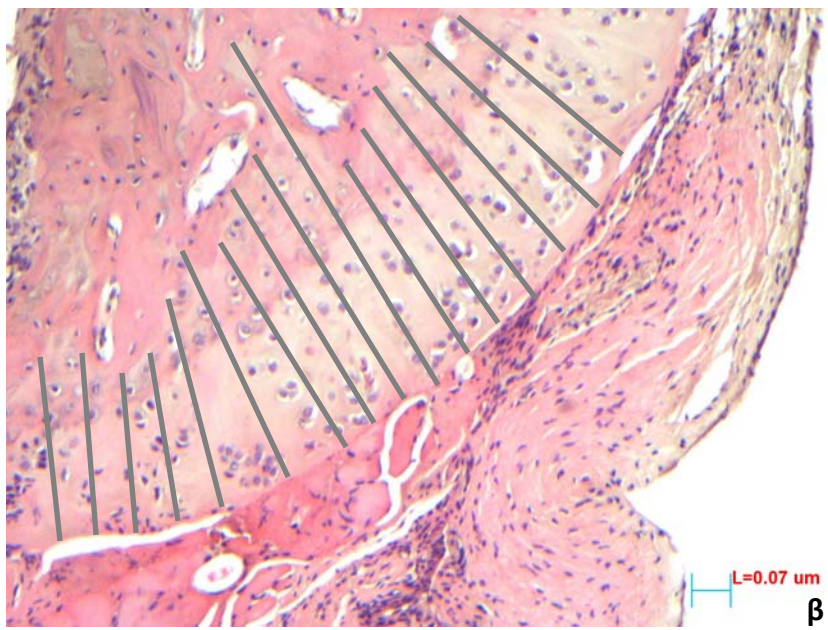
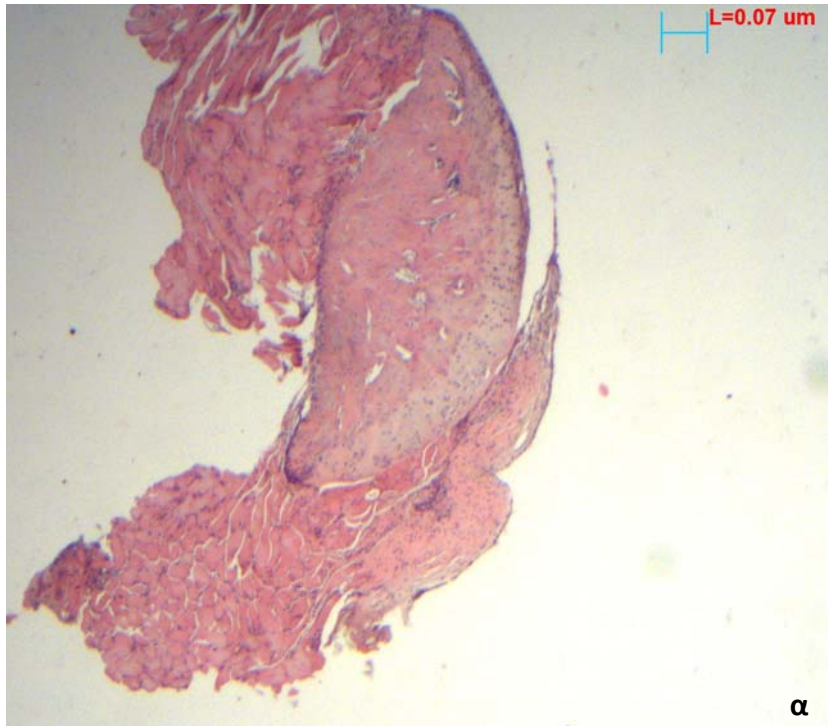
(Mouse monoclonal, B1C1 ERβ - ευγενική προσφορά του Δρ. ΜΝ Αλέξη, ΕΙΕ) σε αραιώση 1:50. Την επόμενη ημέρα του πειράματος, πραγματοποιήθηκε πλύσιμο των αντικειμενοφόρων με PBS και επώαση με το δευτερογενές βιοτυνιλιωμένο αντίσωμα κατσίκας (goat-antimouse-IgG, αραιώση 1:200, Millipore) για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε πλύσιμο των πλακιδίων με PBS και επώαση με το σύμπλοκο αβιδίνης-βιοτίνης (AB complex, R.T.U. Vectastain) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, έγινε ξανά πλύσιμο των τομών με PBS και η προσθήκη του υποστρώματος της υπεροξειδάσης, (διαμινοβενζιδίνη, DAB) για εμφάνιση του σήματος. Οι τομές ξεπλύθηκαν σε νερό βρύσης και πραγματοποιήθηκε συμπληρωματική χρώση με αιματοξυλίνη για 1 λεπτό και πλύσιμο σε τρεχούμενο νερό. Ακολούθησε αφυδάτωση και κάλυψη των τομών, όπως περιγράφηκε προηγουμένως στο 2.4.1.

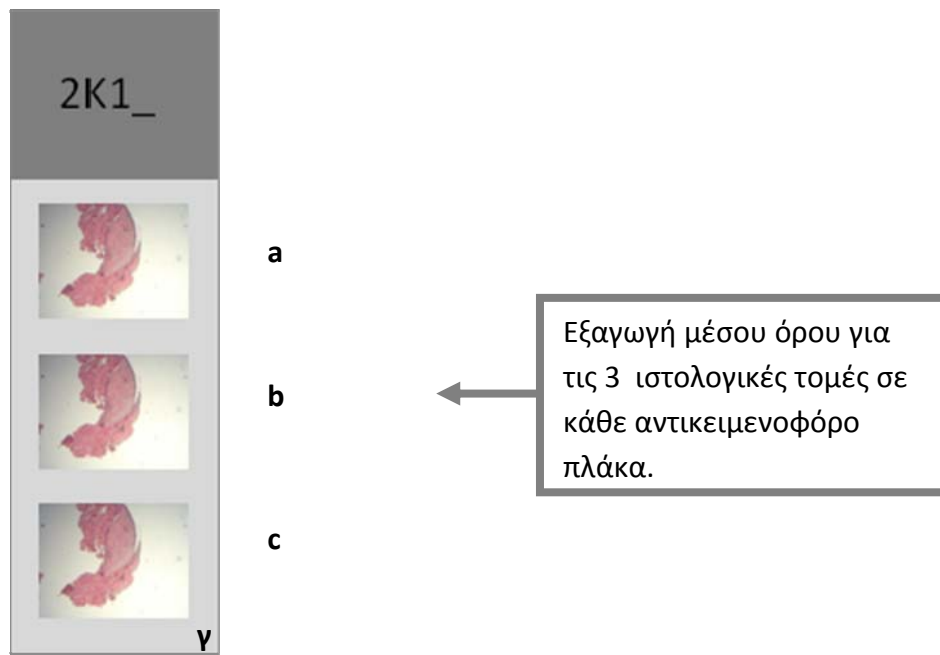
2.5. ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΚΑΙ ΙΣΤΟΜΟΡΦΟΜΕΤΡΙΑ

2.5.1. Τομές χρωσμένες με αιματοξυλίνη-εωσίνη

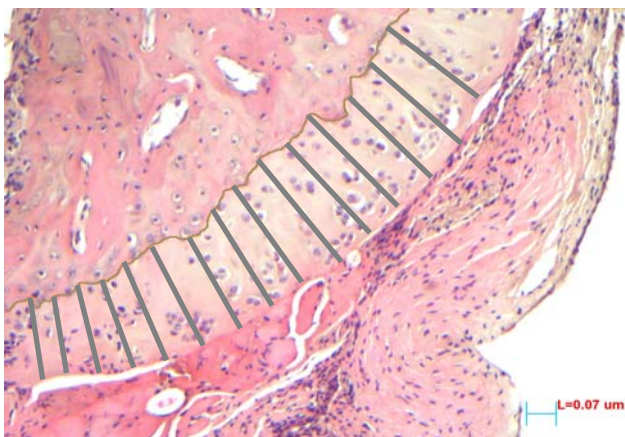
Η ιστολογική παρατήρηση των τομών έγινε με οπτικό μικροσκόπιο Olympus ECE-Bi. Η φωτογράφιση των τομών για την ιστομορφομετρία έγινε στο μικροσκόπιο Leica DMLB2, που συνδεόταν με ψηφιακή κάμερα DFK 72BUC02 CMOS και ηλεκτρονικό υπολογιστή (Εργαστήριο Ιστολογίας και Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ). Για τον κόνδυλο κάθε πειραματοζώου ελήφθησαν: μία φωτογραφία σε μικρή μεγέθυνση (x2.5), που περιλάμβανε ολόκληρη την περιοχή του κονδύλου και 3 φωτογραφίες σε μεγέθυνση x10, από τις τρεις τομές σε κάθε αντικειμενοφόρο

πλάκα. Οι ιστομορφομετρικές μετρήσεις έγιναν για τον προσδιορισμό του πάχους (thickness) του κονδυλικού χόνδρου στις διαφορετικές πειραματικές ομάδες. Η μέτρηση του πάχους του κονδυλικού χόνδρου σε μη έγινε με τον σχεδιασμό ευθυγράμμων τμημάτων κατά το δυνατόν κάθετων στην εξωτερική επιφάνεια του κονδύλου, σε όλη την έκταση του χόνδρου. Επομένως, σε κάθε ψηφιακή φωτογραφία σχεδιάζονταν περίπου 15 διαδοχικές ευθείες, που απείχαν μεταξύ τους κατά 1 cm περίπου (Εικόνα 2.15 α,β,γ). Για κάθε ιστολογική τομή υπολογίστηκε ο μέσος όρος των 15 μετρήσεων και ακολούθως ο μέσος όρος και των 3 τομών σε κάθε αντικειμενοφόρο (ομάδα). Με τον ίδιο ακριβώς τρόπο μετρήθηκε και το πάχος των στιβάδων του χόνδρου. Συγκεκριμένα υπολογίστηκε το πάχος της πολλαπλασιαζόμενης και της υπερτροφικής στιβάδας, λόγω αδυναμίας σαφούς διαχωρισμού της ινώδους στιβάδας σε όλες τις ιστολογικές τομές (Εικόνα 2.15 δ,ε). Όλες οι μετρήσεις εκτιμήθηκαν συνολικά από 3 ανεξάρτητους παρατηρητές. Επιπλέον, από τις φωτογραφίες (μεγέθυνση x10) των ιστολογικών τομών υπολογίστηκε ο αριθμός των χονδροκυττάρων της πολλαπλασιαζόμενης στιβάδας (Εικόνα 2.15 ζ). Ο αριθμός των κυττάρων διαιρέθηκε με το εμβαδόν της πολλαπλασιαζόμενης στιβάδας κάθε ομάδας (όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.15 στ) και τέλος υπολογίστηκε ο μέσος όρος και των 3 τομών, ώστε προέκυψε μία τιμή αριθμού κυττάρων / εμβαδόν πολλαπλασιαζόμενης στιβάδας για κάθε πειραματόζωο.





Εικόνα 2.15: α) Φωτογραφία κονδύλου με μεγέθυνση αντικειμενικού φακού x2.5 β) Περιοχή κονδυλικού χόνδρου με μεγέθυνση αντικειμενικού φακού x10 και διαδοχικές μετρήσεις του κονδυλικού χόνδρου γ) Υπολογισμός του μέσου όρου για τις 3 ιστολογικές τομές σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα.

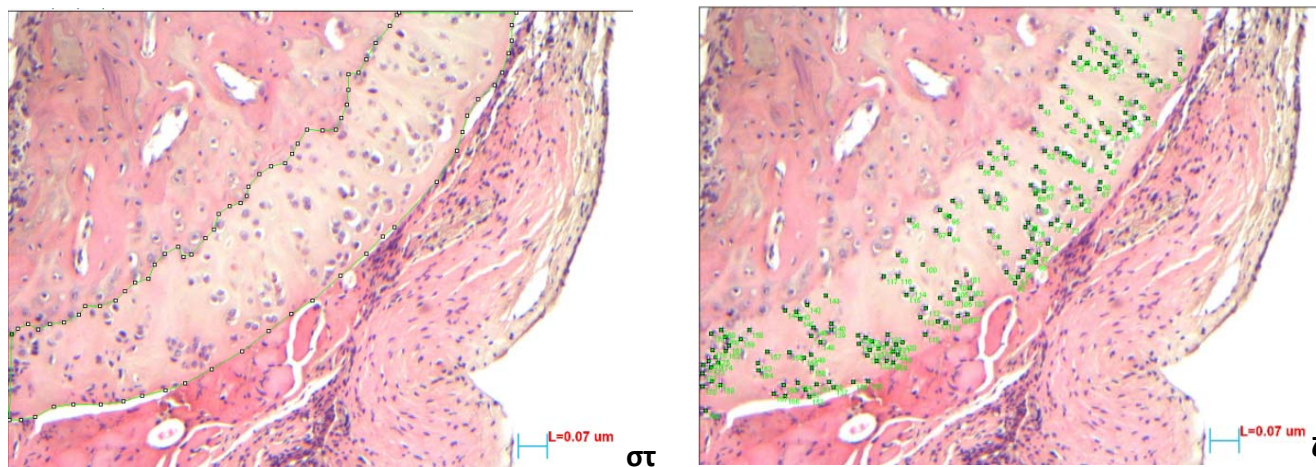


δ



ε

δ) πολλαπλασιαζόμενη στιβάδα x10 και ε) υπερτροφική στιβάδα, όπου απεικονίζονται τα διαδοχικά ευθύγραμμα τμήματα που χρησιμοποιήθηκαν για τις μετρήσεις



στ) Οριοθέτηση της πολλαπλασιαζόμενης στιβάδας για υπολογισμό του εμβαδού της

ζ) Επισήμανση των κυττάρων της πολλαπλασιαζόμενης στιβάδας για υπολογισμό του συνολικού αριθμού τους

2.5.2. Τομές χρωσμένες με TRAP

Η ιστολογική παρατήρηση των τομών έγινε με οπτικό μικροσκόπιο Olympus ECE-Bi.

Η φωτογράφιση των τομών για την ιστομορφομετρία, έγινε στο μικροσκόπιο Leica DMLB2, που συνδεόταν με ψηφιακή κάμερα DFK 72BUC02 CMOS και ηλεκτρονικό υπολογιστή (Εργαστήριο Ιστολογίας και Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ).

Η χρώση TRAP επιτρέπει το χαρακτηρισμό των οστεοκλαστών, μέσω της χρώσης της όξινης φωσφατάσης ανθεκτικής στο τρυγικό, η οποία και περιέχεται στα λυσοσώματα των κενοτοπίων.

Η αξιολόγηση της χρώσης, πραγματοποιήθηκε με ποιοτική εκτίμηση των μεταβολών του αριθμού των οστεοκλαστών στην περιοχή του οστού ακριβώς κάτω από το κονδυλικό χόνδρο, μεταξύ των πειραματικών ομάδων, λόγω αδυναμίας μεμονωμένης μέτρησής τους και διενέργειας στατιστικής ανάλυσης.

2.5.3. Τομές με ανοσοϊστοχημεία για τον ERβ

Η ιστολογική παρατήρηση των τομών έγινε με οπτικό μικροσκόπιο Olympus ECE-Bi. Η φωτογράφιση των τομών για την ιστομορφομετρία, έγινε στο μικροσκόπιο Leica DMLB2, που συνδεόταν με ψηφιακή κάμερα DFK 72BUC02 CMOS και ηλεκτρονικό υπολογιστή (Εργαστήριο Ιστολογίας και Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ).

Η αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε με ποιοτική εκτίμηση της ανοσοχρώσης για τον οιστρογονικό υποδοχέα β (ERβ) μεταξύ των πειραματικών ομάδων, λόγω αδυναμίας ποσοτικού προσδιορισμού τους και διενέργειας στατιστικής ανάλυσης

2.6. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική επεξεργασία για τις μετρήσεις των απεικονιστικών και ιστομορφομετρικών αναλύσεων πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή παραμετρικών μεθόδων (one way analysis of variance, ANOVA) με ανεξάρτητη μεταβλητή το χορηγούμενο σκεύασμα. Όπου η στατιστική ανάλυση το επέτρεπε, ακολουθούσε μετανάλυση (post hoc) με:

α) τη δοκιμασία Dunnett, για σύγκριση όλων των πειραματικών ομάδων με αυτή των ωοθηκεκτομημένων μυών (OVX) και

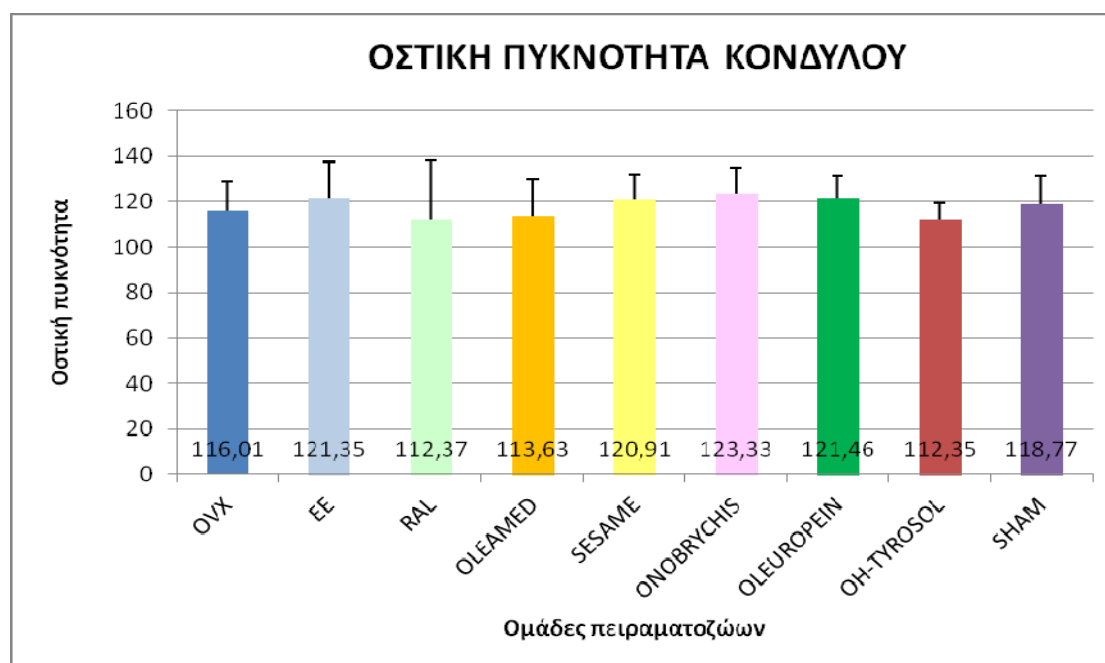
β) με τη δοκιμασία Least Significant Difference (LSD) για σύγκριση όλων των ομάδων μεταξύ τους. Έγινε χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS 19.00 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) και ως στατιστικά σημαντικό θεωρήθηκε το παρατηρούμενο επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας 5% ($p < 0.05$).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΟΣΤΙΚΗΣ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΚΟΝΔΥΛΟΥ

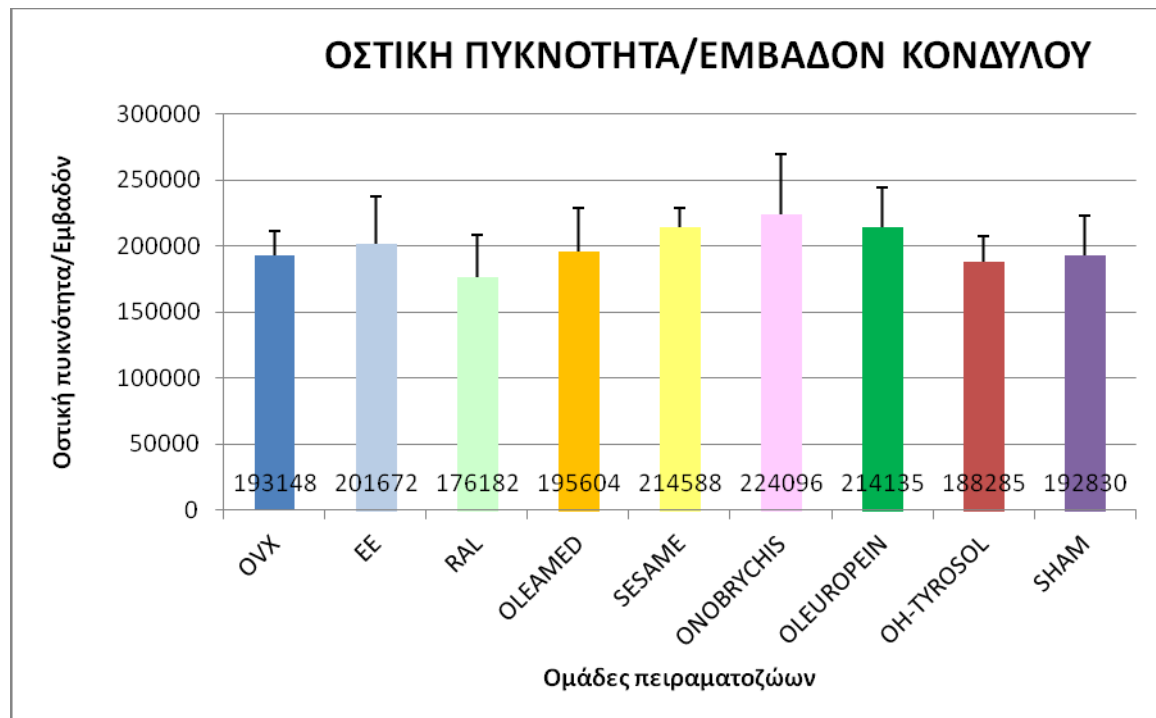
3.1.1. Δεδομένα από τις ακτινογραφίες

Η μέτρηση της οστικής πυκνότητας (mean gray value) των κονδύλων, έγινε από τις ακτινογραφίες, μέσω του λογισμικού Image J. Η στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της ομάδας των ωοθηκεκτομημένων μυών και των πειραματικών ομάδων ή της ομάδας των άθικτων μυών (SHAM) (Σχήμα 3.1).



