

**ΔΙΑΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ – ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ
ΣΠΟΥΔΩΝ «ΙΑΤΡΙΚΗ ΦΥΣΙΚΗ - ΑΚΤΙΝΟΦΥΣΙΚΗ»**

Τμήμα Ιατρικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Τμήμα Φυσικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Τμήμα Ιατρικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης

Τμήμα Ιατρικής του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης

Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης

**Μελέτη της επίδρασης της χημικής σταθεροποίησης και ψύξης στην
ποιότητα του οστικού ιστού με φασματοσκοπία Raman**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΣΠΑΝΟΥ ΖΩΗ

Επιβλέπων: Κουρκουμέλης Νικόλαος, Αναπλ. Καθ. Ιατρικής Φυσικής - Βιοφυσικής,
Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων



Πανεπιστήμιο
Ιωαννίνων

ΙΩΑΝΝΙΝΑ

2020

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Κουρκουμέλης Νικόλαος, Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Φυσικής - Βιοφυσικής,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Εμφιετζόγλου Δημήτρης, Καθηγητής Ιατρικής Φυσικής, Τμήμα Ιατρικής, Σχολή
Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Χατζηκακού Σωτήρης, Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Εργαστήριο Ανόργανης
Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Μονάχα η πραγματικότητα μπορεί να μας διδάξει

πως την πραγματικότητα να αλλάξουμε...

Μπέρλοντ Μπρέχτ, «Η απόφαση» , 1930

Περιεχόμενα

Κατάλογος Εικόνων	6
Κατάλογος Σχημάτων	7
Κατάλογος Πινάκων	9
Ευχαριστίες.....	11
Περίληψη.....	12
Abstract	13
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ (Α)	14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	14
ΟΣΤΑ	14
Εισαγωγή	14
1.1. Δομικά συστατικά οστού.....	14
1.1.1. Θεμέλια εξωκυττάρια ουσία	16
Οργανική φάση οστού	16
1.1.2. Ανόργανη φάση οστού	22
1.2. Ιεραρχική δομή οστού.....	28
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	33
Φασματοσκοπία Raman.....	33
2.1. Εισαγωγή στη Φασματοσκοπία Raman	33
2.2. Θεωρία σκέδασης Raman	33
2.3. Κλασσική περιγραφή του φαινομένου Raman	42
2.4. Κβαντομηχανική περιγραφή του φαινομένου Raman	45
2.5. Πλεονεκτήματα και περιορισμοί του φαινομένου	47
2.6. Πειραματική διάταξη- Οργανολογία.....	48
2.6.1. Πηγές Laser.....	49
Κεφάλαιο 3	50
Φασματοσκοπία Raman και ποιότητα οστών	50
3.1. Φάσμα Raman οστών.....	51
3.1.1. Περιοχή Προλινών – Υδροξυπρολινών.....	53
3.1.2. Περιοχή φωσφορικών βιοαπατίτη.....	53
3.1.3. Περιοχή ανθρακικών βιοαπατίτη.....	54
3.1.4. Περιοχή Αμιδίου Ι.....	55
3.2. Παράμετροι ποιότητας οστών	58

Κεφάλαιο 4	61
Συντήρηση βιολογικών δειγμάτων	61
4.1. Σταθεροποίηση-Fixation	61
4.1.1. Σταθεροποιητικά – Fixatives	63
4.2. Κρυοσυντήρηση δειγμάτων – Snap Freezing.....	67
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - ΜΕΡΟΣ (Α)	68
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ (Β)	76
Κεφάλαιο 5	76
5.1. Συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων	76
5.1.1. Συλλογή δειγμάτων	76
5.1.2. Προετοιμασία διαλυμάτων	77
5.1.3. Κατάταξη δειγμάτων σε ομάδες	78
5.2. Συλλογή φασμάτων Raman.....	84
5.3. Επεξεργασία φασμάτων.....	85
5.3.1. Κώδικας επεξεργασίας φασμάτων.....	85
5.3.2. Λογισμικό αποσυνέλιξης κορυφών.....	89
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	93
Κεφάλαιο 6	93
6.1. Ανάλυση δείγματος ελέγχου (control).....	93
6.1.1. Περιοχή φωσφορικών βιοαπατίτη (900-1000 <i>cm</i> – 1)	95
6.1.2. Περιοχή ανθρακικών (1020 – 1120 <i>cm</i> – 1)	96
6.1.3. Περιοχή Αμιδίου Ι (1600 – 1700 <i>cm</i> – 1)	97
6.2. Συγκριτική παρατήρηση φασμάτων	98
6.2.1. Φάσματα αποθήκευσης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος	98
6.2.2. Φάσματα σταθεροποίησης σε διάλυμα φορμαλίνης	103
6.2.3. Φάσματα σταθεροποίησης σε διάλυμα φορμαλίνης και χρήση PBS.....	109
6.2.4. Φάσματα σταθεροποίησης σε διάλυμα φορμαλδεΰδης	111
6.2.5. Φάσματα σταθεροποίησης σε διάλυμα φορμαλδεΰδης και χρήση PBS..	116
6.2.6. Φάσματα αποθήκευσης σε φυσιολογικό ορό	118
6.2.7. Φάσματα σταθεροποίησης σε διάλυμα 100 % αιθανόλης.....	123
6.2.8. Φάσματα ψύξης – απόψυξης.....	128
6.2.9. Φάσματα ψύξης – απόψυξης και χρήση PBS.....	130
6.2.10. Φάσματα πολλαπλών κύκλων ψύξης – απόψυξης.....	132
6.2.11. Φάσματα στιγμιαίας ψύξης και συμπληρωματικής κατάψυξης	134

6.2.12. Φάσματα στιγμιαίας ψύξης και χρήσης PBS.....	136
6.3. Ποσοτική ανάλυση οστού	138
6.3.1. Υπολογισμός ποσοτικών παραμέτρων φασμάτων Raman	138
6.3.1.1. Υπολογισμός αναλογίας ανόργανων προς οργανικών συστατικών (MMR) 140	
6.3.1.2. Υπολογισμός αναλογίας ανθρακικών υποκαταστατών προς φωσφορικών ιόντων (CPR)	150
6.3.1.3. Υπολογισμός αναλογίας ανθρακικών υποκαταστατών προς τα οργανικά συστατικά (Carbonate to Amide I Ratio).....	158
ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	168
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ – ΜΕΡΟΣ (B)	175

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1 : Η δομή της τριπλής έλικας του κολλαγόνου και οι α-πολυπεπτιδικές αλυσίδες. .	18
Εικόνα 2: Δομή κρυστάλλου υδροξυαπατίτη [24].....	23
Εικόνα 3: Οι βασικές υποκαταστάσεις στο κρυσταλλικό πλέγμα του βιοαπατίτη [28].	25
Εικόνα 4: Κρυσταλλίτης απατίτη με την ένυδρη στοιβάδα που τον περιβάλλει [34].	27
Εικόνα 5: Απεικόνιση κρυστάλλων βιοαπατίτη με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) [35].	28
Εικόνα 6: Απεικόνιση συμπαγούς και σπογγώδους οστού.	29
Εικόνα 7: Ιεραρχική δομή συμπαγούς οστού [39].	30
Εικόνα 8: Μορφολογική απεικόνιση οστού [42].	32
Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση της σκέδασης του φωτός μετά την έκθεση ενός δείγματος σε μονοχρωματικό φως <i>laser</i> . Όταν τα φωτόνια αλληλεπιδρούν με τους χημικούς δεσμούς μέσα στο βιολογικό δείγμα, ηλεκτρόνια εξέρχονται σε κάθετα ενεργειακά επίπεδα. Αυτά τα βιολογικά μόρια επιστρέφουν στα αρχικά τους ενεργειακά επίπεδα με την εκπομπή φωτονίων γνωστή ως ελαστική σκέδαση ή αλλιώς σκέδαση Rayleigh ή μπορεί να υποστούν μια ενεργειακή αλλαγή και να επιστρέψουν σε χαμηλότερα (Stokes) ή υψηλότερα (Anti- Stokes) ενεργειακά επίπεδα. Η Stokes Raman σκέδαση είναι πιο έντονη από την Anti-Stokes σκέδαση [47].	35
Εικόνα 10: Συνοπτική απεικόνιση των διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα κατά το Φαινόμενο Raman και η παραγωγή του φθορισμού.	37
Εικόνα 11 : Φάσμα Raman στο οποίο διακρίνονται οι περιοχές Stokes, Rayleigh, Anti-Stokes.	39
Εικόνα 12: Δονήσεις τάσης και κάμψης.	41
Εικόνα 13: Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διάταξης καταγραφής φασμάτων Raman.	49
Εικόνα 14: Βασικές κορυφές ανόργανων και οργανικών συστατικών οστικού φάσματος. [67]	52