Σχήμα 3.1: Διαγραμματική απεικόνιση της οστικής πυκνότητας του κονδύλου.

Τα ίδια αποτελέσματα προέκυψαν και όταν οι μετρήσεις της οστικής πυκνότητας του κονδύλου διαιρέθηκαν με το εμβαδόν του, όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 3.2. Άρα, οι χορηγούμενες οιστρογονικές και φυτικές ενώσεις ή η ωοθηκεκτομή δεν επηρέασαν την οστική πυκνότητα των κονδύλων των πειραματοζώων.

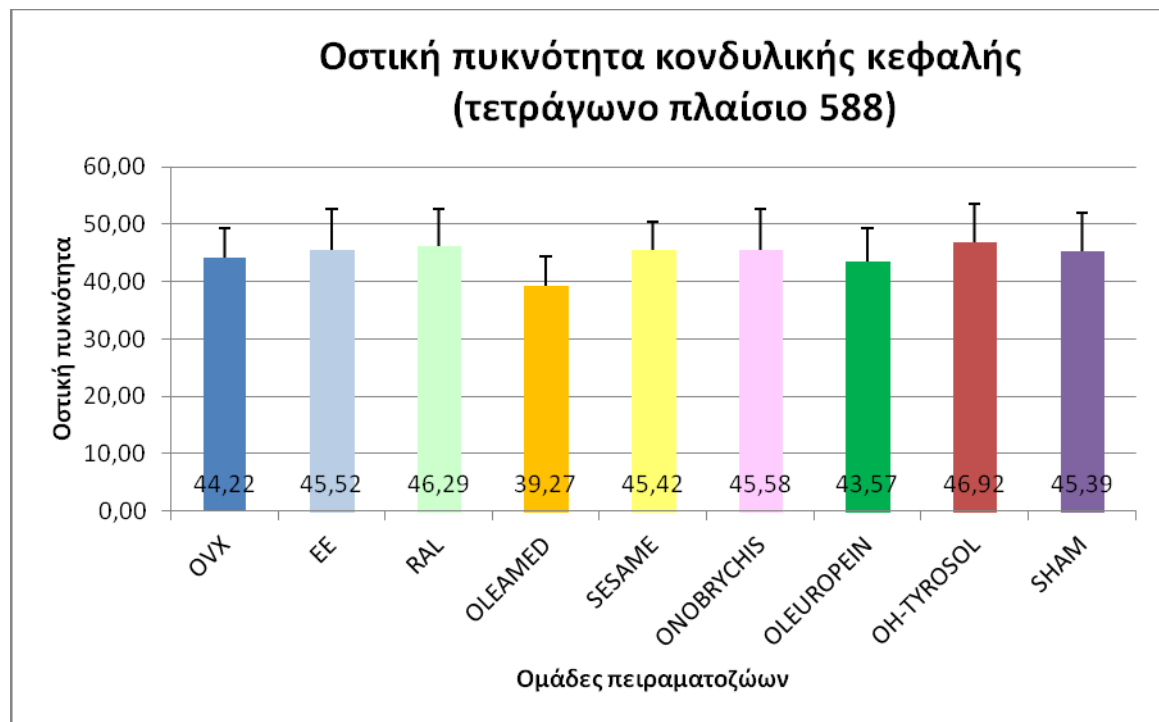


Σχήμα 3.2: Διαγραμματική απεικόνιση του λόγου της οστικής πυκνότητας του κονδύλου προς το εμβαδόν του.

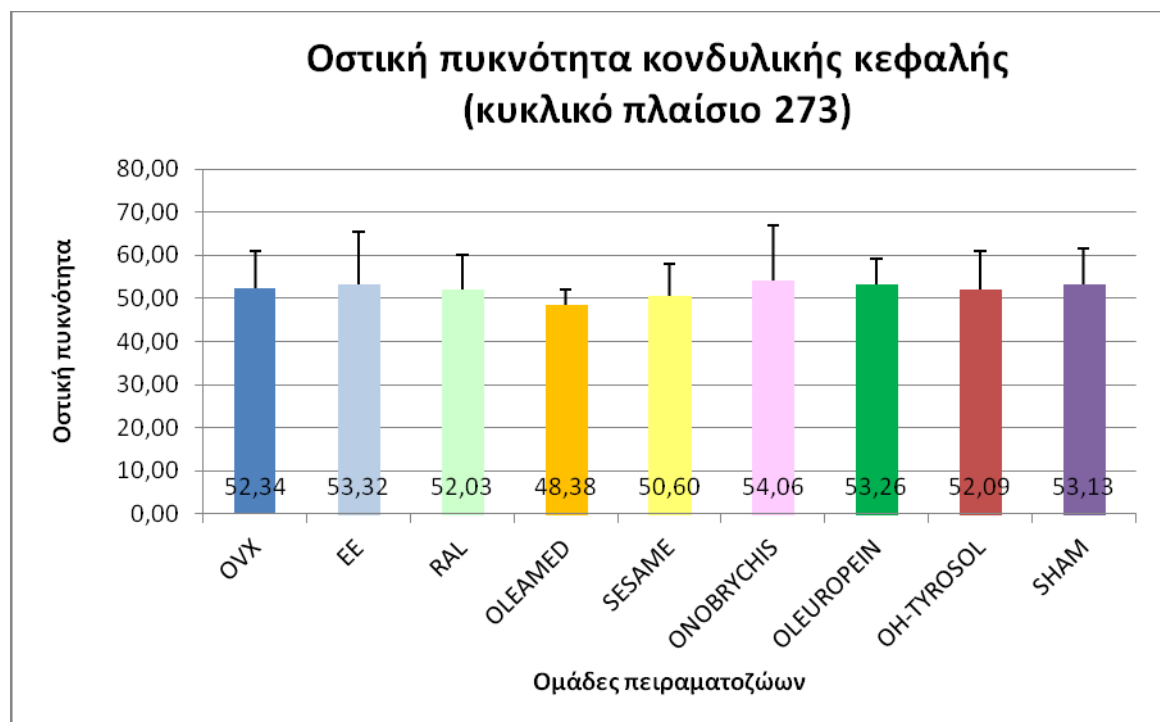
3.1.2. Δεδομένα από τις απεικονίσεις με μαστογράφο

Οι απεικονίσεις με μαστογράφο χρησιμοποιήθηκαν για προσδιορισμό εκ νέου της οστικής πυκνότητας του κονδύλου λόγω της αυξημένης ευαισθησίας της απεικόνισης. Στις απεικονίσεις αυτές κατέστη δυνατή η παρατήρηση της κεφαλής του κονδύλου, στην οποία και προσδιορίσθηκε η οστική πυκνότητα. Συγκεκριμένα, η οστική πυκνότητα της κονδυλικής κεφαλής υπολογίστηκε μέσω του λογισμικού Image J με τη χρήση δύο σταθερών πλαισίων, ενός τετράγωνου πλαισίου (διαστάσεων 588 pixels, Σχήμα 3.3) και ενός κυκλικού πλαισίου (διαστάσεων 273 pixels, Σχήμα 3.4). Όπως και στα ακτινογραφικά ευρήματα, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ της ομάδας των ωθηκεκτομημένων μυών και των πειραματικών ομάδων ή της ομάδας των άθικτων μυών (SHAM). Επομένως, η χορήγηση των διαφορετικών οιστρογονικών ενώσεων ή η ωθηκεκτομή δε

μετέβαλλε σημαντικά την οστική πυκνότητα της κονδυλικών κεφαλών των πειραματοζώων.



Σχήμα 3.3: Διαγραμματική απεικόνιση της οστικής πυκνότητας της κονδυλικής κεφαλής με τη χρήση τετράγωνου πλαισίου διαστάσεων 588 pixels.



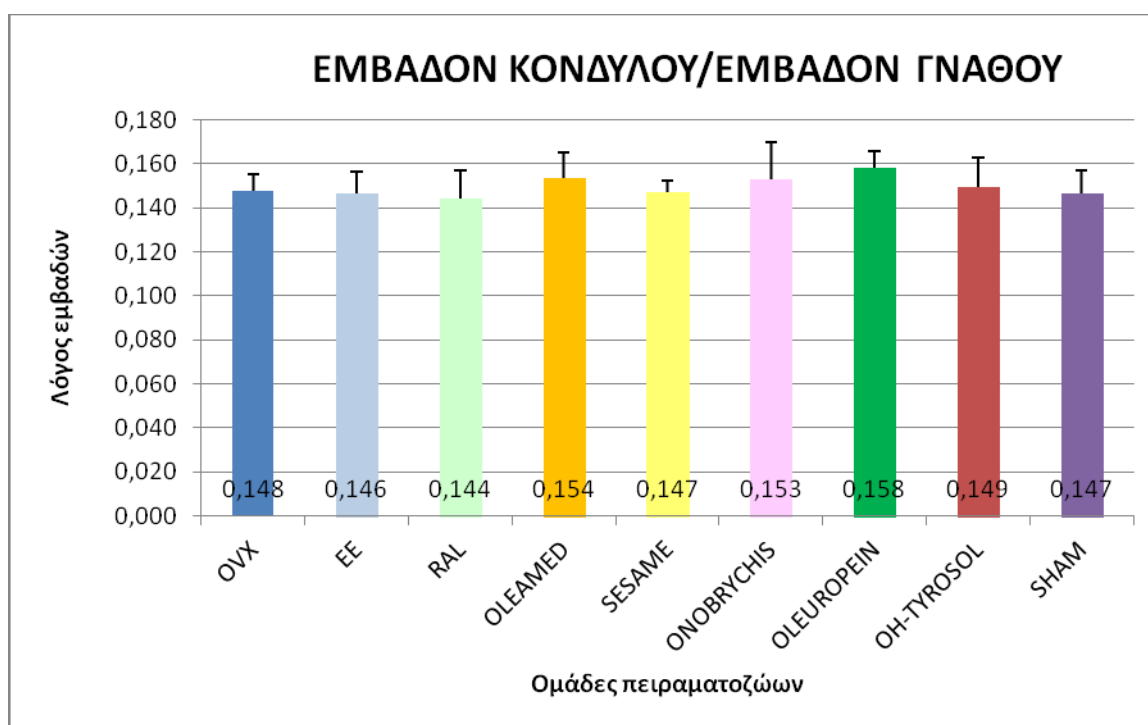
Σχήμα 3.4: Διαγραμματική απεικόνιση της οστικής πυκνότητας της κονδυλικής κεφαλής με τη χρήση κυκλικού πλαισίου διαστάσεων 273 pixels.

3.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥ ΣΥΝΟΛΙΚΟΥ ΕΜΒΑΔΟΥ ΤΟΥ ΚΟΝΔΥΛΟΥ

3.2.1. Δεδομένα από τις ακτινογραφίες

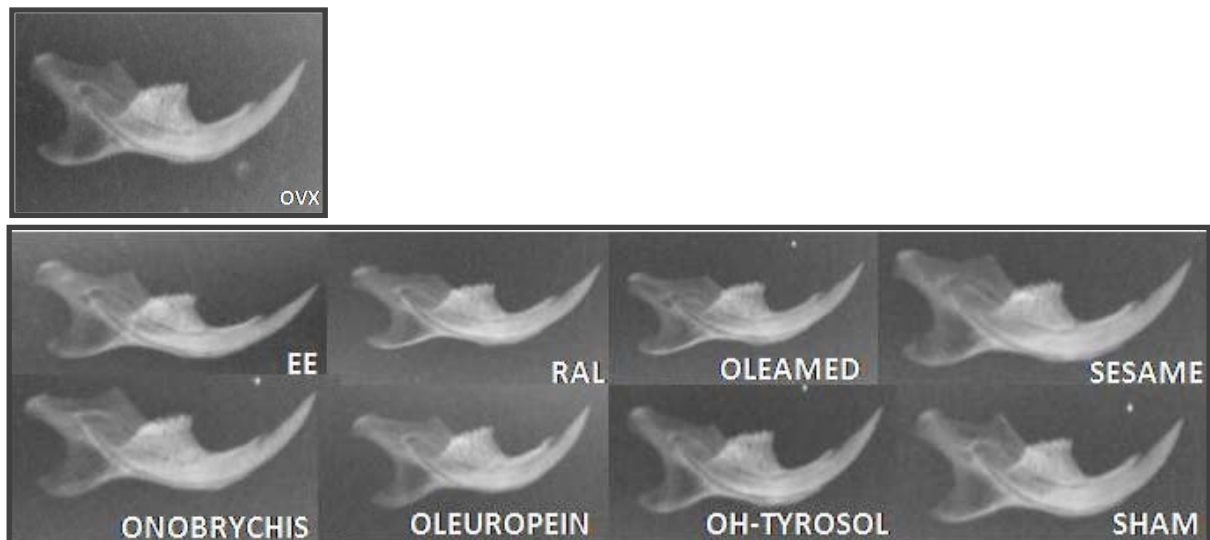
Η ακτινογραφική αξιολόγηση του εμβαδού της περιγεγραμμένης περιοχής του κονδύλου προς την περιγεγραμμένη περιοχή της αντίστοιχης γνάθου δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα μεταξύ της ομάδας των ωθηκεκτομημένων μυών και των πειραματικών ομάδων ή της ομάδας των άθικτων μυών (Σχήμα 3.5).

Επομένως, από τις ακτινογραφίες φάνηκε ότι οι χορηγούμενες οιστρογονικές ενώσεις ή η ωθηκεκτομή δεν επηρέασαν το εμβαδόν των κονδύλων των πειραματοζώων.



Σχήμα 3.5: Διαγραμματική απεικόνιση του συνολικού εμβαδού του κονδύλου προς το συνολικό εμβαδόν της αντίστοιχης κάτω γνάθου.

Παρακάτω παρατίθενται ενδεικτικές ακτινογραφίες των κάτω γνάθων των πειραματοζώων για κάθε ομάδα (Εικόνα 3.1).

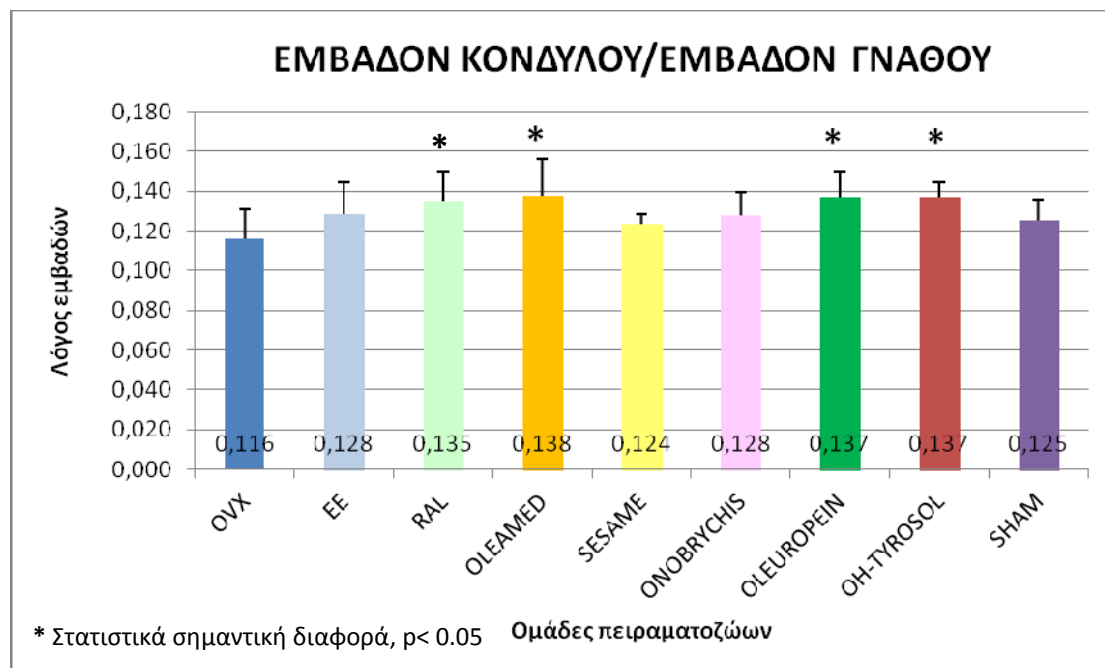


Εικόνα 3.1: Απεικόνιση των ακτινογραφιών των ημίσεων κάτω γνάθων των πειραματοζώων για όλες τις πειραματικές ομάδες (EE, RAL, OLEAMED, SESAME, ONOBRYCHIS, OLEUROPEIN, OH-TYROSOL) συγκριτικά με την ομάδα των ωθηκεκτομημένων μυών (OVX) και την ομάδα των άθικτων μυών (SHAM).

3.2.2. Δεδομένα από τις φωτογραφίες

Η αξιολόγηση της περιοχής (εμβადού) του κονδύλου έγινε και με μετρήσεις από φωτογραφικές απεικονίσεις του οστού του ημίσεως της κάτω γνάθου. Η φωτογραφική αξιολόγηση του εμβადού της περιγεγραμμένης περιοχής του κονδύλου προς την περιγεγραμμένη περιοχή της γνάθου, σε αντίθεση με την ακτινογραφική αξιολόγηση, ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της ομάδας των ωθηκεκτομημένων μυών και των πειραματικών ομάδων RAL, OLEAMED, OLEUROPEIN, OH-TYROSOL ($F_{(8,45)} = 1.548$, $p = 0.175$). Όπως απεικονίζεται και στο παρακάτω διάγραμμα (Σχήμα 3.6), οι χορηγούμενες (οιστρογονικές) ενώσεις

RAL, OLEAMED, OLEUROPEIN, OH-TYROSOL οδήγησαν σε αύξηση του εμβαδού των κονδύλων διαιρεμένου με το εμβαδόν των κάτω γνάθων των πειραματοζώων στις αντίστοιχες πειραματικές ομάδες. Πιο συγκεκριμένα, στην ομάδα RAL παρατηρήθηκε αύξηση 16.49% ($p= 0.029$), στην ομάδα OLEAMED 18.91% ($p= 0.010$), στην ομάδα OLEUROPEIN 18.48% ($p= 0.035$) και στην ομάδα OH-TYROSOL 18.22% ($p= 0.016$), συγκριτικά με την ομάδα των ωοθηκεκτομημένων μυών.



Σχήμα 3.6: Διαγραμματική απεικόνιση του εμβαδού του κονδύλου προς το εμβαδόν της κάτω γνάθου.

Παρακάτω παρατίθενται ενδεικτικές ψηφιακές φωτογραφίες των ημίσεων των κάτω γνάθων των πειραματοζώων, για κάθε ομάδα (Εικόνα 3.2).

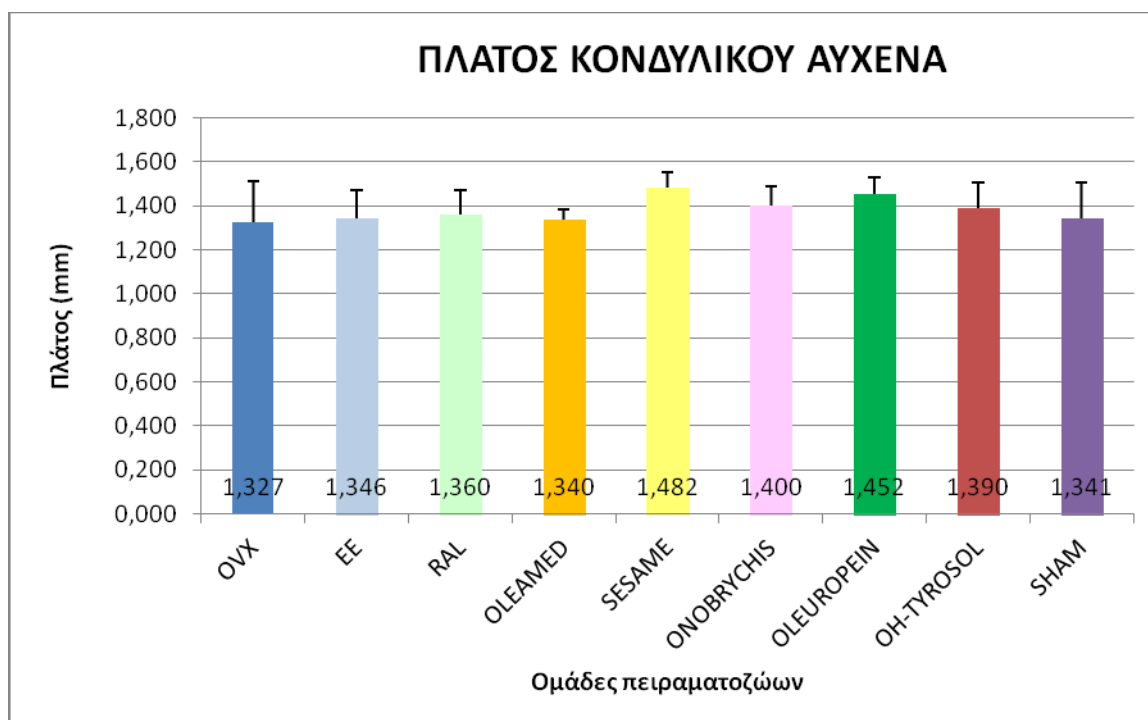


Εικόνα 3.2: Ενδεικτικές φωτογραφικές απεικονίσεις των ημίσεων της κάτω γνάθου των πειραματόζων όλων των πειραματικών ομάδων (EE, RAL, OLEAMED, SESAME, ONOBRYCHIS, OLEUROPEIN, OH-TYROSOL), της ομάδας των ωοθηκεκτομημένων μυών (OVX) και της ομάδας των άθικτων μυών (SHAM).

3.3. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥ ΠΛΑΤΟΥΣ ΤΟΥ ΚΟΝΔΥΛΙΚΟΥ ΑΥΧΕΝΑ

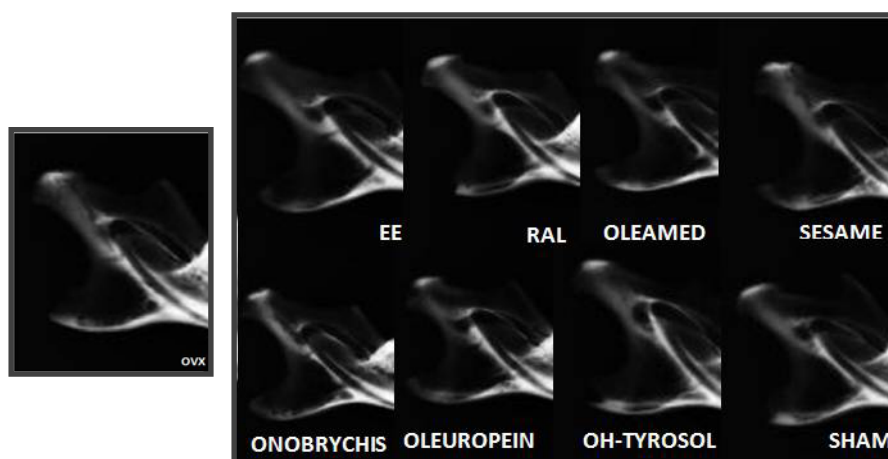
3.3.1. Δεδομένα από τις απεικονίσεις με μαστογράφο

Η αξιολόγηση του πλάτους του κονδυλικού αυχένα, με τη χρήση των απεικονίσεων σε μαστογράφο, δεν έδειξε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα μεταξύ της ομάδας των ωοθηκεκτομημένων μυών και των πειραματικών ομάδων ή της ομάδας των άθικτων μυών (Σχήμα 3.7). Από τις απεικονίσεις, προέκυψε ότι οι χορηγούμενες οιστρογονικές ενώσεις ή η ωοθηκεκτομή δεν επηρέασαν το πλάτος του κονδυλικού αυχένα των πειραματόζων.



Σχήμα 3.7: Διαγραμματική απεικόνιση του πλάτους του κονδυλικού αυχένα.

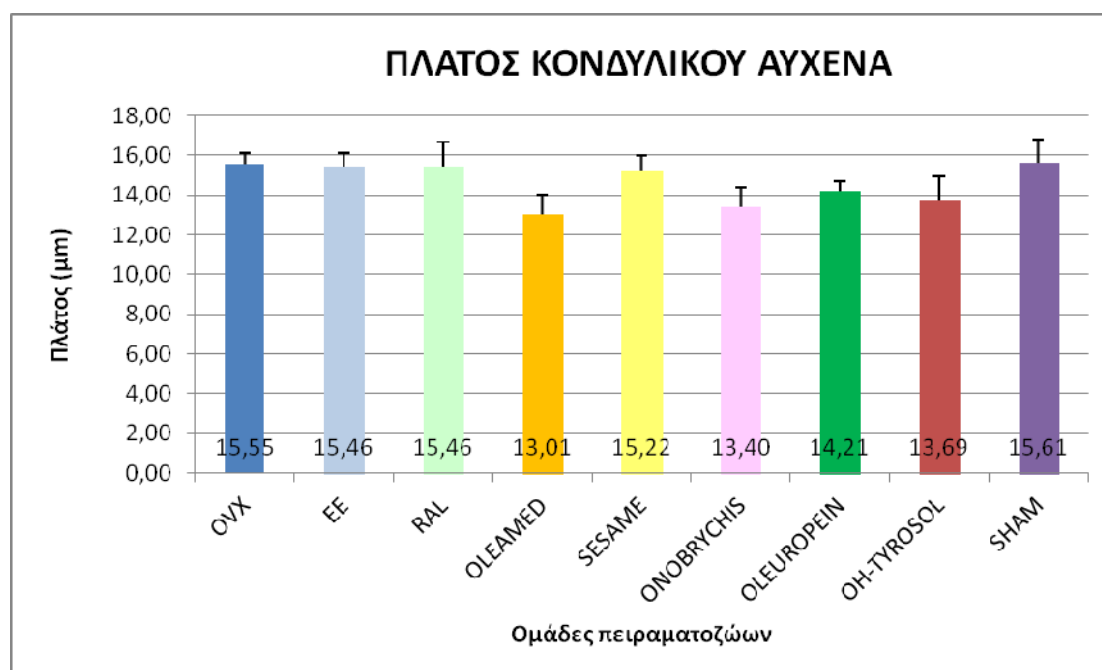
Παρακάτω παρατίθενται ενδεικτικές απεικονίσεις με μαστογράφο των κονδυλικών κεφαλών και των κονδυλικών αυχένων των πειραματοζώων, για κάθε ομάδα (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.3. Ενδεικτικές απεικονίσεις με μαστογράφο των κονδυλικών αυχένων και κεφαλών των πειραματοζώων όλων των πειραματικών ομάδων (EE, RAL, OLEAMED, SESAME, ONOBYRCHIS, OLEUROPEIN, OH-TYROSOL), της ομάδας των ωθηκεκτομημένων μυών (OVX) και της ομάδας των άθικτων μυών (SHAM).

3.3.2. Δεδομένα από τις φωτογραφίες

Η αξιολόγηση του πλάτους του κονδυλικού αυχένα έγινε επίσης, με τη χρήση φωτογραφικών απεικονίσεων. Οι μετρήσεις αυτές, όπως και οι αντίστοιχες των απεικονίσεων με μαστογράφο δεν ανέδειξαν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα (Σχήμα 3.8). Επομένως, επιβεβαιώθηκε ότι οι χορηγούμενες οιστρογονικές ενώσεις ή η ωθηκεκτομή δεν επηρέασαν το πλάτος του κονδυλικού αυχένα των πειραματοζώων. Στην εικόνα 3.4 παρατίθενται ενδεικτικές φωτογραφίες των κονδύλων και κονδυλικών αυχένων των πειραματοζώων για κάθε ομάδα.



Σχήμα 3.8: Διαγραμματική απεικόνιση του πλάτους του κονδυλικού αυχένα.



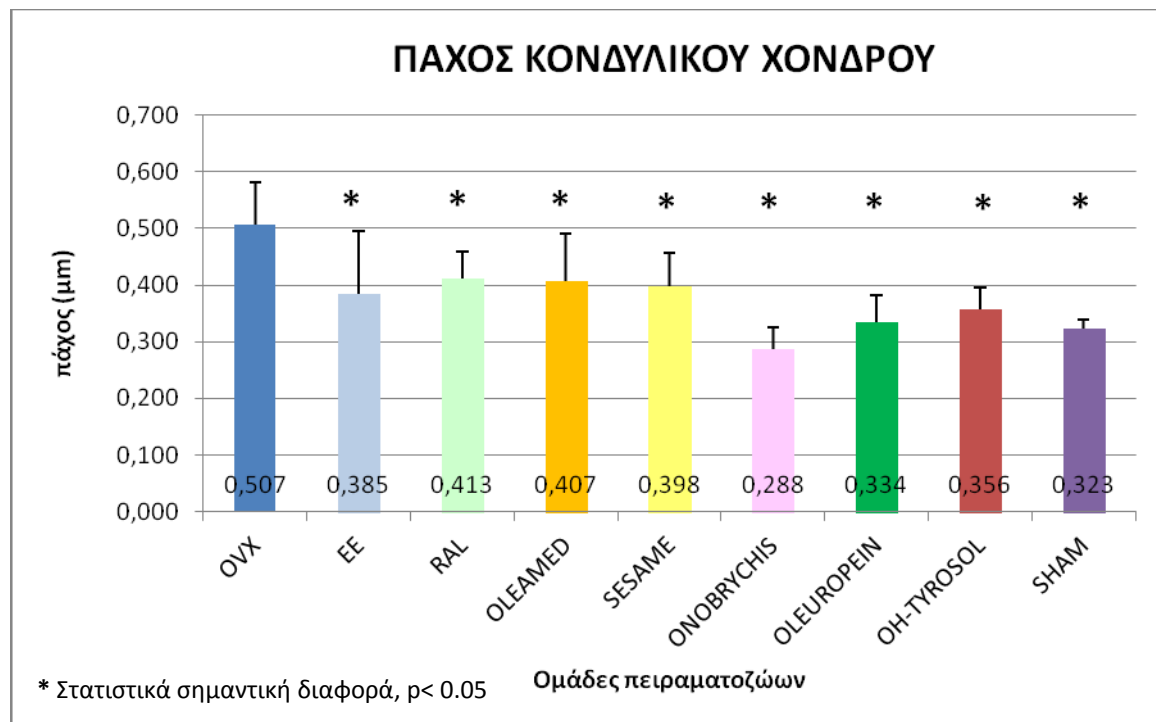
Εικόνα 3.4: Ενδεικτικές απεικονίσεις με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή των κονδυλικών αυχένων των πειραματοζώων όλων των πειραματικών ομάδων (EE, RAL, OLEAMED, SESAME, ONOBRYCHIS, OLEUROPEIN, OH-TYROSOL), της ομάδας των ωοθηκεκτομημένων μυών (OVX) και της ομάδας των άθικτων μυών (SHAM).

3.4. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥ ΚΟΝΔΥΛΙΚΟΥ ΧΟΝΔΡΟΥ

3.4.1. Πάχος του κονδυλικού χόνδρου

Η αξιολόγηση του χόνδρου του κονδύλου βασίστηκε στις μετρήσεις που έγιναν, μέσω του λογισμικού Image J, σε τομές μικροτόμου χρωσμένες με αιματοξυλιν-εωσίνη. Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι το πάχος του κονδυλικού χόνδρου διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ της ομάδας των ωοθηκεκτομημένων μυών και όλων των άλλων ομάδων (Σχήμα 3.9). Πιο συγκεκριμένα, όλες οι χορηγούμενες οιστρογονικές ενώσεις οδήγησαν σε μείωση του πάχους του κονδυλικού χόνδρου των πειραματοζώων συγκριτικά με την ομάδα των ωοθηκεκτομημένων μυών ($F_{(8,44)} = 4.933$, $p = 0.0001$). Η μείωση που παρατηρήθηκε ως προς την ομάδα των ωοθηκεκτομημένων είχε ως εξής: για την ομάδα EE η μείωση ήταν 24.06% ($p =$

0.003), για την ομάδα OLEAMED, 19.72% ($p= 0.012$), για την SESAME, 21.5% ($p= 0.014$), για την OLEUROPEIN 34.12% ($p= 0.0001$) και για την OH-TYROSOL 29.78% ($p= 0.001$). Η μεγαλύτερη μείωση παρατηρήθηκε στην ομάδα ONOBRYCHIS (43.3%, $p= 0.0001$) και η μικρότερη στην ομάδα RAL (18.66%, $p= 0.032$). Σημειώνεται ότι στην ομάδα των άθικτων μυών (SHAM) η μείωση ήταν 36.29% ($p= 0.0001$).

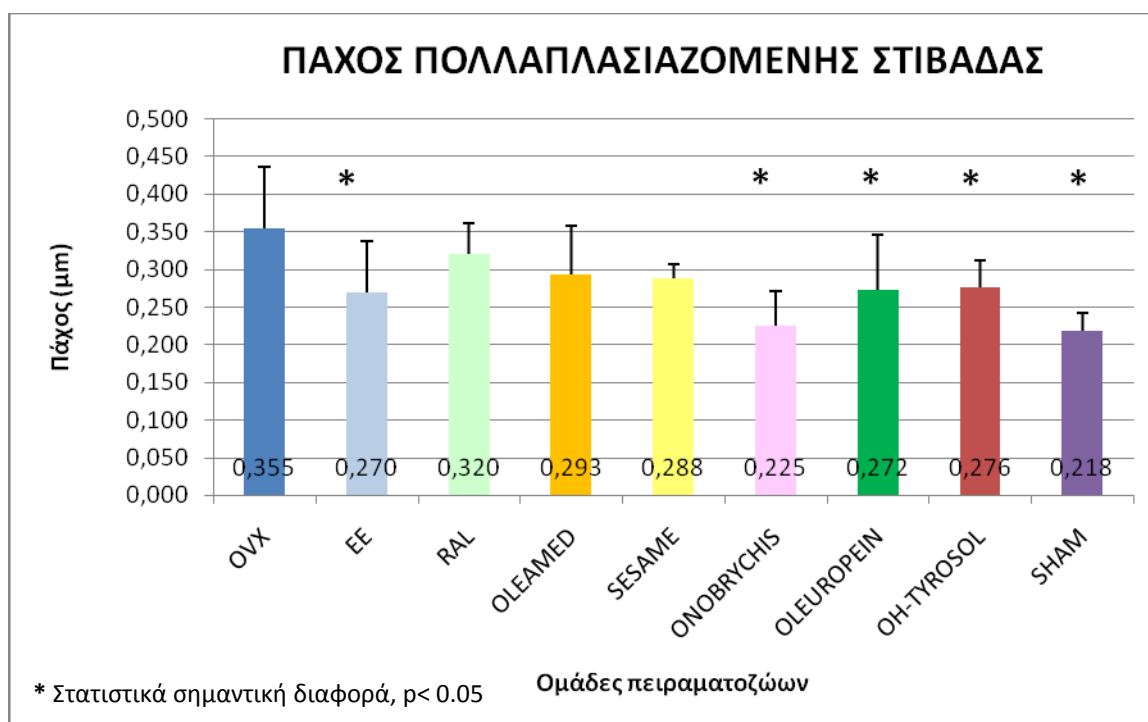


Σχήμα 3.9: Διαγραμματική απεικόνιση του πάχους του κονδυλικού χόνδρου.

3.4.2. Πάχος των επιμέρους στιβάδων του κονδυλικού χόνδρου

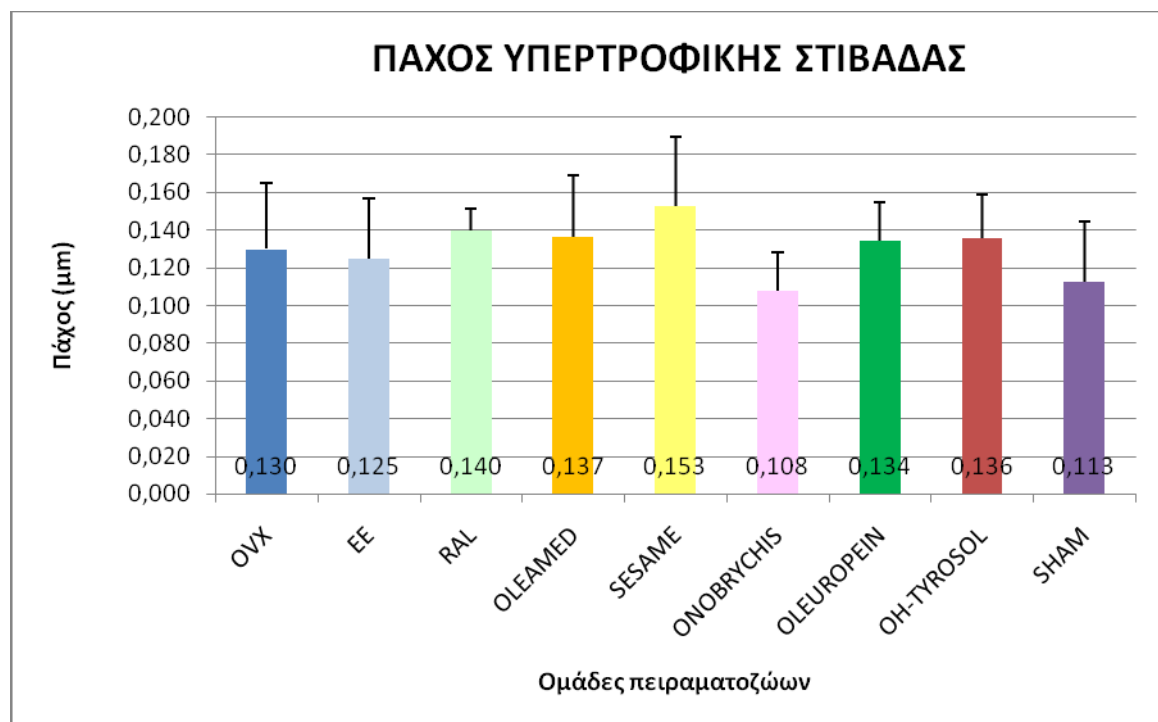
Παράλληλα με τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις του συνολικού πάχους του κονδυλικού χόνδρου, μετρήθηκαν οι επιμέρους στιβάδες του κονδυλικού χόνδρου και συγκεκριμένα η πολλαπλασιαζόμενη και η υπερτροφική στιβάδα. Όσον αφορά το πάχος της πολλαπλασιαζόμενης στιβάδας, διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική

διαφορά μεταξύ της ομάδας των ωοθηκεκτομημένων μυών και των πειραματικών ομάδων ΕΕ, ΟΝΟΒΡΥCHIS, ΟΛΕΥΡΟΡΕΙΝ, ΟΗ-ΤΥΡΟΣΟΛ και της ομάδας των άθικτων μυών (SHAM) (Σχήμα 3.10). Συγκεκριμένα προέκυψε ότι στις παραπάνω ομάδες, η πολλαπλασιαζόμενη στιβάδα του κονδυλικού χόνδρου μειώθηκε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό συγκριτικά με την ομάδα των ωοθηκεκτομημένων μυών ($F_{(8,43)}=2.576$, $p=0.025$). Για την ομάδα ΕΕ παρατηρήθηκε μείωση 23.94% ($p=0.016$) και για την ομάδα ΟΛΕΥΡΟΡΕΙΝ 23.38% ($p=0.024$). Η μεγαλύτερη μείωση (36.62%, $p=0.001$) παρατηρήθηκε στην ομάδα ΟΝΟΒΡΥCHIS, ενώ η μικρότερη μείωση (22.25%, $p=0.031$) στην ομάδα ΟΗ-ΤΥΡΟΣΟΛ. Στην ομάδα των άθικτων μυών παρατηρήθηκε μείωση 38,73% ($p=0.001$).