Εικόνα 15: Δονήσεις Αμιδίου I και III της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών[80].	56
Εικόνα 16: Οστικά δείγματα πτηνών.	77
Εικόνα 17: Φασματοσκοπική διάταξη, <i>i - Raman plus</i> .	84

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 1: Αντίδραση ενυδάτωσης φορμαλδεΐδης, με μοριακό τύπο: $CH_2(OH)_2$	65
Σχήμα 2: Μη επεξεργασμένο φάσμα οστού	88
Σχήμα 3: Επεξεργασία οστικού φάσματος.	89
Σχήμα 4: Σύγκριση Γκαουσιανής και Λορεντζιανής κατανομής.	91
Σχήμα 5: Αντιπροσωπευτικό οστικό φάσμα δείγματος ελέγχου.	94
Σχήμα 6: Ανάλυση επιμέρους κορυφών στη περιοχή των φωσφορικών για το φάσμα αναφοράς.	95
Σχήμα 7: Ανάλυση επιμέρους κορυφών στη περιοχή των ανθρακικών για το φάσμα αναφοράς.	97
Σχήμα 8: Προσαρμογή καμπύλης στη περιοχή του Αμιδίου I για το φάσμα αναφοράς.	98
Σχήμα 9: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για διαφορετικά χρονικά διαστήματα.	99
Σχήμα 10: Εντοπισμός κορυφής στα 754 cm^{-1} φασμάτων οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.	100
Σχήμα 11: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για τη περιοχή των ανθρακικών.	101
Σχήμα 12: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για τη περιοχή του Αμιδίου III.	102
Σχήμα 13: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για τη περιοχή του Αμιδίου I.	103
Σχήμα 14: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε διάλυμα φορμαλίνης για διαφορετικά χρονικά διαστήματα.	104
Σχήμα 15: Εντοπισμός κορυφής στα 754 cm^{-1} φασμάτων οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε διάλυμα φορμαλίνης.	105
Σχήμα 16: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε διάλυμα φορμαλίνης για τη περιοχή των ανθρακικών.	106
Σχήμα 17: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε διάλυμα φορμαλίνης για τη περιοχή του Αμιδίου I.	107
Σχήμα 18: α) Σύγκριση φάσματος δείγματος ελέγχου με φάσμα δείγματος σταθεροποιημένο σε διάλυμα φορμαλίνης. β) Φάσμα διαλύματος 10% ρυθμιστικά ουδέτερης φορμαλίνης.	108
Σχήμα 19: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε διάλυμα φορμαλίνης για διαφορετικά χρονικά διαστήματα και κατόπιν βύθιση σε PBS. ..	109
Σχήμα 20: Α) Σύγκριση φάσματος δείγματος σταθεροποιημένο σε διάλυμα φορμαλίνης και χρήση PBS με φάσμα δείγματος σταθεροποιημένο σε διάλυμα φορμαλίνης Β) Σύγκριση φάσματος δείγματος ελέγχου με φάσμα δείγματος σταθεροποιημένο σε διάλυμα φορμαλίνης και χρήση PBS. Γ) Φάσμα διαλύματος PBS.	111