Σχήμα 3.10: Διαγραμματική απεικόνιση του πάχους της πολλαπλασιαζόμενης στιβάδας του κονδυλικού χόνδρου.

Αντιθέτως, από τις μετρήσεις του πάχους της υπερτροφικής στιβάδας του κονδυλικού χόνδρου, δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στην ομάδα των ωθηκεκτομημένων μυών και στις πειραματικές ομάδες ή την ομάδα άθικτων μυών, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι χορηγούμενες οιστρογονικές ενώσεις ή η ωθηκεκτομή δεν οδήγησαν σε καμία μεταβολή του πάχους της υπερτροφικής στιβάδας του χόνδρου του κονδύλου (Σχήμα 3.11).

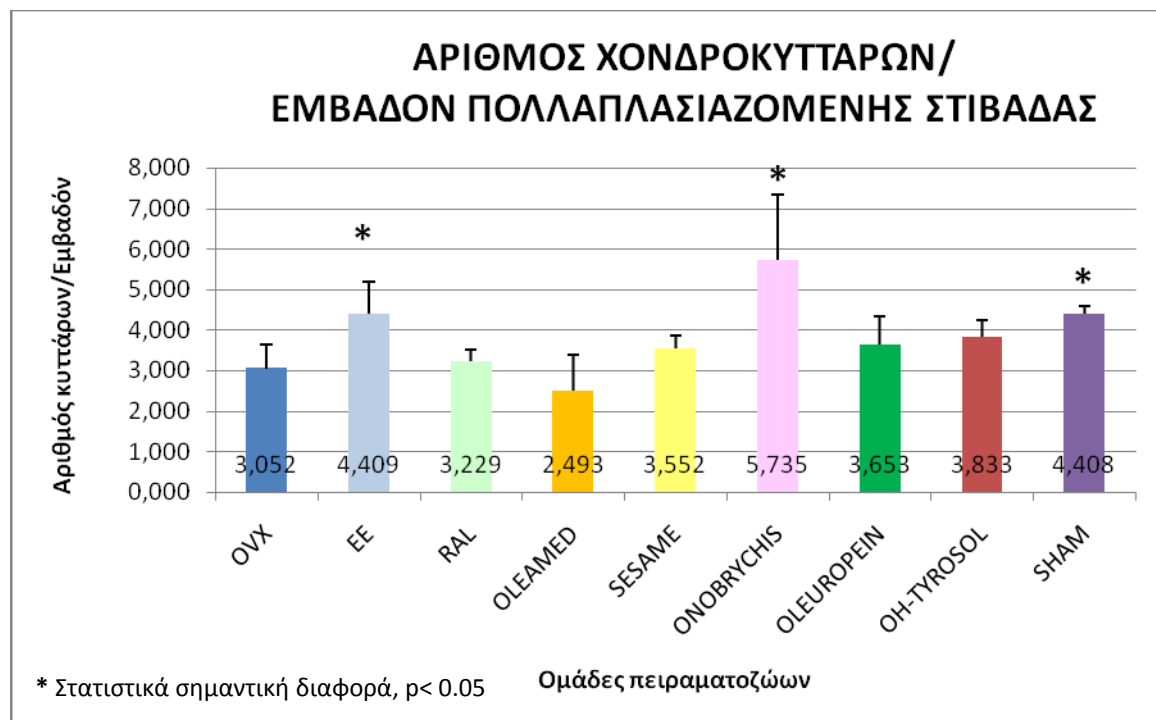


Σχήμα 3.11: Διαγραμματική απεικόνιση του πάχους της υπερτροφικής στιβάδας του κονδυλικού χόνδρου.

3.4.3. Αριθμός των χονδροκυττάρων της πολλαπλασιαζόμενης στιβάδας του κονδυλικού χόνδρου

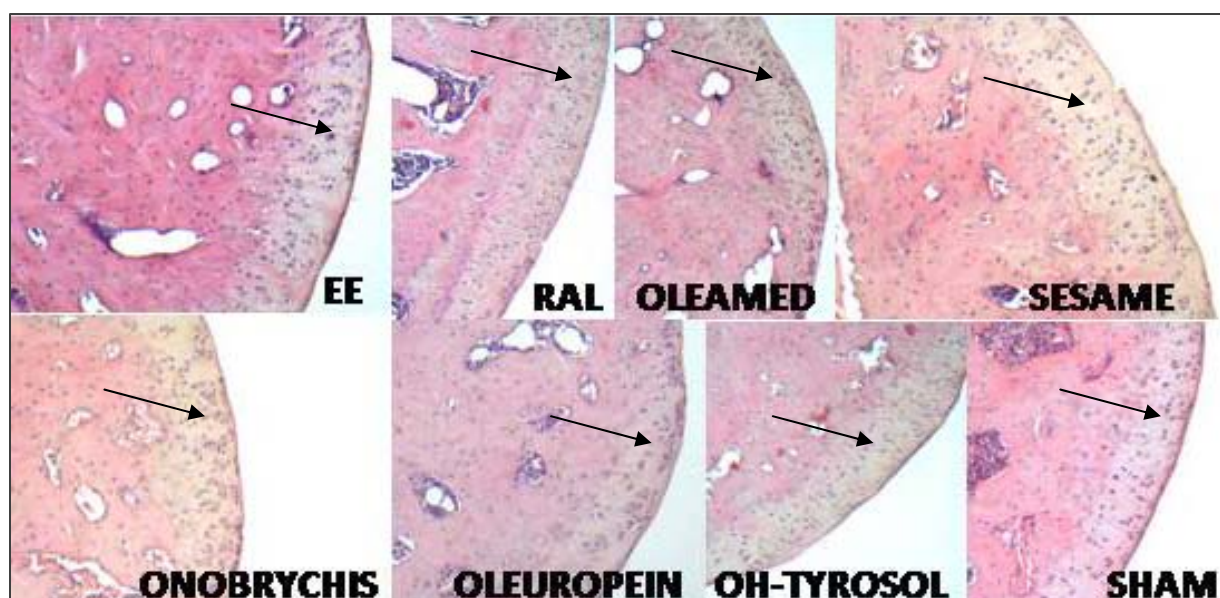
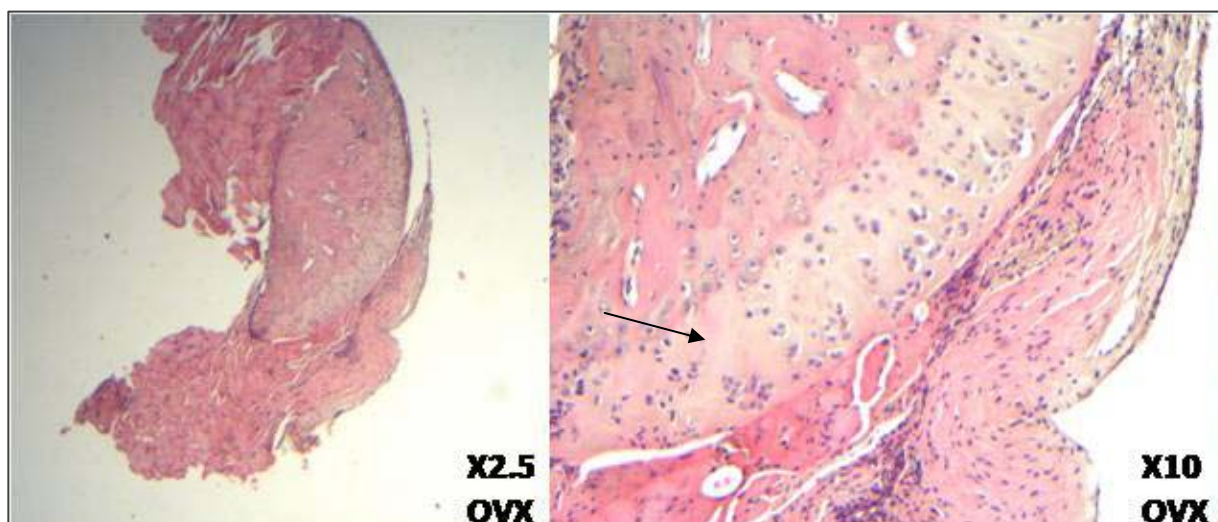
Στατιστικά σημαντικές διαφορές προέκυψαν και για τον αριθμό των χονδροκυττάρων του κονδυλικού χόνδρου στις διάφορες ομάδες ($F_{(8,44)} = 7.780$, $p =$

0.0001) (Σχήμα 3.12). Για την ακρίβεια ο αριθμός των χονδροκυττάρων της πολλαπλασιαζόμενης στοιβάδας διαιρέθηκε με το εμβαδόν της αντίστοιχης πολλαπλασιαζόμενης στιβάδας προτού επεξεργαστεί στατιστικά. Οι πειραματικές ομάδες ΕΕ και ΟΝΟΒΡΥΧΙΣ, παρουσίασαν αύξηση του αριθμού των χονδροκυττάρων συγκριτικά με την ομάδα των ωθηκεκτομημένων μυών κατά 44.46% ($p= 0.002$) στην ομάδα ΕΕ και κατά 87.91% ($p= 0.0001$) στην ομάδα ΟΝΟΒΡΥΧΙΣ. Επιπροσθέτως, αύξηση κατά 44.43% συγκριτικά με την ομάδα των ωθηκεκτομημένων μυών παρατηρήθηκε και στην ομάδα SHAM ($p= 0.006$).



Σχήμα 3.12: Διαγραμματική απεικόνιση του αριθμού των χονδροκυττάρων διαιρεμένου με το εμβαδόν της πολλαπλασιαζόμενης στιβάδας.

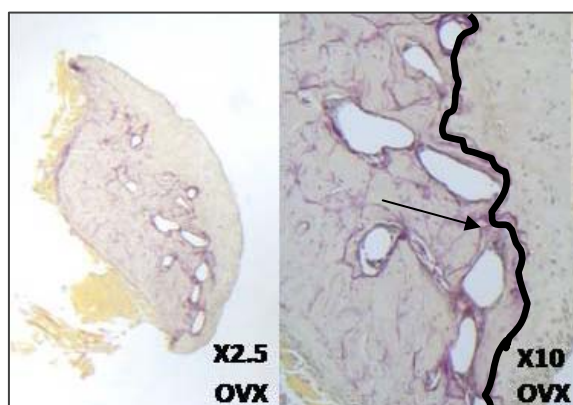
Στην εικόνα 3.5, παρατίθενται ενδεικτικές φωτογραφίες των ιστολογικών τομών των κονδύλων για κάθε ομάδα, όπου φαίνεται χαρακτηριστικά ο κονδυλικός χόνδρος.

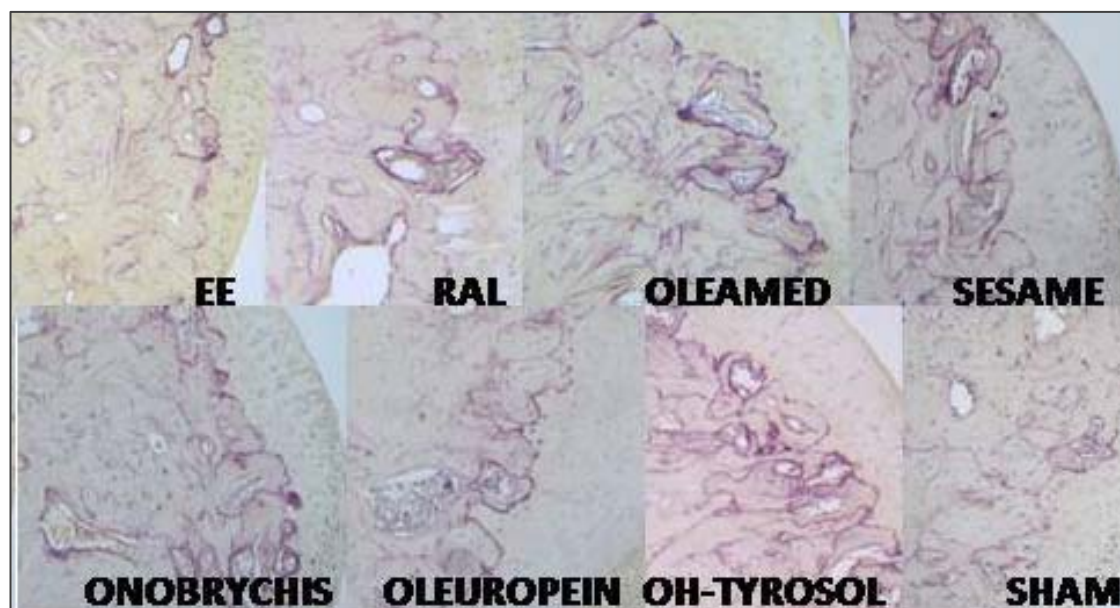


Εικόνα 3.5: Ενδεικτικές μικρο-φωτογραφίες του κονδύλου από τις ιστολογικές τομές βαμμένες με αιματοξυλίνη-εωσίνη. Τα βέλη απεικονίζουν τις περιοχές των κονδυλικών χόνδρων των πειραματόζων όλων των πειραματικών ομάδων (EE, RAL, OLEAMED, SESAME, ONOBRYCHIS, OLEUROPEIN, OH-TYROSOL), της ομάδας των ωθηκεκτομημένων μυών (OVX) και της ομάδας των άθικτων μυών (SHAM). Οι μεγεθύνσεις x2.5 και x10 αναφέρονται στον αντικειμενικό φακό του μικροσκοπίου.

3.5. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΡΙΘΜΟΥ TRAP-ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Στις ιστολογικές τομές που πραγματοποιήθηκε κυτταροχημική χρώση για ενεργότητα όξινης φωσφατάσης ανθεκτικής στο τρυγικό (χρώση TRAP), εκτιμήθηκε ποιοτικά ο αριθμός των TRAP-θετικών κυττάρων, ως δείκτης της οστεοκλαστικής δραστηριότητας. Η οστεοκλαστική δραστηριότητα εμφανίστηκε με έντονα μωβ χρώση και εντοπίστηκε στην περιοχή του οστού ακριβώς κάτω από τον κονδυλικό χόνδρο. Η ποιοτική σύγκριση των ιστολογικών τομών όλων των πειραματικών ομάδων, έδειξε πιθανή μείωση της οστεοκλαστικής δραστηριότητας συγκριτικά με την ομάδα των ωθηκεκτομημένων μυών, όπως απεικονίζεται και στην εικόνα 3.6. Ωστόσο, για την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων απαιτείται περαιτέρω ποσοτική εκτίμηση των μεταβολών με μέτρηση μεμονωμένα χρωσμένων οστεοκλαστών. Στην παρακάτω εικόνα, παρατίθενται χαρακτηριστικές ιστολογικές εικόνες των κονδύλων από κάθε ομάδα μυών (Εικόνα 3.6).



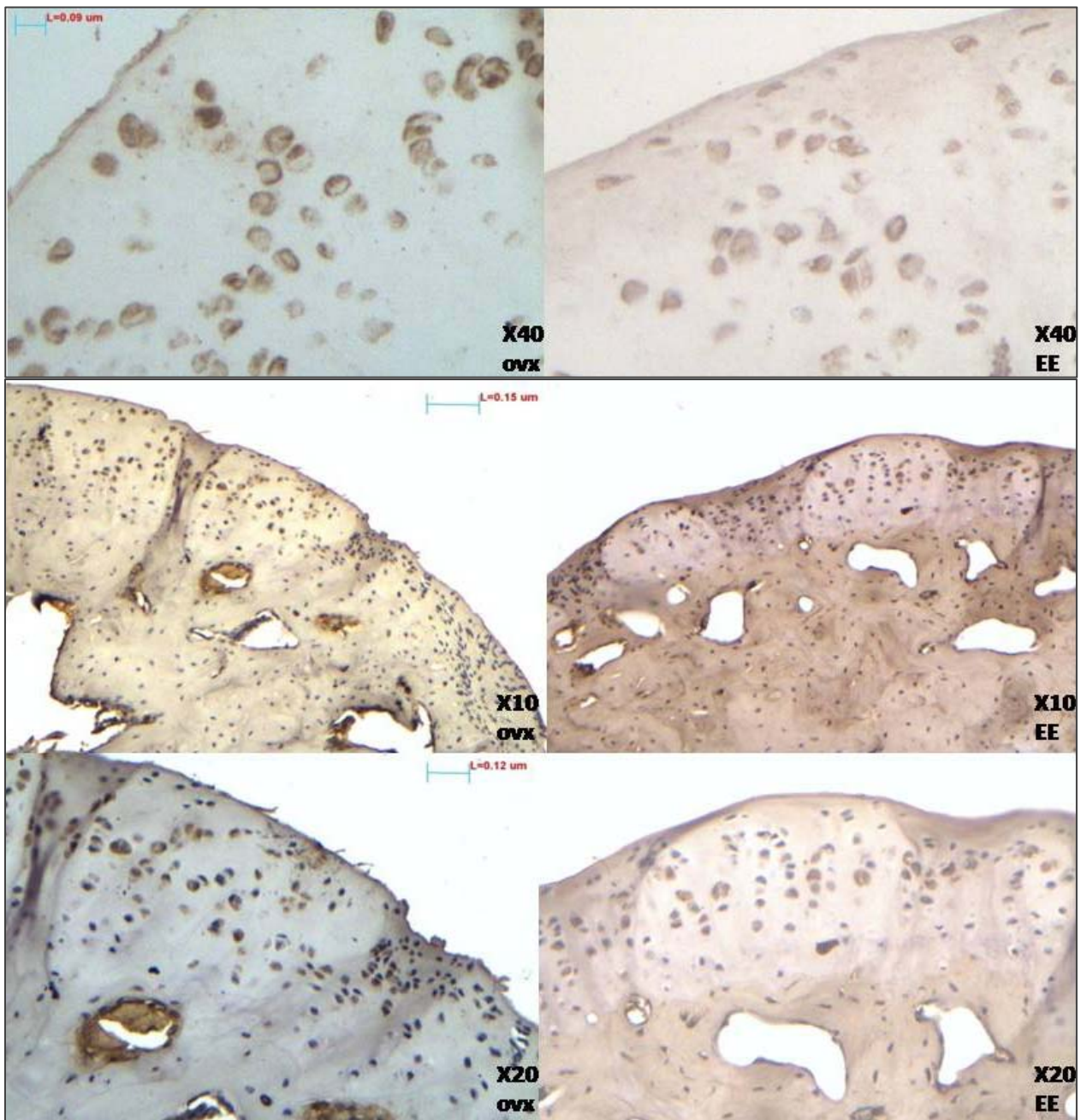


Εικόνα 3.6: Ενδεικτικές μικροφωτογραφίες ιστολογικών τομών μετά τη χρώση TRAP. Στη μεγέθυνση x10 της ομάδας OVX, με βέλος απεικονίζεται η περιοχή του οστού κάτω ακριβώς από τον κονδυλικό χόνδρο, ενώ με τη μαύρη γραμμή σχηματίζεται η διαχωριστική γραμμή μεταξύ τους. Θετικότητα εμφανίζεται στην περιοχή του οστού κάτω από τον κονδυλικό χόνδρο των πειραματοζώων όλων των ομάδων. Οι ιστολογικές τομές της ομάδας των ωοθηκεκτομημένων μυών απεικονίζονται σε μεγεθύνσεις x2.5 και x10 και φέρουν έντονη χρώση, ενώ οι ιστολογικές τομές των υπόλοιπων πειραματικών ομάδων (EE, RAL, OLEAMED, SESAME, ONOBRYSIS, OLEUROPEIN, OH-TYROSOL) και η ομάδα SHAM απεικονίζονται σε μεγέθυνση αντικειμενικού φακού x10.

3.6. ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΝΤΟΠΙΣΗ ΤΟΥ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ β (ER β)

Η ανοσοϊστοχημεία για την εντόπιση του οιστρογονικού υποδοχέα β (ER β), υπέδειξε ανοσοθετικά ER- β κύτταρα στην περιοχή του κονδυλικού χόνδρου. Η πυρηνική χρώση του ER- β απεικονίζεται με σαφήνεια στην εικόνα 3.7 και κυρίως στη μεγαλύτερη μεγέθυνση (x40). Παράλληλα, η σύγκριση μεταξύ των ωοθηκεκτομημένων πειραματοζώων, στα οποία είχε χορηγηθεί οιστραδιόλη και της ομάδας των ωοθηκεκτομημένων μυών, έδειξε ενδεχόμενη μείωση του αριθμού των

ER-β-θετικών κυττάρων στην πειραματική ομάδα ΕΕ (Εικόνα 3.7, x40). Παρόλα αυτά, η ποιοτική αυτή εκτίμηση της έκφρασης του οιστρογονικού υποδοχέα β, χρήζει επιβεβαίωσης με ποσοτικό προσδιορισμό των ERβ-θετικών κυττάρων σε μεγαλύτερο αριθμό τομών.



Εικόνα 3.7: Ενδεικτικές μικροφωτογραφίες της ανοσοϊστοχημικής εντόπισης του οιστρογονικού υποδοχέα β στην περιοχή του κονδυλικού χόνδρου των πειραματοζώων της ομάδας των ωθηκεκτομημένων μυών και της ΕΕ ομάδας. Οι φωτογραφίες έχουν ληφθεί με αντικειμενικό φακό x10, x20 και x40, ενώ στις πρώτες δύο απεικονίσεις έχει γίνει και συμπληρωματική χρώση με αιματοξυλίνη-εωσίνη.

ΣΥΝΟΨΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

(OVX: ομάδα ελέγχου, SHAM: άθικτα πειραματόζωα, EE, RAL, OLEAMED, SESAME, ONOBRUCHIS, OLEUROPEIN, OH-TYROSOL: πειραματικές ομάδες)

- ΟΣΤΙΚΗ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ κονδύλου κάτω γνάθου:

Η ωοθηκεκτομή σε διάστημα 4 εβδομάδων δε μετέβαλλε την οστική πυκνότητα του κονδύλου της κάτω γνάθου των θηλυκών μυών.

Στις ακτινογραφίες και στις απεικονίσεις με μαστογράφο, η οστική πυκνότητα του κονδύλου δε μεταβλήθηκε σε καμία από τις πειραματικές ομάδες, συγκριτικά με την ομάδα OVX.

- ΣΥΝΟΛΙΚΟ ΕΜΒΑΔΟΝ κονδύλου κάτω γνάθου:

Η ωοθηκεκτομή σε διάστημα 4 εβδομάδων δε μετέβαλλε το συνολικό εμβαδόν του κονδύλου της κάτω γνάθου των θηλυκών μυών.

Στις ακτινογραφίες δε διαπιστώθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των πειραματικών ομάδων. Στις φωτογραφίες, όμως, παρατηρήθηκε αύξηση του εμβαδού του κονδύλου στις ομάδες RAL, OLEAMED, OLEUROPEIN και OH-TYROSOL, συγκριτικά με την ομάδα OVX.

- ΠΛΑΤΟΣ ΚΟΝΔΥΛΙΚΟΥ ΑΥΧΕΝΑ:

Το πλάτος του κονδυλικού αυχένα δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων στις απεικονίσεις με μαστογράφο και στις φωτογραφίες.

- ΠΑΧΟΣ ΚΟΝΔΥΛΙΚΟΥ ΧΟΝΔΡΟΥ:

Η ωοθηκεκτομή σε διάστημα 4 εβδομάδων αύξησε σημαντικά το πάχος του κονδυλικού χόνδρου των θηλυκών μυών συγκριτικά με την ομάδα SHAM.

Σε όλες τις πειραματικές ομάδες (EE, RAL, OLEAMED, SESAME, ONOBRYCHIS, OLEUROPEIN, OH-TYROSOL) παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του πάχους του κονδυλικού χόνδρου συγκριτικά με την ομάδα OVX.

- ΠΑΧΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΖΟΜΕΝΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ του κονδυλικού χόνδρου:

Η ωοθηκεκτομή σε διάστημα 4 εβδομάδων αύξησε σημαντικά το πάχος της πολλαπλασιαζόμενης στιβάδας του κονδυλικού χόνδρου των θηλυκών μυών συγκριτικά με την ομάδα SHAM.

Στις πειραματικές ομάδες EE, ONOBRYCHIS, OLEUROPEIN και OH-TYROSOL παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του πάχους της πολλαπλασιαζόμενης στιβάδας του κονδυλικού χόνδρου συγκριτικά με την ομάδα OVX.

- ΠΑΧΟΣ ΥΠΕΡΤΡΟΦΙΚΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ του κονδυλικού χόνδρου:

Το πάχος της υπερτροφικής στιβάδας του κονδυλικού χόνδρου δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων.

-ΑΡΙΘΜΟΣ ΧΟΝΔΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΖΟΜΕΝΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ του κονδυλικού χόνδρου:

Η ωοθηκεκτομή σε διάστημα 4 εβδομάδων μείωσε σημαντικά τον αριθμό των χονδροκυττάρων της πολλαπλασιαζόμενης στιβάδας του κονδυλικού χόνδρου των θηλυκών μυών συγκριτικά με την ομάδα SHAM.

Στις πειραματικές ομάδες ΕΕ και ΟΝΟΒΡΥCHIS παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση του αριθμού των χονδροκυττάρων της πολλαπλασιαζόμενης στιβάδας του κονδυλικού χόνδρου συγκριτικά με την ομάδα ΟVΧ.

- ΑΡΙΘΜΟΣ TRAP-ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η ωοθηκεκτομή σε διάστημα 4 εβδομάδων οδήγησε σε πιθανή αύξηση των TRAP-θετικών οστεοκλαστών.

Στις πειραματικές ομάδες, διαπιστώθηκε πιθανή μείωση των TRAP-θετικών οστεοκλαστών συγκριτικά με την ομάδα ΟVΧ.

- ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΕΝΤΟΠΙΣΗ ΤΟΥ ΕRβ

Χορήγηση ΕΕ οδήγησε σε πιθανή μείωση του αριθμού των ΕR-β-θετικών κυττάρων συγκριτικά με την ομάδα ΟVΧ.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα τελευταία χρόνια, οι διαταραχές της κροταφογναθικής διάρθρωσης έχουν απασχολήσει μεγάλο μέρος του ιατρικού-οδοντιατρικού κόσμου, καθώς σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες, 50-60% του γενικού πληθυσμού έχει υποφέρει από διαταραχές της κροταφογναθικής διάρθρωσης και 75% των Καυκάσιων είχε μία ή περισσότερες λειτουργικές διαταραχές των διαρθρώσεων (Rugh και Solberg, 1985). Οι διαταραχές αυτές, εμφανίζονται πιο συχνά στις νεαρές γυναίκες, καθώς η πλειοψηφία των ασθενών (80%), που έχουν υποβληθεί σε θεραπεία για διαταραχές της κροταφογναθικής διάρθρωσης είναι γυναίκες (LeResche και συν 1997; Warren και Fried, 2001). Επιπλέον, η συχνότητα των διαταραχών αυτών αυξάνεται κατά 30% σε ασθενείς που υποβάλλονται σε θεραπεία με οιστρογόνα. Επομένως, αποτελεί ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον ερώτημα το κατά πόσο τα οιστρογόνα και οι διάφορες οιστρογονικές ενώσεις παίζουν κάποιο ρόλο στην παθογένεια των διαταραχών της κροταφογναθικής διάρθρωσης.

Πειραματικά, έχει αποδειχθεί ότι η δυσλειτουργία της κροταφογναθικής διάρθρωσης επειδενώνεται με χορήγηση οιστραδιόλης, ενώ η κατάσταση αυτή αντιστρέφεται με τη χορήγηση ταμοξιφένης, έναν ανταγωνιστή των οιστρογόνων. Επιπλέον, στον άνθρωπο έχει διαπιστωθεί ότι τα επίπεδα των οιστρογόνων στον ορό είναι αυξημένα στους ασθενείς με διαταραχές της κροταφογναθικής διάρθρωσης, συγκριτικά με τους υγιείς (Rosner και συν 1979; 1982; 1986). Οι Yun και συν (2008) υποστήριξαν ότι τα οιστρογόνα συμμετέχουν στην παθογένεια των διαταραχών της κροταφογναθικής διάρθρωσης διότι αυξάνουν τη σύνθεση των προφλεγμονωδών κυτοκινών (IL-1β, IL-6 και IL-8), οι συγκεντρώσεις των οποίων

μπορεί να σχετίζονται με τη σοβαρότητα της νόσου, ενώ δεν επιδρούν στην παραγωγή των αντιφλεγμονωδών κυτοκινών, όπως της IL-4 και IL-10. Πέρα από τα ευρήματα αυτά, αξίζει να σημειωθεί πως οποιαδήποτε αλλαγή στη μορφολογία και τη δομή του κονδύλου μπορεί να επηρεάσει την ΚΓΔ, ενώ η επίδραση των οιστρογόνων στον κονδυλικό χόνδρο είναι βέβαιη και έχει μελετηθεί από αρκετούς ερευνητές (Okuda και συν, 1996; Yamashiro και Takano-Yamamoto, 1998; Yasuoka και συν, 2000; Cheng και συν, 2000; Fujita και συν, 2001; 2006). Βάσει των ανωτέρω και στοχεύοντας στη διαλεύκανση της αιτιοπαθογένειας της νόσου της ΚΓΔ, είναι σημαντική η αξιολόγηση της γενικότερης επίδρασης των οιστρογόνων και των διαφόρων οιστρογονικών ενώσεων, που λαμβάνονται είτε θεραπευτικά ή μέσω της διατροφής, στον κόνδυλο της κάτω γνάθου και επομένως στην κροταφογναθική διάρθρωση.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν να εξεταστεί η επίδραση της χορήγησης οιστραδιόλης, ραλοξιφένης και φυτικών αναλόγων στον κόνδυλο της κάτω γνάθου ωθηκεκτομημένων θηλυκών μυών.

Ως πειραματόζωα επιλέχθηκαν οι μύες, επειδή παρουσιάζουν παρόμοιο τρόπο αύξησης της γνάθου τους με την ανθρώπινη (Tagliaferri και συν, 2014). Σημειώνεται ότι παρόμοιες μελέτες, που αφορούν την κροταφογναθική διάρθρωση, έχουν χρησιμοποιηθεί συχνότερα θηλυκοί αρουραίοι ή μεγαλύτερα ζώα (Cheng και συν, 2000; Tanaka και συν, 2000; Kuroda και συν, 2003; Patullo και συν, 2009; Yu και συν, 2009; 2012; Li και συν, 2012; Hong και Chen, 2013; Chen και συν, 2014), λόγω του μεγαλύτερου μεγέθους της γνάθου τους, ενώ θηλυκοί μύες έχουν χρησιμοποιηθεί

σε λιγότερες σχετικά μελέτες (Fujita και συν, 2001; 2004; 2006; Talwar και συν, 2006; Yun και συν, 2008; Kimura και συν, 2008; Kamiya και συν, 2013).

Το χρονικό διάστημα των 4 εβδομάδων μετά την ωθηκεκτομή, που επιλέχθηκε στην παρούσα μελέτη, θεωρείται με βάση τη βιβλιογραφία το συντομότερο χρονικό διάστημα για εμφάνιση βιολογικού αποτελέσματος λόγω της έλλειψης οιστρογόνων στον κόνδυλο της κάτω γνάθου (Yamashiro και Takano-Yamamoto, 1998; Tanaka και συν, 1999; 2000; Yasuoka και συν, 2000; Fujita και συν, 2001; 2004; Yu και συν, 2009; 2012; Chen και συν, 2014). Αρκετές άλλες μελέτες επιλέγουν μεγαλύτερο χρονικό διάστημα μετά την ωθηκεκτομή, το οποίο κυμαίνεται από 5 έως 12 εβδομάδες με μέσο όρο τις 8 εβδομάδες (Hidaka και συν, 2000; Fujita και συν, 2001; Kuroda και συν, 2003; Fujita και συν, 2006; Patullo και συν, 2009; Li και συν, 2012; Yu και συν, 2012; Kamiya και συν, 2013). Βεβαίως, ο χρόνος που επιλέγεται σε κάθε μελέτη αφορά τόσο στο ερώτημα που διερευνάται, όσο και στο σχήμα χορήγησης των υπό έλεγχο ενώσεων. Για παράδειγμα, αν η μελέτη αφορά στην ανάταξη μιας εγκατεστημένης οστεοπόρωσης, τότε το διάστημα μετά την ωθηκεκτομή συνήθως είναι αρκετά μεγαλύτερο πριν τη χορήγηση των ορμονών. Αν, όπως στην παρούσα μελέτη, το ερώτημα αφορά στην σύγκριση των δράσεων των θηλυκών ορμονών με φυτικά ανάλογά τους, σε ένα περιβάλλον χωρίς την παρεμβολή των ενδογενών ορμονών, τότε υιοθετείται η άμεση μετά την ωθηκεκτομή χορήγηση των ενώσεων και ο έλεγχος του αποτελέσματος μπορεί να ακολουθήσει σε διάστημα περίπου ενός μηνός.

Η οιστραδιόλη (με τη μορφή της αιθυνυλ-οιστραδιόλης, EE) χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ως θετικός μάρτυρας για τα υπό μελέτη φυτικά ανάλογα των

οιστρογόνων. Οι δράσεις της στον κόνδυλο της κάτω γνάθου έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα σε αρκετές εργασίες (Hidaka και συν, 2000; Yasuoka και συν, 2000; Fujita και συν, 2001; Cheng και συν, 2003; Talwar και συν, 2006; Yu και συν, 2009), που αναλύονται στη συνέχεια. Η επίδραση της ραλοξιφένης, η οποία αποτελεί έναν επιλεκτικό τροποποιητή των υποδοχέων οιστρογόνων, καθώς και ένα εναλλακτικό θεραπευτικό σχήμα ορμονικής υποκατάστασης, δεν έχει μελετηθεί στον κόνδυλο της κάτω γνάθου. Από τα φυτικά ανάλογα των οιστρογόνων μέχρι σήμερα έχει μελετηθεί, κυρίως, η γενιστεΐνη για την επίδρασή της στον κόνδυλο της κάτω γνάθου και έχειδειχθεί ότι μεταβάλλει τόσο το πάχος του κονδυλικού χόνδρου και την οστική πυκνότητα του κονδύλου, όσο και την έκφραση των οιστρογονικών υποδοχέων α και β (Yu και συν, 2012; Li και συν, 2012). Στην παρούσα διπλωματική εργασία ελέγχονται για πρώτη φορά ως προς την επίδρασή τους στον κόνδυλο της κάτω γνάθου διαφορετικά φυτικά ανάλογα των οιστρογόνων (Oleamed, Sesame, Onobrychis, Oleuropein, Oh-tyrosol) που δεν έχουν μελετηθεί ξανά στο παρελθόν. Σε τρεις πρόσφατες μελέτες, δύο από τα υπό έλεγχο φυτικά ανάλογα, η OH-Tyrosol και η Oleuropein εμφάνισαν θετικά αποτελέσματα για την αντιμετώπιση της οστικής απώλειας σε μοντέλα ποντικών και αρουραίων με μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση και η OH-Tyrosol εμφανίστηκε in vitro λιγότερο δραστική από την Oleuropein (Saleh και Saleh, 2011; Hagiwara και συν, 2011; Keiler και συν, 2014).

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην **οστική πυκνότητα του κονδύλου** της κάτω γνάθου των ωοθηκεκτομημένων πειραματοζώων, ύστερα από χορήγηση των οιστρογονικών ενώσεων ή του εκδόχου ούτε στους ψευδοχειρουργημένους μυς. Τα ευρήματα αυτά συνάδουν με την

πλειοψηφία των μελετών στη βιβλιογραφία. Στη μελέτη των Tanaka και συν (1998), δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην πυκνότητα του οστού του κονδύλου ανάμεσα στους ωθηκεκτομημένους και ψευδοχειρουργημένους αρουραίους, ηλικίας 120 ημερών, σε 7, 14, 30 και 60 ημέρες μετά την ωθηκεκτομή. Οι συγγραφείς εξηγούν πως η διαφορά στην οστική πυκνότητα πιθανά είναι αρκετά μικρή, ώστε να ανιχνευθεί από το DXA. Αντίθετα, υποστηρίζουν ότι οι ακτινογραφίες μάλλον αντανakλούν πιο λογικά τις αλλαγές που μπορούν να παρατηρηθούν στον κόνδυλο της κάτω γνάθου αρουραίων. Καμία διαφορά, επίσης, στην οστική πυκνότητα δεν παρατηρήθηκε από τους Hidaka και συν (2000) μετά από 49 ημέρες χορήγησης οιστραδιόλης σε ωθηκεκτομημένους αρουραίους. Επιπλέον, στη μελέτη των Patullo και συν (2009), μετά από χορήγηση μαλακής και σκληρής τροφής σε 24 ωθηκεκτομημένους και ψευδοχειρουργημένους αρουραίους, ηλικίας 4 μηνών, φάνηκε ότι η υπολειτουργία του μαστηριού συστήματος ήταν ο κύριος παράγοντας που επάγει την απώλεια του φατνιακού οστού και που προκαλεί επιβλαβή επίδραση στην ποιότητα του οστού θηλυκών αρουραίων. Μάλιστα, υποστηρίζεται ότι οι δυνάμεις που δέχεται η κάτω γνάθος κατά τη διάρκεια της μάσησης είναι πιο σημαντικές για τη διατήρηση της πυκνότητάς της από την έλλειψη οιστρογόνων. Αντίθετα, στη μελέτη των Yasuoka και συν (2000), παρατηρήθηκε αύξηση οστικού σχηματισμού μετά από χορήγηση 17-β οιστραδιόλης για 1 και 2 εβδομάδες σε 50 αρουραίους, ηλικίας 4 εβδομάδων. Οι συγγραφείς υποστηρίζουν ότι το εύρημα αυτό μπορεί να υποδηλώνει αντιδραστικό σχηματισμό σπογγώδους οστού εξ αιτίας αυξημένης μηχανικής φόρτισης, η οποία είναι δευτερογενές αποτέλεσμα της επιπέδωσης του κονδύλου. Άρα τα

αποτελέσματα της μελέτης αυτής δείχνουν ότι οι επιδράσεις της ωθηκεκτομής και της αντικατάστασης με 17-β οιστραδιόλη στην αναδιαμόρφωση του οστού και του χόνδρου μπορεί να ποικίλλουν ανάλογα με την περιοχή, και επομένως παράγοντες που σχετίζονται με τη μηχανική φόρτιση στον κόνδυλο, μπορούν να επιδεινώσουν ή να εμποδίσουν τις εκφυλιστικές αλλαγές στην ΚΓΔ, που μπορούν να παρουσιαστούν από διαταραχή των οιστρογόνων (Yasuoka και συν, 2000). Ωστόσο, όπως και στις μελέτες των Tanaka και συν (2000), των Kuroda και συν (2003) και των Fujita και συν (2006), στις οποίες παρατηρήθηκε μείωση της οστικής πυκνότητας του κονδύλου, αυτή αφορούσε σε αρουραίους πολύ νεαρής ηλικίας (5-120 ημερών), όπου οι παρατηρούμενες οστικές μεταβολές θα εμφανίζονταν πιο σύντομα συγκριτικά με την ηλικία των 6 μηνών των ποντικών της παρούσας μελέτης. Επιπλέον, το χρονικό διάστημα μετά την ωθηκεκτομή ή τη χορήγηση των οιστρογονικών ενώσεων στις προαναφερθείσες μελέτες (56-120 ημέρες) ήταν μεγαλύτερο από το χρονικό διάστημα χορήγησης των οιστρογονικών ενώσεων, που επιλέχθηκε στην παρούσα ερευνητική εργασία και ως εκ τούτου είναι λογική η εμφάνιση περισσότερων μεταβολών στην πυκνότητα του κονδυλικού οστού.