Σχήμα 21: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε διάλυμα φορμαλδεΰδης για διαφορετικά χρονικά διαστήματα.	112
Σχήμα 22: Εντοπισμός κορυφής στα 754 cm – 1 φασμάτων οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε διάλυμα φορμαλδεΰδης.	112
Σχήμα 23: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε διάλυμα φορμαλδεΰδης για τη περιοχή των ανθρακικών.	113
Σχήμα 24: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman φασμάτων οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε διάλυμα φορμαλδεΰδης για τη περιοχή του Αμιδίου I.	114
Σχήμα 25: α) Σύγκριση φάσματος δείγματος ελέγχου με φάσμα δείγματος σταθεροποιημένο σε διάλυμα φορμαλδεΰδης. β) Φάσμα διαλύματος φορμαλδεΰδης.	115
Σχήμα 26: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε διάλυμα φορμαλδεΰδης για διαφορετικά χρονικά διαστήματα και κατόπιν βύθιση σε PBS.	116
Σχήμα 27: Α) Σύγκριση φάσματος δείγματος σταθεροποιημένο σε διάλυμα φορμαλδεΰδης και χρήση PBS με φάσμα δείγματος σταθεροποιημένο σε διάλυμα φορμαλδεΰδης Β) Σύγκριση φάσματος δείγματος ελέγχου με φάσμα δείγματος σταθεροποιημένο σε διάλυμα φορμαλδεΰδης και χρήση PBS.	118
Σχήμα 28: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε φυσιολογικό ορό για διαφορετικά χρονικά διαστήματα.	119
Σχήμα 29: Εντοπισμός κορυφής στα 754 cm – 1 φασμάτων οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε φυσιολογικό ορό.	119
Σχήμα 30: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε φυσιολογικό ορό για τη περιοχή των ανθρακικών.	120
Σχήμα 31: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman για οστικά δείγματα αποθηκευμένα σε φυσιολογικό ορό για τη περιοχή του Αμιδίου I.	121
Σχήμα 32: α) Σύγκριση φάσματος δείγματος ελέγχου με φάσμα δείγματος σταθεροποιημένο σε φυσιολογικό ορό. β) Φάσμα φυσιολογικού ορού.	122
Σχήμα 33: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε διάλυμα αιθανόλης για διαφορετικά χρονικά διαστήματα.	123
Σχήμα 34: Εντοπισμός κορυφής στα 754 cm – 1 φασμάτων οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε διάλυμα αιθανόλης.	124
Σχήμα 35: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε διάλυμα αιθανόλης για τη περιοχή των ανθρακικών.	125
Σχήμα 36: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε διάλυμα αιθανόλης για τη περιοχή του Αμιδίου I.	126
Σχήμα 37: α) Σύγκριση φάσματος δείγματος ελέγχου με φάσμα δείγματος σταθεροποιημένο σε διάλυμα αιθανόλης. β) Φάσμα διαλύματος αιθανόλης.	127
Σχήμα 38: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε συνθήκες κατάψυξης για διαφορετικά χρονικά διαστήματα.	128
Σχήμα 39: Εντοπισμός κορυφής στα 754 cm – 1 φασμάτων οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε συνθήκες κατάψυξης.	129
Σχήμα 40: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε συνθήκες κατάψυξης για τη περιοχή των ανθρακικών.	130
Σχήμα 41: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε συνθήκες κατάψυξης και κατόπιν χρήσης PBS.	131

Σχήμα 42: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων που έχουν υποστεί πολλαπλούς κύκλους ψύξης – απόψυξης για διαφορετικά χρονικά διαστήματα.....	132
Σχήμα 43: Σύγκριση φάσματος δείγματος ελέγχου με φάσμα δείγματος που έχει υποστεί πολλαπλούς κύκλους ψύξης – απόψυξης.	133
Σχήμα 44: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων που έχουν υποστεί πολλαπλούς κύκλους ψύξης - απόψυξης για τη περιοχή των ανθρακικών.....	134
Σχήμα 45: Σύγκριση φάσματος δείγματος ελέγχου με φάσμα δείγματος που έχει υποστεί στιγμιαία ψύξη και συμπληρωματική κατάψυξη.	135
Σχήμα 46: Σύγκριση φάσματος δείγματος ελέγχου με φάσμα δείγματος που έχει υποστεί στιγμιαία ψύξη και κατόπιν βύθιση σε PBS.	136
Σχήμα 47: Εντοπισμός κορυφής στα 754 cm – 1 φασμάτων οστικών δειγμάτων που έχουν υποστεί στιγμιαία ψύξη και κατόπιν βύθιση σε PBS.	137
Σχήμα 48: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων που έχουν υποστεί στιγμιαία ψύξη και κατόπιν βύθιση σε PBS για τη περιοχή των ανθρακικών.....	138

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Βασικές κορυφές ανόργανων και οργανικών συστατικών οστικού φάσματος....	57
Πίνακας 3: Ομάδες δειγμάτων και ο τρόπος επεξεργασίας.	83
Πίνακας 4: Τιμές MMR για τα οστικά δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.....	141
Πίνακας 5: Τιμές MMR για τα οστικά δείγματα που σταθεροποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλίνης και οι αντίστοιχες τιμές μετά τη χρήση PBS.....	143
Πίνακας 6: Τιμές MMR για τα οστικά δείγματα που σταθεροποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλδεΰδης και οι αντίστοιχες τιμές μετά τη χρήση PBS.	144
Πίνακας 7: Τιμές MMR για τα οστικά δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε φυσιολογικό ορό.	145
Πίνακας 8: Τιμές MMR για τα οστικά δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε διάλυμα αιθανόλης.	146
Πίνακας 9: Τιμές MMR για τα οστικά δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε συνθήκες κατάψυξης.....	147
Πίνακας 10: Τιμές MMR για τα οστικά δείγματα που έχουν υποστεί πολλαπλούς κύκλους ψύξης – απόψυξης.	148
Πίνακας 11: Τιμές MMR για τα οστικά δείγματα που έχουν υποστεί στιγμιαία ψύξη και συμπληρωματική κατάψυξη ή έχουν βυθιστεί σε PBS.	149
Πίνακας 12: Τιμές CPR για τα οστικά δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.....	150
Πίνακας 13: Τιμές CPR για τα οστικά δείγματα που σταθεροποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλίνης και οι αντίστοιχες τιμές μετά τη χρήση PBS.....	151
Πίνακας 14: Τιμές CPR για τα οστικά δείγματα που σταθεροποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλδεΰδης και οι αντίστοιχες τιμές μετά τη χρήση PBS.	152
Πίνακας 15: Τιμές CPR για τα οστικά δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε φυσιολογικό ορό.	153

Πίνακας 16: Τιμές CPR για τα οστικά δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε διάλυμα αιθανόλης.	154
Πίνακας 17: Τιμές CPR για τα οστικά δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε συνθήκες κατάψυξης.	155
Πίνακας 18: Τιμές CPR για τα οστικά δείγματα που έχουν υποστεί πολλαπλούς κύκλους ψύξης – απόψυξης.	156
Πίνακας 19: Τιμές CPR για τα οστικά δείγματα που έχουν υποστεί στιγμιαία ψύξη και συμπληρωματική κατάψυξη ή έχουν βυθιστεί σε PBS	157
Πίνακας 20: Τιμές λόγου ανθρακικών υποκαταστατών προς τα οργανικά συστατικά για τα οστικά δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.	158
Πίνακας 21: Τιμές λόγου ανθρακικών υποκαταστατών προς τα οργανικά συστατικά για τα οστικά δείγματα που σταθεροποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλίνης και οι αντίστοιχες τιμές μετά τη χρήση PBS.	159
Πίνακας 22: Τιμές λόγου ανθρακικών υποκαταστατών προς τα οργανικά συστατικά για τα οστικά δείγματα που σταθεροποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλδεΐδης και οι αντίστοιχες τιμές μετά τη χρήση PBS.	160
Πίνακας 23: Τιμές λόγου ανθρακικών υποκαταστατών προς τα οργανικά συστατικά για τα οστικά δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε φυσιολογικό ορό.	161
Πίνακας 24: Τιμές λόγου ανθρακικών υποκαταστατών προς τα οργανικά συστατικά για τα οστικά δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε διάλυμα αιθανόλης.	162
Πίνακας 25: Τιμές λόγου ανθρακικών υποκαταστατών προς τα οργανικά συστατικά για τα οστικά δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε συνθήκες κατάψυξης.	163
Πίνακας 26: Τιμές λόγου ανθρακικών υποκαταστατών προς τα οργανικά συστατικά για τα οστικά δείγματα που έχουν υποστεί πολλαπλούς κύκλους ψύξης – απόψυξης.	164
Πίνακας 27: Τιμές λόγου ανθρακικών υποκαταστατών προς τα οργανικά συστατικά για τα οστικά δείγματα που έχουν υποστεί στιγμιαία ψύξη και συμπληρωματική κατάψυξη ή έχουν βυθιστεί σε PBS.	165
Πίνακας 28: Εντοπισμός στατιστικά σημαντικών διαφορών στις τιμές των ποσοτικών παραμέτρων των διαφορετικών ομάδων μελέτης.	166