Όσον αφορά το **εμβαδόν του συνολικού κονδύλου**, (που μετρήθηκε από τις φωτογραφίες), βρέθηκε ότι αυξήθηκε το εμβαδόν του κονδύλου στις ομάδες που χορηγήθηκε RAL, OLEAMED, OLEUROPEIN και OH-TYROSOL, συγκριτικά με την ομάδα των ωθηκεκτομημένων μυών, ενώ στην ομάδα EE η αυξητική τάση που παρατηρήθηκε δεν ήταν στατιστικά σημαντική, πιθανά λόγω της μεγάλης τυπικής απόκλισης των μετρήσεων. Σημειώνεται ότι στατιστικά σημαντική διαφορά προέκυψε μόνο από τις μετρήσεις των φωτογραφιών, πιθανά λόγω καλύτερης

ευκρίνειας των ορίων του κονδύλου σε σύγκριση με τις ακτινογραφίες. Στην πλειοψηφία των μελετών με παρόμοιο ή και μεγαλύτερο χρονικό διάστημα μετά την ωθηκεκτομή/ ή χορήγηση οιστραδιόλης, φαίνεται ότι επίσης παρατηρήθηκε μείωση του όγκου του οστού του κονδύλου μετά την ωθηκεκτομή και αύξηση στα ωθηκεκτομημένα πειραματόζωα στα οποία χορηγήθηκε οιστραδιόλη (Okuda et al, 1996; Fujita et al, 1998; Tanaka et al, 1999; 2000; Yasuoka et al, 2000; Fujita et al, 2001; 2004; 2006; Kamiya et al, 2013). Αντίθετα, στη μελέτη των Yamashiro και Takano-Yamamoto (1998), δε βρέθηκε καμία διαφορά στον όγκο του οστού του κονδύλου 10 αρουραίων, ηλικίας 6 εβδομάδων, 32 ημέρες μετά την ωθηκεκτομή. Με αυτά τα αποτελέσματα συμφωνεί η μελέτη των Patullo και συν (2009), όπου επίσης δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στον όγκο του οστού του κονδύλου σε 24 αρουραίους ηλικίας 4 μηνών, 9 εβδομάδες μετά την ωθηκεκτομή. Η χρήση πιο εξειδικευμένων απεικονιστικών μεθόδων, όπως του micro-CT, που χρησιμοποιείται από τις περισσότερες μελέτες στη βιβλιογραφία (Fujita και συν, 2004; Kamiya και συν, 2013), πιθανώς επιτρέπει τον εντοπισμό περισσότερων μικρομεταβολών στον όγκο του οστού του κονδύλου, η ανίχνευση των οποίων δεν είναι δυνατή από πιο συμβατικές μεθόδους, όπως οι ακτινογραφίες.

Το **πλάτος του κονδυλικού αυχένα**, των πειραματοζώων δεν παρουσίασε καμία διαφορά ανάμεσα στις ομάδες. Το εύρημα αυτό δεν είναι συγκρίσιμο με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, καθώς δεν έχει πραγματοποιηθεί παρόμοια μέτρηση έως σήμερα.

Πιο αξιοσημείωτες μεταβολές, από ότι στο οστό του κονδύλου, παρατηρήθηκαν στον **κονδυλικό χόνδρο**, ο οποίος βρέθηκε μειωμένος σε όλες τις ομάδες,

συγκριτικά με την ομάδα των ωοθηκεκτομημένων ποντικών. Τα ευρήματά μας αυτά είναι σε πλήρη συμφωνία με τη βιβλιογραφία όσον αφορά τη δράση της οιστραδιόλης, καθώς σε όλες τις προηγούμενες μελέτες παρατηρήθηκε ιστολογικά αύξηση του κονδυλικού χόνδρου στα ωοθηκεκτομημένα πειραματόζωα και μείωσή του σε εκείνα στα οποία είχε χορηγηθεί οιστραδιόλη (Okuda και συν, 1996; Yamashiro και Takano-Yamamoto, 1998; Fujita και συν, 1998; Ng και συν, 1999; Yasuoka και συν, 2000; Cheng και συν, 2000; Fujita και συν, 2001; 2006; Talwar και συν, 2006). Επομένως, τα αποτελέσματά μας ανέδειξαν ότι τα φυτικά ανάλογα των οιστρογόνων που ελέγχθηκαν (OLEAMED, SESAME, ONOBRYCHIS, OLEUROPEIN, OH-TYROSOL), αλλά και η ραλοξιφένη, εμφανίζουν δράση ανάλογη της οιστραδιόλης στον κονδυλικό χόνδρο.

Η παρούσα μελέτη εξέτασε επιπλέον τυχόν αλλαγές στο πάχος των επιμέρους στιβάδων του κονδυλικού χόνδρου, μια παράμετρο που λίγες μελέτες στη βιβλιογραφία έχουν αναφέρει μέχρι σήμερα. Διαπιστώσαμε μείωση του πάχους της πολλαπλασιαζόμενης στιβάδας, στις ομάδες που έλαβαν EE, ONOBRYCHIS, OLEUROPEIN, OH-TYROSOL και στα SHAM, σε σύγκριση με τα ωοθηκεκτομημένα πειραματόζωα. Σημειώνεται ότι στην υπερτροφική στιβάδα του κονδυλικού χόνδρου δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή, υποδεικνύοντας ότι η μείωση του πάχους του συνολικού κονδυλικού χόνδρου, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, πιθανά οφείλεται στη μεταβολή του πάχους κυρίως της πολλαπλασιαζόμενης στιβάδας. Στην πλειοψηφία των προηγούμενων μελετών, παρατηρήθηκε αύξηση μετά την ωοθηκεκτομή κυρίως στην πολλαπλασιαζόμενη και στην υπερτροφική στιβάδα, ή μείωση της πολλαπλασιαζόμενης στιβάδας στην

ομάδα των ποντικών στα οποία χορηγήθηκε οιστραδιόλη (Talwar και συν, 2006), σε συμφωνία με τα ευρήματά μας.

Ένα άλλο εύρημα της μελέτης μας είναι ότι ο **συνολικός αριθμός των χονδροκυττάρων** στην πολλαπλασιαζόμενη στιβάδα αυξήθηκε στις ομάδες που έλαβαν ΕΕ, ONOBRYCHIS και στην ομάδα SHAM, σε σύγκριση με την ομάδα των ωοθηκεκτομημένων ποντικών. Στις υπάρχουσες μελέτες ουσιαστικά δεν υπάρχει αντίθεση με τα ευρήματα της παρούσας εργασίας, καθώς έχουν υπολογίσει μόνο τον αριθμό των πολλαπλασιαζόμενων χονδροκυττάρων και όχι του συνόλου τους και επομένως τα αποτελέσματά τους δείχνουν ότι ο αριθμός των πολλαπλασιαζόμενων χονδροκυττάρων δεν αυξάνεται, αλλά μειώνεται με τη χορήγηση οιστραδιόλης και γενιστεΐνης στα πειραματόζωα (Ng και συν, 1999; Cheng και συν, 2003; Talwar και συν, 2006; Yu και συν, 2012). Σε πρόσφατη μελέτη των Kamiya και συν (2013), βρέθηκε ότι τα θηλυκά ποντίκια με αποσιώπηση του γονιδίου για τον οιστρογονικό υποδοχέα β (ERβ KO) είχαν αυξημένο αριθμό κυττάρων στην πολλαπλασιαζόμενη στιβάδα, γεγονός που συμφωνεί με τα δικά μας ευρήματα. Οι συγγραφείς υποστηρίζουν ότι αυτή η αύξηση μπορεί να οφείλεται σε καθυστέρηση εξόδου των κυττάρων από τον κυτταρικό κύκλο, καθώς βρήκαν στατιστικά σημαντική μείωση του αριθμού των BrdU - σημασμένων κυττάρων στα wild-type θηλυκά, στα οποία χορηγήθηκε βρωμο-δεοξουριδίνη (BrdU) 16 ώρες πριν την ευθανασία συγκριτικά με αυτά, στα οποία η χορήγηση έγινε 3 ώρες πριν την ευθανασία. Οι εν λόγω συγγραφείς έδειξαν λοιπόν ότι η διαγραφή του ERβ οδήγησε σε καθυστέρηση εξόδου των κυττάρων από την πολλαπλασιαζόμενη στιβάδα. Προτείνουν δε, ότι τα υψηλά επίπεδα οιστρογόνων κατά την εφηβεία

μπορεί να μειώνουν τον αριθμό των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων στον κονδυλικό χόνδρο της κάτω γνάθου, έχοντας ως αποτέλεσμα οι γυναίκες στη φάση της μετεφηβείας να είναι λιγότερο δεκτικές στην επαγόμενη από τη μηχανική φόρτιση αναδιαμόρφωση της ΚΓΔ (Kamiga και συν, 2013). Η εξήγηση αυτή των ευρημάτων από τους συγγραφείς θα μπορούσε πιθανά να δικαιολογήσει και την αύξηση του συνολικού αριθμού των κυττάρων που παρατηρήθηκε στα δικά μας αποτελέσματα.

Η ποιοτική παρατήρηση των **TRAP-θετικών κυττάρων** στην παρούσα εργασία, έδειξε πιθανή μείωση των οστεοκλαστών στις ομάδες, που είχαν χορηγηθεί οιστρογονικές ενώσεις, σε σύγκριση με την ομάδα των ωθηκεκτομημένων ποντικών. Τα ευρήματα αυτά φαίνεται να επιβεβαιώνονται από τα δεδομένα στη βιβλιογραφία, καθώς σε όλες τις μελέτες, παρατηρείται αύξηση των οστεοκλαστών στα ωθηκεκτομημένα πειραματόζωα και μείωσή τους σε αυτά, στα οποία έχει χορηγηθεί και οιστραδιόλη, με όλες τις μελέτες να εστιάζουν στην περιοχή του οστού κάτω από τον κονδυλικό χόνδρο (Fujita και συν, 1998; Tanaka και συν, 2000; Fujita και συν, 2001; 2006; Chen και συν, 2014).

Όσον αφορά την ανοσοϊστοχημική εντόπιση του **οιστρογονικού υποδοχέα β** στις τομές των κονδύλων των πειραματοζώων, τεχνικές δυσκολίες δεν επέτρεψαν τον ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό του. Παρόλα αυτά, ποιοτικά παρατηρήθηκε εντόπιση του οιστρογονικού υποδοχέα β στον πυρήνα των κυττάρων και πιθανή μείωση της εντόπισής του στην ομάδα των ωθηκεκτομημένων ποντικών με χορήγηση οιστραδιόλης. Η βιβλιογραφία επιβεβαιώνει τα ευρήματά μας, ωστόσο η πλειοψηφία των μελετών ερευνά ταυτόχρονα και την έκφραση του οιστρογονικού

υποδοχέα α, σε συνδυασμό με εκείνη του οιστρογονικού υποδοχέα β. Φαίνεται ότι ο οιστρογονικός υποδοχέας α εντοπίζεται και στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα, ενώ ο οιστρογονικός υποδοχέας β μόνο στον πυρήνα των κυττάρων. Η χορήγηση οιστραδιόλης οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης του οιστρογονικού υποδοχέα α και μείωση της έκφρασης του οιστρογονικού υποδοχέα β (Yu και συν, 2009; Hong and Chen, 2013; Chen et al, 2014). Επιπλέον, οι Kamiya και συν (2013) έδειξαν ότι η έκφραση του οιστρογονικού υποδοχέα β σχετίζεται με τα επίπεδα των οστεοκλαστών και τον όγκο του οστού, καθώς τα ERβ KO ποντίκια στη μελέτη αυτή παρουσίασαν μειωμένο αριθμό οστεοκλαστών και αυξημένο όγκο κονδύλου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνοψίζοντας, από την παρούσα διπλωματική εργασία προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα:

- Η ωοθηκεκτομή επηρεάζει το στοματογοναθικό σύστημα των μυών και συγκεκριμένα τον κόνδυλο της κάτω γνάθου.
- Οι επιδράσεις των χορηγούμενων οιστρογονικών ενώσεων στους μυς αφορούν κυρίως το εμβαδόν του κονδύλου, τον κονδυλικό χόνδρο, την πολλαπλασιαζόμενη στιβάδα του και το συνολικό αριθμό των χονδροκυττάρων στην πολλαπλασιαζόμενη στιβάδα και διαφέρουν ως προς την οιστρογονική ένωση.
- Πιθανή είναι η επίδραση των οιστρογονικών ενώσεων στον αριθμό των οστεοκλαστών στην επιφάνεια του οστού του κονδύλου κάτω από τον κονδυλικό χόνδρο και στην έκφραση του οιστρογονικού υποδοχέα β , ωστόσο απαιτείται ποσοτικός προσδιορισμός τους.
- Μετά από χρονικό διάστημα 4 εβδομάδων, δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στην οστική πυκνότητα του κονδύλου, στο πλάτος του κονδυλικού αυχένα και στην υπερτροφική στιβάδα του κονδυλικού χόνδρου.
- Η αξιοσημείωτη επίδραση των περισσότερων οιστρογονικών ενώσεων της μελέτης στον κόνδυλο της κάτω γνάθου μυών, επιβεβαιώνει τη σχέση των οιστρογόνων, καθώς και των χορηγούμενων οιστρογονομιμητικών ενώσεων

για την πρόληψη ή τη θεραπεία της οστεοπόρωσης, με τις διαταραχές της κροταφογναθικής διάρθρωσης.

- Λόγω των μεταβολών στη δομή και τη μορφολογία του κόνδylου της κάτω γνάθου, που προκαλούνται από την αύξηση των οιστρογόνων ή των χορηγούμενων οιστρογονικών ενώσεων, ο κόνδυλος εμφανίζει μεγαλύτερη επιρρέπεια στην ανάπτυξη διαταραχών της κροταφογναθικής διάρθρωσης.
- Τα φυτικά ανάλογα των οιστρογόνων φαίνεται να μιμούνται τη δράση των οιστρογόνων, απαιτούνται όμως περαιτέρω μελέτες που να αφορούν την επίδρασή τους στον κόνδυλο της κάτω γνάθου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια, οι διαταραχές της κροταφογναθικής διάρθρωσης έχουν απασχολήσει την ιατρική κοινότητα, ιατρούς και οδοντιάτρους, καθώς σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες, μεγάλο ποσοστό του γενικού πληθυσμού και ιδίως νεαρές γυναίκες πάσχουν από διαταραχές της κροταφογναθικής διάρθρωσης. Η συχνότητά τους αυξάνεται με τη θεραπεία με οιστρογόνα και πειραματικά έχει αποδειχθεί ότι η δυσλειτουργία της κροταφογναθικής διάρθρωσης επιδεινώνεται με χορήγηση οιστραδιόλης, μία κατάσταση που αντιστρέφεται με τη λήψη ανταγωνιστών οιστρογόνων. Επιπλέον, υποστηρίζεται ότι τα οιστρογόνα συμμετέχουν στην παθογένεια των διαταραχών της κροταφογναθικής διάρθρωσης αυξάνοντας τη σύνθεση των προφλεγμονωδών κυτοκινών. Επομένως, είναι σημαντική η αξιολόγηση της γενικότερης επίδρασης των οιστρογόνων και άλλων οιστρογονικών ενώσεων, που λαμβάνονται μέσω της διατροφής, στον κόνδυλο της κάτω γνάθου, ως βασικής μονάδας στην κροταφογναθική διάρθρωση, με στόχο τη διαλεύκανση του ρόλου τους στην αιτιοπαθογένεια των διαταραχών της κροταφογναθικής διάρθρωσης.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν να εξεταστεί η επίδραση της χορήγησης οιστραδιόλης EE, ραλοξιφένης RAL, και φυτικών αναλόγων (OLEAMED, SESAME, ONOBRYCHIS, OLEUROPEIN και OH-TYROSOL) στον κόνδυλο της κάτω γνάθου ωθηκεκτομημένων (OVX) μυών. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν 57 θηλυκοί μύες C57, ηλικίας 6 μηνών, στους 50 από τους οποίους πραγματοποιήθηκε ωθηκεκτομή, ενώ στους υπόλοιπους 7 διενεργήθηκε χειρουργική επέμβαση, χωρίς την αφαίρεση των ωθηκών (SHAM). Στη συνέχεια, τα πειραματόζωα

διαχωρίστηκαν σε 9 ομάδες (SHAM, OVX, EE, RAL, OLEAMED, SESAME, ONOBRYCHIS, OLEUROPEIN, OH-TYROSOL), εκ των οποίων οι πρώτες δύο (SHAM και OVX) αποτέλεσαν τις ομάδες ελέγχου. Οι οιστρογονικές ενώσεις χορηγήθηκαν από την επόμενη μέρα της επέμβασης και σε ημερήσια βάση, για διάστημα 4 εβδομάδων. Τα αποτελέσματα εκτιμήθηκαν με ακτινολογικές και φωτογραφικές απεικονίσεις, καθώς και ιστολογικά. Η ακτινολογική αξιολόγηση περιελάμβανε ακτινογραφίες και απεικονίσεις με ψηφιακό μαστογράφο του κονδύλου της κάτω γνάθου των πειραματοζώων, ενώ για τις ιστολογικές αναλύσεις διενεργήθηκαν χρώσεις αιματοξυλίνης-εωσίνης, TRAP και ανοσοϊστοχημεία για τον οιστρογονικό υποδοχέα β σε λεπτές τομές παραφίνης.

Τα αποτελέσματά μας, συγκεντρωτικά, έδειξαν ότι οι επιδράσεις των χορηγούμενων οιστρογονικών ενώσεων αφορούν, κυρίως, το εμβαδόν του κονδύλου, τον κονδυλικό χόνδρο, την πολλαπλασιαζόμενη στιβάδα του και το συνολικό αριθμό των χονδροκυττάρων στην πολλαπλασιαζόμενη στιβάδα, ενώ διαφέρουν ως προς την οιστρογονική ένωση. Πιθανή είναι η επίδραση των οιστρογονικών ενώσεων στον αριθμό των οστεοκλαστών στην επιφάνεια του οστού του κονδύλου, κάτω από τον κονδυλικό χόνδρο και στην έκφραση του οιστρογονικού υποδοχέα β , απαιτείται, όμως, περαιτέρω ποσοτικός προσδιορισμός τους. Δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στην οστική πυκνότητα του κονδύλου, στο πλάτος του κονδυλικού αυχένα και στην υπερτροφική στιβάδα του κονδυλικού χόνδρου.

Από την παρούσα διπλωματική εργασία, συμπεραίνεται ότι η έλλειψη οιστρογόνων επηρεάζει το στοματογναθικό σύστημα και συγκεκριμένα τον κόνδυλο της κάτω γνάθου των μυών που μελετήθηκαν. Η αξιοσημείωτη επίδραση των περισσότερων

οιστρογονικών ενώσεων της μελέτης στον κόνδυλο της κάτω γνάθου, επιβεβαιώνει το γεγονός ότι τα οιστρογόνα, καθώς και οι χορηγούμενες οιστρογονικές ενώσεις για την πρόληψη ή τη θεραπεία της οστεοπόρωσης, σχετίζονται με τις διαταραχές της κροταφογναθικής διάρθρωσης. Λόγω των μεταβολών στη δομή και τη μορφολογία του κονδύλου της κάτω γνάθου, που προκαλούνται από την αύξηση των οιστρογόνων ή των χορηγούμενων οιστρογονικών ενώσεων, ο κόνδυλος είναι πιθανόν να εμφανίζει μεγαλύτερη επιρρέπεια στην ανάπτυξη διαταραχών της κροταφογναθικής διάρθρωσης. Τα φυτικά ανάλογα των οιστρογόνων φαίνεται να μιμούνται τη δράση των οιστρογόνων, απαιτούνται όμως περαιτέρω μελέτες που να αφορούν την επίδρασή τους στον κόνδυλο τη κάτω γνάθου.

Λέξεις κλειδιά: *διαταραχές κροταφογναθικής διάρθρωσης, οιστρογόνα, φυτοοιστρογόνα, κόνδυλος κάτω γνάθου*

SUMMARY

In recent years, temporomandibular joint (TMJ) disorders have been studied by the majority of the medical-dental world, as according to epidemiological studies, a great percentage of the general population, especially young women, suffer from TMJ disorders. Their frequency increases with estrogenic therapy. Experimentally, TMJ dysfunction exacerbates by the administration of estradiol and the situation is reversed by treatment with estrogens antagonists. Estrogens are possibly involved in the pathogenesis of TMJ disorders by increasing the synthesis of proinflammatory cytokines. It is, therefore, important to evaluate the overall effect of estrogens and other estrogenic compounds in the mandibular condyle, which is the basic unit in the TMJ, aiming to a greater elucidation of their role in the pathogenesis of TMJ disorders.

The aim of this Master's thesis was to examine the effect of the administration of estradiol (EE), raloxifene (RAL) and phytoestrogens (OLEAMED, SESAME, ONOBRYCHIS, OLEUROPEIN, OH-TYROSOL) in the mandibular condyle of ovariectomized female mice. For this purpose, 57 female, 6 month-old, C57 mice were used. Ovariectomy (OVX) was performed in 50 of them and sham-operation in the remaining 7 animals (SHAM). Afterwards, the mice were distributed into 9 groups (SHAM, OVX, EE, RAL, OLEAMED, SESAME, ONOBRYCHIS, OLEUROPEIN, OH-TYROSOL), the first two of which consisted the control groups. The administration of the estrogenic compounds started the day next to surgery and was continued daily for 4 weeks. The results on condylar bone density and cartilage histomorphometry

were evaluated through radiographic or photographic images and histological sections, respectively. Radiographic evaluation included optical density determination of radiographs and digital mammograph images. Histological analysis included paraffin sections stained with hematoxylin-eosin, TRAP and slices subjected to immunohistochemistry for the detection of estrogen receptor b.

Our results, collectively, revealed that the administered estrogenic compounds significantly affected the condylar area, the condylar cartilage and its proliferating layer and as well as the total number of chondrocytes in the proliferating layer; alterations differed among the estrogenic compounds. No significant differences were noted in the bone mineral density of the condyle, in the width of the condylar neck and in the hypertrophic layer of the condylar cartilage. An effect in the number of osteoclasts at the bone surface, directly beneath the cartilage zone, needs further quantification. Similarly, possibly induced changes in estrogen receptor b immunoreactivity need further evaluation.

In conclusion, this study showed that ovariectomy affects the oromandibular system and specifically the mandibular condyle. The remarkable effect of most of the estrogenic compounds in the mandibular condyle, in this study, confirms the association of estrogen and other estrogen compounds, which are administrated for the prevention and treatment of osteoporosis, with TMJ disorders. Due to the changes in the structure and morphology of the mandibular condyle, caused by the increase of estrogens or administered estrogenic compounds, it is possible that the condyle is more prone to the development of temporomandibular joint disorders.

Phytoestrogens appear to mimic the action of estrogens, but further studies concerning their effect on the mandibular condyle are required.

Key words: *temporomandibular joint disorders, ovariectomy, estrogens, phytoestrogens, mandibular condyle*

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abubaker AO, Hebda PC, Gunsolley JN. Effects of sex hormones on protein and collagen content of the temporomandibular joint disc of the rat. *J Oral Maxillofac Surg* 1996; 54:721.
- Abubaker AO, John F, Sotereanos GC, et al. Prevalence of female sex hormone use by female TMJ patients. *J Dent Res* 1992; 71:1225.
- Abubaker AO, Raslan WF, Sotereanos GC. Estrogen and progesterone receptors in temporomandibular joint discs of symptomatic and asymptomatic persons: a preliminary study. *J Oral Maxillofac Surg.* 1993; 51(10):1096–100.
- Ανδρικοπούλου Μ. Μελέτη κρανιογναθικών διαταραχών σε γυναίκες πάσχουσες από σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών. Διδακτορική Διατριβή 2003.
- Appleton J. The ultrastructure of the articular tissue of the mandibular condyle in the rat. *Archs Oral Biol* 1975; 20:823-826.
- Aronica SM, Kraus WL, Katzenellenbogen BS. Estrogen action via the cAMP signaling pathway: Stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:8517.
- Aufdemorte TB, Van Sickels JE, Dolwick MF, Sheridan PJ, Holt GR, Aragon SB, Gates GA. Estrogen receptors in the temporomandibular joint of the baboon (*Papio cynocephalus*): an autoradiographic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1986; 61(4):307–14.
- Bell WE. Classification of disorders in the president's conference on the examination, diagnosis and management of temporomandibular disorders. *Am Dent Assoc Chicago* 1983; 24-9.
- Bell WE. Temporomandibular Disorders. Classification, Diagnosis, Management. 3rd ed Publ Year Book Medical Chicago 1990; 166-176.
- Beresford WA. Chondroid bone secondary cartilage and metaplasia. Baltimore, Munich: Urban & Schwarzenberg. 1981; 1–11.
- Bertolini R, Wendler D, Hartmann E. Die entwicklung der symphysis mentis beim menschen. *An Anz* 1967; 121:55-71.
- Bhaksar SN. Growth pattern of the rat mandible from 13 days insemination age to 30 days after birth. *Am J Anat* 1953; 92:1-53.
- Bjork A. Variations in the growth pattern of the human mandible: longitudinal radiographic study by the implant method. *J Dent Res.* 1963; 42(1):400-11.

- Blackwood HJJ. Growth of the mandibular condyle of the rat studied with tritiated thymidine. Arch Oral Biol 1966; 11:493–500.
- Blackwood JJJ. Pathology of the temporomandibular joint. JADA 1969; 79:118.
- Boering G, Stegenga B, deBont LG. Temporomandibular joint osteoarthritis and internal derangement. Part I: Clinical course and initial treatment. Int Dent J 1990; 40:339.
- Boering G. Anatomical and physiological considerations regarding the temporomandibular joint. International Dental Journal FDI, Wright Bristol. 1979; 29:245.
- Bord S, Horner A, Beavan S, Compston J. Estrogen receptors alpha and beta are differentially expressed in developing human bone. J Clin Endocrinol Metab. 2001; 86(5):2309-14.
- Bravetti P, Membre H, Haddiovi A, El Gerard h, Fyad J-P, Mahler P, Gandy J-F. Histological study of the human temporomandibular joint and its surrounding muscles. Surgical and Radiologic Anatomy 2004; 371-378.
- Bresin A, Kiliaridis S, Strid K G. Effect of masticatory function on the internal bone structure in the mandible of the growing rat. European Journal of Oral Sciences 1999; 107:35– 44.
- Carlsson GE, Droukas B. Η σύγκριση των δοντιών και η υγεία του στοματογναθικού συστήματος. Οδοντοστοματολογική Πρόοδος 1983; 37:203.
- Carlsson GE, Oberg T. Remodeling of the TMJ. In Temporomandibular Joint Function and Dysfunction Eds Zarb GA and Carlsson. Munkgaard-Copenhagen 1979.
- Chen YM, Ho SC, Lam SS, Ho SS, Woo JL. Beneficial effect of soy isoflavones on bone mineral content was modified by years since menopause, body weight, and calcium intake: a double-blind, randomized, controlled trial. Menopause 2004; 11:246–54.
- Chen X, Cai C, Liu J, Wen L, Wang X, Ding Y. Impact of estrogen-related receptor α on the biological characteristics of rat mandibular condylar chondrocytes. Mol Med Rep. 2014; 10(1):195-202.
- Cheng P, Ma X, Li S, Li T, Sun K. Histologic study of the temporomandibular joints after ovariectomy in rats. Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi 2000; 35:458–462.
- Cheng P, Ma X, Xue Y, Li S, Zhang Z. Effects of oestradiol on proliferation and metabolism of rabbit mandibular condylar cartilage cells in vitro. Chin Med J (Engl) 2003; 116:1413–17.
- Copray JC, Liem RS. Ultrastructural changes associated with weaning in the mandibular condyle of the rat. Acta Anat 1989; 134:35–47.

- Couse JF, Lindzey J, Grandien K et al. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology* 1997; 138:4613–21.
- Craft RM. Modulation of pain by estrogens. *Pain*. 2007; 132 (1):3–12.
- Dayani N, Corvol MT, Robel P, Eychenne B, Monchamont B, Tsagris L, Rappaport R. Estrogen receptors in cultured rabbit articular chondrocytes: influence of age. *J Steroid Biochem*. 1988; 31(3):351-6.
- De Boever JA. Functional disturbances of the temporomandibular joints. *Oral Sci Rev* 2 1973; 2:100.
- Delatte M, Von den Hoff JW, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. Growth stimulation of mandibular condyles and femoral heads of newborn rats by IGF-I. *Archives of Oral Biology* 2004; 49:165–175.
- Durkin J, Heeley J, Irving JT. The cartilage of the mandibular condyle. *Oral Sci Rev* 1973; 2:29-99.
- Duterloo HS, Wolters JM. Experiments on the significance of articular function as a stimulating chondrogenic factor for the growth of secondary cartilages of the rat mandible. *Trans Eur Orthod Soc, London*, 1971; 103-115.
- Duterloo HS. In vivo transplantation of the mandibular condyle of the rat. An experimental investigation of the growth of the lower jaw. Thesis, University of Nijmegen, Nijmegen, 1967.
- Ehrlich J, Bab I, Yaffe A, Sela J. Calcification patterns of rat condylar cartilage after induced unilateral malocclusion. *J Oral Pathol* 1982; 11:366–73.
- Ehrlich J, Yaffe A, Shanfeld JL, Montgomery PC, Davidovitch Z. Immunohistochemical localization and distribution of cyclic nucleotides in the rat mandibular condyle in response to an induced occlusal change. *Arch Oral Biol* 1980; 25: 545–552.
- Enlow DH. *Facial growth* 3rd ed, Philadelphia WB Saunders Co, 1990.
- Enlow DH. JCO/Interviews: Dr Donald H Enlow on craniofacial growth. *J Clin Orthod* 1983; 17:669-679.
- Eriksen EF, Colvard DS, Berg NJ, Graham ML, Mann KG, Spelsberg TC, Riggs BL. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science*. 1988; 241(4861):84-6.
- Ermshar C. Anatomy and neuroanatomy. In: Diseases of the temporomandibular apparatus. Morgan D, Hall W, Vamnas S. The CV Mosby Co, Saint Louis, 1977.

- Evans GL, Turner RT. Tissue-selective actions of estrogen analogs. *Bone*. 1995; 17(4):181-190.
- Farman AG, Esposito CJ, Veal SJ. Myofascial pain-dysfunction syndrome: analysis of 164 cases. *Quintessence Int* 1982; 13:1279–85.
- Fitzpatrick LA. Estrogen therapy for postmenopausal osteoporosis. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2006; 50:705–19.
- Frommer J, Monroe WC, Morehead RJ, Belt WD. Autoradiographic study of cellular proliferation during early development of the mandibular condyle in mice. *J Dent Res* 1968; 47:816-819.
- Fujita T, Kawata T, Tokimasa C, Kohno S, Kaku M, Tanne K. Breadth of the mandibular condyle affected by disturbances of the sex hormones in ovariectomized and orchietomized mice. *Clin Orthod Res*. 2001; 4(3):172–6.
- Fujita T, Kawata T, Tokimasa C, Tanne K. Influence of oestrogen and androgen on modelling of the mandibular condylar bone in ovariectomized and orchietomized growing mice. *Arch Oral Biol* 2001(a); 46:57-65.
- Fujita T, Ohtani J, Shigekawa M, Kawata T, Kaku M, Kohno S et al. Effects of sex hormone disturbances on craniofacial growth in newborn mice. *J Dent Res* 2004; 83:250–4.
- Fujita T, Ohtani J, Shigekawa M, Kawata T, Kaku M, Kohno S, Motokawa M, Tohma Y, Tanne K. Influence of sex hormone disturbances on the internal structure of the mandible in newborn mice. *Eur J Orthod*. 2006; 28(2):190–4.
- Fujita T, Kawata T, Tokimasa C, Kaku M, Kawasoko S, Tanne K. Influences of ovariectomy and orchietomy on the remodeling of mandibular condyle in mice. *J Craniofac Genet Dev Biol*. 1998; 18(3):164-70.
- Furstman L. The early development of the human temporomandibular joint. *Am J Orthod* 1963; 49:672-680.
- Galal N, El Beialy W, Deyama Y, Yoshimura Y, Yoshikawa T, Suzuki K, Totsuka Y. Effect of estrogen on bone resorption and inflammation in the temporomandibular joint cellular elements. *Int J Mol Med*. 2008; 21(6):785–90.
- Gardner E. Osteogenesis in the human embryo and fetus. In: *The biochemistry and Physiology of bone*. Vol III. 2nd edition, Academic Press New York, London 1971; 77-116.
- Gazit D, Ehrlich J, Kohen Y, Bab I. Effect of occlusal (mechanical) stimulus on bone remodelling in rat mandibular condyle. *J Oral Pathol* 1987; 16:395–398.
- Gianelly A, Moores W. Condylectomy in the rat. *Arch Oral Biol* 1965; 10:101.

- Gibson GI, Flint MH. Type X collagen synthesis by chick sternal cartilage and its relationship to endochondral development. *J Cell Biol* 1985; 101:277–284.
- Green CS, Leman M, Sutcher H, Laskin D. The TMJ pain dysfunction syndrome heterogeneity of the patient population. *J Amer Dent Ass* 1969; 79: 1168.
- Greene CS. The application of modern pain management concepts to the myofascial pain-dysfunction (MPP) syndrome. In: Yojito Kawamura and Dubner R (Eds). *Oral Facial Sensory and motor functions* Quintessence Publ, Co, Inc. 1981.
- Grosfeld O, Jackowska M, Czarnecka B. Results of epidemiological examinations of the temporomandibular joint in adolescents and young adults. *J Oral Rehabil* 1985; 12:95–105.
- Gustafsson JA, Warner M. Estrogen receptor b in the breast: role in estrogen responsiveness and development of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000; 74: 245–48
- Guyton A, Hall J. Introduction to endocrinology. In: WB Saunders editors. *Textbook of Medical Physiology*, 11th edn. Pennsylvania: Elsevier 2006; 906–7.
- Hagiwara K, Goto T, Araki M, Miyazaki H, Hagiwara H. Olive polyphenol hydroxytyrosol prevents bone loss. *Eur J Pharmacol*.2011; 662(1-3):78-84.
- Hall BK. The formation of adventitious cartilage by membrane bones under the influence of mechanical stimulation applied in vitro. *Life sci* 1967; 6:663-667.
- Hansson T, Oberg T, Carlsson G, Kopp S. Thickness of soft tissue layers and the articular disc in the TMJ, *Acta Odont Scand* 1977; 35:77-85.
- Hayes AM. Histologic study of regeneration of the mandibular condyle after unilateral condylectomy in the rat. *J Dent Res* 1967; 46:483.
- Haynes MP, Li L, Sinha D, Russell KS, Hisamoto K, Baron R, Collinge M, Sessa WC, Bender JR. Src kinase mediates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent rapid endothelial nitric-oxide synthase activation by estrogen. *J Biol Chem*. 2003; 278(4):2118-23.
- Headache Classification Subcommittee of the International Headache Society. The international Classification of Headache disorders, ed 2 *Cephalalgia* 2004; 24(1):1-150.
- Heeley JD, Dobecek JM, Derice RA. [3H] thymidine uptake in cells of rat condylar cartilage. *Am J Anat* 1983; 167:451–462.
- Helkimo M. Epidemiological surveys of dysfunction of the masticatory system. *Oral Sciences Rev* 1976; 7:54.

- Heloe B, Heloe LA. The occurrence of TMJ disorders in an elderly population as evaluated by recording of “subjective” and “objective” symptoms. *Acta Odontol Scand* 1978; 36:3-9.
- Hidaka S, Okamoto Y, Yamada Y, Miyazaki K, Kimura T. Alterations in the periodontium after ovariectomy in rats: the effects of a Japanese herbal medicine, Chujo-to. *Phytother Res*. 2000;14(7):527-33.
- Hinton RJ, Carlson DS. Response of the mandibular joint to loss of incisal function in the rat. *Acta Anat* 1986; 125:145-151.
- Hinton RJ, Stinson JL. Effect of postoperative diet on condylar cartilage response to discectomy. *J Oral Maxillofac Surg* 1997; 55: 1259.
- Hinton RJ. Relationships between mandibular joint size and craniofacial size in human groups. *Archs Oral Biol* 1983; 28:37– 43.
- Hinton RJ. Effect of altered masticatory function on [3H] - thymidine and [35S]-sulfate incorporation in the condylar cartilage of the rat. *Acta Anat* 1988; 131:136.
- Hong L, Chen CJ. Effect of estradiol on the expression of estrogen receptor in mandibular condylar cartilage cell of rat. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue*. 2013; 22(3):278-81.
- Huiskes R, Ruimerman R, van Lenthe GH, Janssen JD. Effects of mechanical forces on maintenance and adaptation of form in trabecular bone. *Nature*. 2000; 405(6787):704-6.
- Hwang C J, Cha J Y. Orthodontic treatment with growth hormone therapy in a girl of short stature. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* 2004; 126: 118– 126.
- Improta-Brears T, Whorton AR, Codazzi F, et al. Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase requires mobilization of intracellular calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:4686.
- Inoue H, Hiraki Y, Nawa T, Ishizeki K. Phenotypic switching of in vitro mandibular condylar cartilage during matrix mineralization. *Anat Sci Int* 2002; 7:237–246.
- Jiang G, Matsumoto H, Fuji A. Mandible bone loss in osteoporosis rats. *J Bone Miner Metab* 2003; 21:388–395.
- Johanson A, Unell L, Carlsson GE, Soderfeldt B, Halling A. Gender difference in symptoms related to temporomandibular disorders in a population of 50-year-old subjects. *J Orofac Pain* 2003; 17:29-35.

- Kamiya Y, Chen J, Xu M, Utreja A, Choi T, Drissi H, Wadhwa S. Increased mandibular condylar growth in mice with estrogen receptor beta deficiency. *J Bone Miner Res.* 2013; 28(5):1127-34.
- Kang SC, Lee DG, Choi JH, Kim ST, Kim YK, Ahn HJ. Association between estrogen receptor polymorphism and pain susceptibility in female temporomandibular joint osteoarthritis patients. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2007; 36(5):391–4.
- Kapila S. Does the relaxin, estrogen and matrix metalloproteinase axis contribute to degradation of TMJ fibrocartilage? *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2003; 3:401–405.
- Keiler AM, Zierau O, Bernhardt R, Scharnweber D, Lemonakis N, Termetzi A, Skaltsounis L, Vollmer G, Halabalaki M. Impact of a functionalized olive oil extract on the uterus and the bone in a model of postmenopausal osteoporosis. *Eur J Nutr.* 2014; 53(4):1073-81.
- Keith DA. Development of the human temporomandibular joint. *Brit J Oral Surg* 1982; 20:217-224.
- Kimura M, Miyazawa K, Tabuchi M, Maeda H, Kameyama Y, Goto S. Bisphosphonate treatment increases the size of the mandibular condyle and normalizes growth of the mandibular ramus in osteoprotegerin-deficient mice. *Calcif Tissue Int.* 2008; 82(2):137-47.
- Komm BS, Terpening CM, Benz DJ, Graeme KA, Gallegos A, Korc M, Greene GL, O'Malley BW, Haussler MR. Estrogen binding, receptor mRNA, and biologic response in osteoblast-like osteosarcoma cells. *Science.* 1988; 241(4861):81-4.
- Koski KJ. Cranial growth center: Facts or Fallacies? *Am J Orthodont* 1968; 54:566.
- Kuroda S, Mukohyama H, Kondo H, Aoki K, Ohya K, Ohyama T, Kasugai S. Bone mineral density of the mandible in ovariectomized rats: analyses using dual energy X-ray absorptiometry and peripheral quantitative computed tomography. *Oral Dis.* 2003; 9(1):24-8.
- Landi N, Lombardi I, Manfredini D, Casarosa E, Biondi K, Gabbanini M, Bosco M. Sexual hormone serum levels and temporomandibular disorders. A preliminary study. *Gynecol Endocrinol.* 2005; 20(2):99–103.
- LeResche L, Saunders K, Barlow W, et al. Does oral contraceptive use increase the risk of temporomandibular disorder pain? Seattle, WA, Abstracts: 7th World Congress on Pain, L4SP Publications, 1993; 294.
- LeResche L, Dworkin SF, Saunders K, et al. Is postmenopausal hormone use a risk factor for TMD? *J Dent Res* 1994;73:675.

- LeResche L, Mancl L, Sherman JJ, Gandara B, Dworkin SF. Changes in temporomandibular pain and other symptoms across the menstrual cycle. *Pain* 2003; 106:253-261.
- LeResche L, Saunders K, Von Korff MR, Barlow W, Dworkin SF. Use of exogenous hormones and risk of temporomandibular disorder pain. *Pain*. 1997; 69(1-2):153-60.
- Li M, Shen Y, Wronski TJ. Time course of femoral neck osteopenia in ovariectomized rats. *Bone* 1997; 20:55-61.
- Li YQ, Xing XH, Wang H, Weng XL, Yu SB, Dong GY. Dose-dependent effects of genistein on bone homeostasis in rats' mandibular subchondral bone. *Acta Pharmacol Sin*. 2012; 33(1):66-74.
- Livne E, von der Mark K, Silbermann M. Morphologic and cytochemical changes in maturing and osteoarthritic articular cartilage in the temporomandibular joint of mice. *Arthritis Rheum* 1985; 28:1027-1038.
- Loewit K, Wense T, Wunderer H. Hormonelle Störungen und Arthropathien der Kiefergelenke. *Osterr Z Stomatol* 1973; 70: 122.
- Lorenzo J. A new hypothesis for how sex steroid hormones regulate bone mass. *J Clin Invest* 2003; 111:1641-3.
- Luder HU, Leblond CP, von der Mark K. Cellular stages in cartilage formation as revealed by morphometry, radioautography and type II collagen immunostaining of the mandibular condyle from weanling rats. *Am J Anat* 1988; 182:197-214.
- Luder HU, Schroeder HE. Light and electron microscopic morphology of the temporomandibular joint in growing and mature crab-eating monkeys (*Macaca fascicularis*): the condylar calcified cartilage. *Anat Embryol* 1992; 185:189-199.
- Ma YF, Ke HZ, Jee WSS. Prostaglandin E2 adds bone to a cancellous bone with a closed growth plate and low bone turnover in ovariectomized rats. *Bone* 1994; 15:137-146.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. 1995; 83(6):835-9.
- Manolagas SC, Kousteni S, Jilka RL. Sex steroids and bone. *Recent Prog Horm Res* 2002; 57:385-409.
- Μανώλαγας Σ. Κυτταρικοί και μοριακοί μηχανισμοί μετεμμηνοπαυσιακής και γεροντικής οστεοπόρωσης. *Οστούν* 1996; 7:230-3.