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Ιατρικής Φυσικής του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κατά το ακαδημαϊκό έτος 2019-2020, υπό την επίβλεψη του κ. Νικόλαου Κουρκουμέλη, Αναπληρωτή Καθηγητή του τμήματος.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κουρκουμέλη για το χρόνο και τη στήριξη που μου παρείχε όλο αυτό το διάστημα για την ολοκλήρωση αυτής της μελέτης. Εκτιμώ βαθύτατα τόσο τη βοήθεια που μου προσέφερε πρόθυμα όποτε και αν τη χρειάστηκα, αλλά ακόμα περισσότερο την εμπιστοσύνη που μου έχει δείξει σε όλη τη διάρκεια της ακαδημαϊκής μου πορείας, σε προπτυχιακό και μεταπτυχιακό επίπεδο. Οι συμβουλές του και η καθοδήγηση του έχουν αποτελέσει για μένα σημαντικά εφόδια για την εξέλιξη μου.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο Διδάκτορα του τμήματος, Ελευθέριο Παύλου για την αμέριστη βοήθεια που μου προσέφερε σε όλη τη διάρκεια της προσπάθειας ολοκλήρωσης της έρευνας μου, τόσο σε πρακτικό όσο και θεωρητικό επίπεδο. Η συμβολή του στο αποτέλεσμα είναι αδιαμφισβήτητη.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Μεταδιδακτορική ερευνήτρια, Μάρθα Βαρδάκη, για τις χρήσιμες πληροφορίες και την καθοδήγηση που μου παρείχε πρόθυμα, όποτε και αν το ζήτησα. Θα ήταν παράλειψη μου να μην ευχαριστήσω και όλους τους συναδέλφους του εργαστηρίου Ιατρικής Φυσικής, οι οποίοι έκαναν το χώρο του εργαστηρίου πιο φιλικό κατά τις αμέτρητες ώρες εργασίας μας.

Τέλος, ένα ευχαριστώ το οποίο γνωρίζω ότι είναι λίγο, είναι εκείνο που οφείλω στην οικογένεια μου, οι οποίοι στέκονται δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια και παρά τις δυσκολίες στηρίζουν αδιάκοπα την εκπλήρωση των ονείρων μου.

Σπανού Ζωή

Περίληψη

Η φασματοσκοπία Raman αποτελεί μια οπτική τεχνική, κατάλληλη για το χημικό χαρακτηρισμό της σύνθεσης ετερογενών δειγμάτων, όπως είναι για παράδειγμα οι οστικοί ιστοί. Μέσω της ταυτοποίησης συγκεκριμένων μοριακών τρόπων δόνησης των χημικών συστατικών των δειγμάτων που εξετάζονται επιτρέπει τη ταυτόχρονη μελέτη της οργανικής και ανόργανης φάσης της σύνθεσης των οστών. Η φασματοσκοπία Raman παρέχει τη δυνατότητα της μη επεμβατικής μέτρησης βιολογικών δειγμάτων *in vivo* ή *ex vivo*. Φρέσκοι ενυδατωμένοι ιστοί μπορούν επίσης να εξεταστούν μαζί με ιστούς που έχουν σταθεροποιηθεί με σταθεροποιητικά ή έχουν βυθιστεί σε κάποιο υλικό μέσο (*embedding*). Έτσι, με την μελέτη φυσικοχημικών παραμέτρων μπορούν να ανιχνευθούν λεπτές αλλαγές στη μοριακή δομή, παρέχοντας χρήσιμες πληροφορίες για την ποιότητα των οστών.

Συνήθως, απαιτείται αποθήκευση και συντήρηση για όλα τα βιολογικά δείγματα μέχρι τη φασματοσκοπική ή άλλη ανάλυση τους. Η ανάγκη μελέτης των επιπτώσεων που επιφέρουν αυτές οι διαδικασίες στη δομή και την ποιότητα των οστών οδήγησαν στην ανάπτυξη διαφορετικών πρωτοκόλλων αποθήκευσης οστικών δειγμάτων. Για το σκοπό αυτό, συγκεντρώθηκαν οστικά δείγματα πτηνών τα οποία σταθεροποιήθηκαν με τη χρήση σταθεροποιητικών όπως η φορμαλδεΐδη, η 10% ρυθμιστικά ουδέτερη φορμαλίνη, ο φυσιολογικός ορός και η αιθανόλη. Επιπλέον, επιπρόσθετα δείγματα (στιγμιαία-) ψύχθηκαν ή υποβλήθηκαν διαδοχικούς κύκλους ψύξης - απόψυξης για διαφορετικά χρονικά διαστήματα.