- Márquez Hernández RA, Ohtani J, Fujita T, Sunagawa H, Kawata T, Kaku M et al. Sex hormone receptors play a crucial role in the control of femoral and mandibular growth in newborn mice. *Eur J Orthod*. 2011.
- Marini H, Minutoli L, Polito F, Bitto A, Altavilla D, Atteritano M, et al. Effects of the phytoestrogen genistein on bone metabolism in osteopenic postmenopausal women: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2007; 146: 839–47.
- McNamara JA Jr, Carlson DS. Quantitative analysis of temporomandibular joint adaptations to protrusive function. *Am J Orthod* 1979; 76:593–611.
- McNamara JA Jr. Orthodontic treatment and temporomandibular disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1997; 83:107.
- McNeill C. Temporomandibular disorders. Guidelines for classification, assessment and management. The American Academy of Orofacial Pain. Quintessence Pub Co Chicago 1993; 81-107.
- Meisler JG. Chronic pain conditions in women. *J Womens Health*. 1999; 8(3):313–20.
- Messina M, Ho S, Alekel DL. Skeletal benefits of soy isoflavones: a review of the clinical trial and epidemiologic data. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2004; 7:649–58.
- Milam SB, Aufdemorte TB, Sheridan PJ, Triplett RG, VanSickels JE, Holt GR. Sexual dimorphism in the distribution of estrogen receptors in the temporomandibular joint complex of the baboon. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1987; 64(5):527–32.
- Mizoguchi I, Nakamura M, Takahashi I, Kagayama M, Mitani H. An immunohistochemical study of localization of type I and type II collagens in mandibular condylar cartilage compared with tibial growth plate. *Histochemistry* 1990; 93:593–599.
- Mizoguchi I, Takahashi I, Nakamura M, Sasano Y, Sato S, Kagayama M, Mitani H. An immunohistochemical study of regional differences in the distribution of type I and II collagens in rat mandibular condylar cartilage. *Arch Oral Biol* 1996; 41:863–869.
- Mongini F. Condylar remodeling after occlusal therapy. *J Prosthet Dent* 1980; 43:568–577.
- Moore A. Head growth of the maccaca monkeys as revealed by vital staining, embedding and undercalcified sectioning. *Am J Orthodont* 1949; 35:654.
- Moore K. Βασική εμβρυολογία και συγγενείς ανωμαλίες. Μετάφραση: Κοντόπουλος Α, Καραβίτη Λ. Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας, Αθήνα 1978.

- Moore WJ. Bone growth and remodelling. Στο Lavelle CLB: Applied physiology of the mouth. Wright and Sons , Ltd, Bristol. 1975.
- Morabito N, Crisafulli A, Vergara C, Gaudio A, Lasco A, Frisina N, et al. Effects of genistein and hormone-replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: a randomized double-blind placebocontrolled study. J Bone Miner Res 2002; 17:1904–12.
- Morimoto K, Hashimoto N, Suetsugu T. Prenatal developmental process of human temporomandibular joint. J Prosthet Dent 1987; 57(6):723-30.
- Morishima A, Grumbach MM, Simpson ER, Fisher C, Qin K. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. J Clin Endocrinol Metab 1995; 80:3689-3698.
- Moriya Y, Ito K, Murai S. Effects of experimental osteoporosis on alveolar bone loss in rats. J Oral Sci 1998;40:171–175.
- Moyers RE. Handbook of Orthodontics 4th Edit. Year Book Medical Publishers, Inc. Chicago, London, Boca Raton 1988; 39-40.
- Murray P. Adventitious (secondary) cartilage in the chick embryo and the development of certain bones and articulations in the chick skull. Austr J Zool 1963; 11:368-430.
- Nakajima M, Ejiri S, Tanaka M, Toyooka E, Kohno S, Ozawa H. Effect of intermittent administration of human parathyroid hormone (1-34) on the mandibular condyle of ovariectomized rats. J Bone Miner Metab 2000; 18:9-17.
- Nasatzky E, Schwartz Z, Boyan BD, et al. Sex-dependent effects of 17-beta-estradiol on chondrocyte differentiation in culture. J Cell Physiol 1994; 154:359.
- Nasatzky E, Schwartz Z, Soskolne WA, et al. Evidence for receptors specific for 17 beta-estradiol and testosterone in chondrocyte cultures. Connect Tissue Res 1994; 30:277–94 .
- Nekora-Azak A. Temporomandibular disorders in relation to female reproductive hormones: a literature review. J Prosthet Dent. 2004;91(5):491-3.
- Nevitt MC, Cummings SR, Lane NE, Hochberg MC, Scott JC, Pressman AR, et al. Association of estrogen replacement therapy with the risk of osteoarthritis of the hip in elderly white women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. Arch Intern Med 1996; 156:2073–80.
- Ng MC, Harper RP, Le CT, Wong BS. Effects of estrogen on the condylar cartilage of the rat mandible in organ culture. J Oral Maxillofac Surg 1999; 57:818–823.

- Obrez A, Gallo L. Anatomy and function of the TMJ. In Laskin D, Greene C, Hylander W. TMD'S. An evidence based approach to diagnosis and treatment. Quintessence Publ Co 2006; 37-39.
- Ohashi N, Ejiri S, Hanada K, Ozawa H. Changes in type I, II, and X collagen immunoreactivity of the mandibular condylar cartilage in a naturally aging rat model. J Bone Miner Metab 1997; 15:77–83.
- Okeson JP. Orofacial pain: Guidelines for assessment, diagnosis and management. The American Academy of Orofacial Pain 1996; Quintessence Pub Co Chicago.
- Okuda T, Yasuoka T, Nakashima M, Oka N. The effect of ovariectomy on the temporomandibular joints of growing rats. J Oral Maxillofac Surg 1996; 54(10):1210-1211.
- Omi N, Ezawa I. The effect of ovariectomy on bone metabolism in rats. Bone 1995; 17:163-168.
- Osborne CK, Schiff R. Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. J Clin Oncol. 2005; 23(8):1616-22.
- Oshikawa M, Sugano N, Ishigaki R, Ito K. Gene expression in the developing rat mandible: a gene array study. Archives of Oral Biology 2004; 49 :325–329.
- Otha y, Suwa F, Yang L, Wang H. Development and histology of fibrous architecture of the fetal temporomandibular joint. Okajimas Folia Anat Jpn 1993; 70(1):1-5.
- Parker MN. A dynamic model of etiology in temporomandibular disorders. J Ann Dent Assoc 1990; 120:283.
- Patullo IM, Takayama L, Patullo RF, Jorgetti V, Pereira RM. Influence of ovariectomy and masticatory hypofunction on mandibular bone remodeling. Oral Dis. 2009; 15(8):580-6.
- Peltola JS. Radiological variations in mandibular condyles of Finnish students, one group orthodontically treated and the other not. Eur J Orthod. 1993; 15(3):223-7.
- Pensler JM, Langman CB, Radosevich JA, Maminta ML, Mangkornkanok M, Higbee R, Molteni A. Sex steroid hormone receptors in normal and dysplastic bone disorders in children. J Bone Miner Res. 1990; 5(5):493-8.
- Poole AR, Pidoux I. Immunoelectron microscopic studies of type X collagen in endochondral ossification. J Cell Biol 1989; 109:2547–2554.
- Proffit WR. Contemporary Orthodontics 2nd ed. The CV Mosby Co St Louis, 1993.
- Rasmussen OC. Description of population and progress of symptoms in a longitudinal study of temporomandibular ar- thropathy. Stand J Dent Res 1981; 89:196.

- Razandi M, Pedram A, Greene GI, Levin R. Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of Er α and ER β expressed in the Chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol* 1999; 13:307-19.
- Riancho JA, García-Ibarbia C, Gravani A, Raine EV, Rodríguez-Fontenla C, Soto-Hermida A, Rego-Perez I, Dodd AW, Gómez-Reino JJ, Zarrabeitia MT, Garcés CM, Carr A, Blanco F, González A, Loughlin J. Common variations in estrogen-related genes are associated with severe large-joint osteoarthritis: a multicenter genetic and functional study. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010; 18(7):927-33.
- Richards LC, Lau E, Wilson DF. Histopathology of the mandibular condyle. *J Oral Pathol* 1984; 14:624-630.
- Richmond RS, Carlson CS, Register TC, Shanker G, Loeser RF. Functional oestrogen receptors in adult articular cartilage: oestrogen replacement therapy increases chondrocyte synthesis of proteoglycans and insulin-like growth factor binding protein 2. *Arthritis Rheum* 2000; 43:2081–90.
- Riggs BL, Hartmann LC. Selective estrogen-receptor modulators -- mechanisms of action and application to clinical practice. *N Engl J Med* 2003; 348(7):618–29.
- Riggs L. Bone turnover in age-related osteoporosis: early contributions of Pierre Delmas. *Osteoporos Int* 2009; 20:1289–90.
- Rosenthal HE, Ludwig GA, Pietzzak E, Sandber AA. Binding of the sulfates of estradiol-17b to human serum albumin and plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 1975; 41:1144.
- Rosner IA, Goldberg VM, Getzy L, Moskowitz RW. Effects of estrogen on cartilage and experimentally induced osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 1979; 22(1):52-8.
- Rosner IA, Malemud CJ, Goldberg VM, Papay RS, Getzy L, Moskowitz RW. Pathologic and metabolic responses of experimental osteoarthritis to estradiol and an estradiol antagonist. *Clin Orthop Relat Res*. 1982; 171:280-6.
- Rosner IA, Goldberg VM, Moskowitz RW. Estrogens and osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res*. 1986; 213:77-83.
- Rugh JD, Solberg WK. Oral health status in the United States: temporomandibular disorders. *J Dent Educ*. 1985; 49(6):398-406.
- Saleh NK, Saleh HA. Olive oil effectively mitigates ovariectomy-induced osteoporosis in rats. *BMC Complement Altern Med*. 2011; 11:10.
- Sarnat BG. Developmental facial abnormalitiew and the temporomandibular joint. *JADA* 1969; 79:108.

- Sasaki T, Kim TW, Debari K, Nagamine H. The replacement processes of growth plate cartilage to bone in endochondral ossification of mandibular condyle. *Kaibou-shi* 1996; 71:106–114.
- Scapino RP, Obrez A, Greising D. Organization and function of the collagen fiber system in the human temporomandibular joint disc and its attachments. *Cells Tissues Organs* 2006; 182(3-4):201-25.
- Seedor JG, Quartuccio HA, Thompson DD. The biophosphonate aledronate (MK-217) inhibits bone loss due to ovariectomy in rats. *J Bone Miner Res* 1991; 6:339-346.
- Setchell KD, Lydeking-Olsen E. Dietary phytoestrogens and their effect on bone: evidence from in vitro and in vivo, human observational, and dietary intervention studies. *Am J Clin Nutr* 2003; 78:593–609.
- Shibata S, Fukada K, Suzuki S, Yamashita Y. Immunohistochemistry of collagen types II and X, and enzyme-histochemistry of alkaline phosphatase in the developing condylar cartilage of the fetal mouse mandible. *J Anat.* 1997; 191(4):561-70.
- Shimahara M, Ono K, Hashiguchi N, Yoshida Y, Kono K, Dote T. An experimental study on mandibular movement and osteoporosis. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1991; 74:287-297.
- Shira RB. Estrogen receptors in the temporomandibular joint of the baboon(*papio cynocephalus*). *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1986; 61:307-314.
- Sicher H. Influence of the growth of the facial skeleton on the eruption of the teeth. *Orthod Fr.* 1964; 35:52-7.
- Silbermann M, Frommer J. Further evidence for the vitality of chondrocytes in the mandibular condyle as revealed by S-Sulfate autoradiography. *Anat Rec* 1973; 174:503-512.
- Silbermann M, Frommer J. The nature of endochondral ossification in the mandibular condyle of the mouse. *Anat Rec* 1972β; 172:659-668.
- Silbermann M, Frommer J. Ultrastructure of developing cartilage in the mandibular condyle of the mouse. *Acta Anat* 1974; 90:330-346.
- Silbermann M, von der Mark K. An immunohistochemical study of the distribution of matrical proteins in the mandibular condyle of neonatal mice. I. Collagens. *J Anat* 1990; 170:11–22.
- Silbermann M, Reddi AH, Hand AR, Leapman RD, Von der Mark K, Franzen A. Further characterisation of the extracellular matrix in the mandibular condyle in neonatal mice. *J Anat.* 1987; 151:169-88.

- Simpson ER, Clyne C, Rubin G, Boon WC, Robertson K, Britt K, et al. Aromatase—a brief overview. *Annu Rev Physiol* 2002; 64:93–127.
- Slootweg P, Muller H. Condylar hyperplasia. A clinicopathological analysis of 22 cases. *J Maxillofac Surg* 1986; 14:209-14.
- Smith EP, Boyd J, Frank GR et al. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene of a man. *N Engl J Med* 1994; 331:1056-1061.
- Spector TD, Nandra D, Hart DJ, Doyle DV. Is hormone replacement therapy protective for hand and knee osteoarthritis in women? The Chingford Study. *Ann Rheum Dis* 1997; 56:432–4.
- Steiniche T, Hasling C, Charles P, et al. A randomized study on the effects of estrogen/gestagen or high dose oral calcium on trabecular bone remodeling in postmenopausal osteoporosis. *Bone* 1989; 10:313.
- Stevenson JC. Hormone replacement therapy: review, update, and remaining questions after the Women’s Health Initiative Study. *Curr Osteoporos Rep* 2004; 2: 12–6.
- Tagliaferri C, Salles J, Landrier JF, Giraudet C, Patrac V, Lebecque P, Davicco MJ, Chanet A, Pouyet C, Dhaussy A, Huertas A, Boirie Y, Wittrant Y, Coxam V, Walrand S. Increased body fat mass and tissue lipotoxicity associated with ovariectomy or high-fat diet differentially affects bone and skeletal muscle metabolism in rats. *Eur J Nutr*. 2014 Nov 5
- Talwar RM, Wong BS, Svoboda K, Harper RP. Effects of estrogen on chondrocyte proliferation and collagen synthesis in skeletally mature articular cartilage. *J Oral Maxillofac Surg*. 2006; 64(4):600–9.
- Tanaka M, Ejiri S, Kohno S, Ozawa H. The effect of aging and ovariectomy on mandibular condyle in rats. *J Prosthet Dent*. 1998; 79(6):685-90.
- Tanaka M, Ejiri S, Nakajima M, Kohno S, Ozawa H. Changes of cancellous bone mass in rat mandibular condyle following ovariectomy. *Bone*. 1999; 25(3):339-47.
- Tanaka M, Ejiri S, Kohno S, Ozawa H. Region-specific bone mass changes in rat mandibular condyle following ovariectomy. *J Dent Res*. 2000; 79(11):1907-13.
- Teramoto M, Keneko S, Shibata S, Yanagishita M, Soma K. Effect of compressive forces on extracellular matrix in rat mandibular condylar cartilage. *J Bone Miner Metab* 2003; 21:276–286.

- Thilander B, Carlsson GE, Ingervall B. Postnatal development of the human temporomandibular joint. I. A histological study. *Acta Odont Scand* 1976; 34:117-126.
- Trevisan AR, Scapino PR. Secondary cartilages in growth and development of the symphysis menti in the hamster. *Acta Anat* 1976; 94:40-58.
- Ushiyama T, Ueyama H, Inoue K, Ohkubo I, Hukuda S. Expression of genes for estrogen receptors alpha and beta in human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartil* 1999; 7:560–566.
- Victor V, Joseph Constantino, Lawrence Wickerman et al. Effects of Tamoxifen vs. Raloxifene on the Risk of Developing Invasive Breast Cancer and Other Disease Outcomes. *The Journal of the American Medical Association* 2006; 295 (23): 2727–2741.
- von Wowern N. General and oral aspects of osteoporosis: a review. *Clin Oral Investig* 2001; 5: 71–82.
- Wadhwa S, Kapila S. TMJ disorders: future innovations in diagnostics and therapeutics. *J Dent Educ*. 2008; 72(8):930-47
- Wang YH, Liu Y, Maye P, Rowe DW. Examination of mineralized nodule formation in living osteoblastic cultures using fluorescent dyes. *Biotechnol Prog*. 2006; 22(6):1697–701.
- Warren MP, Fried JL. Temporomandibular disorders and hormones in women. *Cells Tissues Organs*. 2001; 169(3):187-92.
- Weiss A, Livne E, Silbermann M. Growth and differentiation of murine cartilage cells in vitro following a short-term exposure to triamcinolone acetonide. *Cell Tissue Res* 1990; 260:513–520.
- Westerlind KC, Wronski TJ, Ritman EL, Luo ZP, An KN, Bell NH, Turner RT. Estrogen regulates the rate of bone turnover but bone balance in ovariectomized rats is modulated by prevailing mechanism strain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:4199-4204.
- White R, Parker MG. Molecular mechanisms of steroid hormone action. *Endocr Relat Cancer* 1998; 5: 1-14.
- Wronski TJ, Lowry PL, Walsh CC, Ignaszewski LA. Skeletal alterations in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 1985; 37:324-328.
- Wronski TJ, Walsh CC, Ignaszewski LA. Histologic evidence for osteopenia and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Bone* 1986; 7:119-124.

- Wu CH, Motohashi T, Abdel-Rahman HA, Flickinger GL, Mikhail G. Free and protein-bound plasma estradiol-17 β during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1976; 43:436.
- Wu J, Oka J, Higuchi M, Tabata I, Toda T, Fujioka M, et al. Cooperative effects of isoflavones and exercise on bone and lipid metabolism in postmenopausal Japanese women: a randomized placebo-controlled trial. *Metabolism* 2006; 55: 423–33.
- Yamada K, Nozawa-Inoue K, Kawano Y, Kohno S, Amizuka N, Iwanaga T, et al. Expression of estrogen receptor alpha (ER α) in the rat temporomandibular joint. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2003; 274: 934–41.
- Yamada M, Ito M, Hayashi K, Sato H, Nakamura T. Mandibular condyle bone mineral density measurement by quantitative computed tomography: a gender-related difference in correlation to spinal bone mineral density. *Bone*. 1997; 21(5):441-5.
- Yamashiro T, Takano-Yamamoto T. Differential responses of mandibular condyle and femur to oestrogen deficiency in young rats. *Arch Oral Biol* 1998; 43: 191–5.
- Yang L, Wang H, Wang M, Ohta Y, Suwa F. Development of collagen fibers and vasculature of the fetal TMJ. *Okajimas Folia Anat Jpn* 1992; 69(4):145-55.
- Yasuoka T, Nakashima M, Okuda T, Tatematsu N. Effect of estrogen replacement on temporomandibular joint remodeling in ovariectomized rats. *J Oral Maxillofac Surg* 2000; 58: 189–96.
- Yildiz MF, Kumru S, Godekmerdan A, Kutlu S. Effects of raloxifene, hormone therapy, and soy isoflavone on serum high-sensitive C-reactive protein in postmenopausal women. *Int J Gynaecol Obstet*. 2005; 90(2):128-33.
- Yu SB, Wang MQ, Zhao W, Cao HT, Liu YL. The effects of age and sex on the expression of aromatase in the rat temporomandibular joint. *J Orofac Pain* 2006; 20: 156–65.
- Yu SB, Wang MQ, Li YQ, Lv X, Jiang Y, Dong GY, et al. The effects of age and sex on the expression of oestrogen and its receptors in rat mandibular condylar cartilages. *Arch Oral Biol* 2009; 54: 479–85
- Yu SB, Xing XH, Dong GY, Weng XL, Wang MQ. Excess genistein suppresses the synthesis of extracellular matrix in female rat mandibular condylar cartilage. *Acta Pharmacol Sin*. 2012; 33(7):918-23.
- Yun KI, Chae CH, Lee CW. Effect of estrogen on the expression of cytokines of the temporomandibular joint cartilage cells of the mouse. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008; 66(5):882-7.

Zhang Y, McAlindon TE, Hannan MT, Chaisson CE, Klein R, Wilson PW, et al. Estrogen replacement therapy and worsening of radiographic knee osteoarthritis: the Framingham Study. *Arthritis Rheum* 1998; 41:1867–73.