Από την φασματοσκοπική ανάλυση και τη διερεύνηση των παραμέτρων ποιότητας των οστών συμπεραίνουμε ότι στις περισσότερες περιπτώσεις προκύπτουν τροποποιήσεις στη δομή των οστών και ψευδείς ενδείξεις στην φασματική εικόνα που σχετίζονται με τη σταθεροποίηση. Τα πρωτόκολλα σταθεροποίησης βρέθηκε ότι έχουν άμεσο αντίκτυπο στη δομή των πρωτεϊνών του κολλαγόνου. Αντίθετα, η ψύξη και απόψυξη των οστικών εντοπίστηκε ως η πιο αξιόπιστη μέθοδος συντήρησης.

Key words: Φασματοσκοπία Raman, οστά πτηνών, σταθεροποίηση, κρυοσυντήρηση, ποιότητα οστών, απατίτης.

Abstract

Raman spectroscopy is an optical technique, suitable for the chemical characterization of the composition of heterogeneous samples, such as bone tissues. Through the identification of molecule – specific vibrational modes of the sample's chemical components, Raman spectroscopy allows the simultaneous exploration of mineral and organic phase of bone composition. Raman spectroscopy provides the ability of a non – invasive measurement of biological samples in vivo or ex vivo. Fresh hydrated tissues can be also examined along with tissues that have been fixed with fixatives or have been immersed in embedding media. Thus, by studying of physicochemical parameters, subtle changes can be detected in molecular structure, providing useful information for the bone quality.

Typically, storage and preservation are required for all biological samples until the spectroscopic or other analysis. The need to study the effects of these procedures on bone structure and quality has led to the development of different protocols for storage. Here, chicken bones were collected and fixed by the use of fixatives such as formaldehyde, 10 % neutral buffered formalin, saline solution and ethanol. Furthermore, additional samples were (snap-) freezed or were subjected to successive freeze-thaw cycles for different intervals.

By the spectroscopic analysis and the investigation of bone quality parameters we conclude that in most cases there are changes in bone structure and spectral artifacts associated with the fixation. Fixation protocols found to have a direct impact on the structure of collagen proteins. Conversely, freeze- thawing of bone tissues was found as a reliable method for preservation.

Key words: Raman spectroscopy, chicken bones, fixation, cryopreservation, bone quality, apatite.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ (Α)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΟΣΤΑ

Εισαγωγή

Τα οστά είναι υπόλευκοι, σκληροί και ανθεκτικοί, με χαμηλή ελαστικότητα ιστοί, όπου συνδεδεμένα με τις αρθρώσεις, σχηματίζουν το σκελετό του σώματος, παρέχουν σημεία σύνδεσης για τα μαλακά μέρη του οργανισμού και αποτελούν σημείο πρόσδεσης των μυών και των τενόντων. Εκτός από το μηχανικό τους ρόλο για τη στήριξη των ιστών και των μυών και τη συμβολή τους στην υποστήριξη της κίνησης, ικανοποιούν προστατευτικές και μεταβολικές ανάγκες του οργανισμού. Η σκληρότητα και η αντοχή των οστών σε καταπονήσεις παρέχει προστασία σε ευπαθή όργανα (σπλάχνα και ζωτικά όργανα που βρίσκονται εντός ειδικών κοιλοτήτων), όπως είναι ο εγκέφαλος ή τα σπλάχνα θώρακα-πυέλου. Επομένως, πρόκειται για ένα αρκετά άκαμπτο και ανισοτροπικό υλικό, ζωτικής σημασίας για τον συνδετικό ιστό (οστέινος ή οστίτης ιστός) και εντοπίζεται σε όλα τα θηλαστικά και όχι μόνο.

Επιπλέον, ο οστέινος ιστός συντελεί στην ομοιοστατική λειτουργία του οργανισμού, καθώς αποτελεί σημαντική αποθήκη αλάτων ασβεστίου και φωσφόρου, που αξιοποιούνται για τις ανάγκες του κάθε οργανισμού και μεταφέρονται σε άλλα όργανα που τα χρειάζονται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση κατά την οποία η έλλειψη ασβεστίου και φωσφόρου από το πλάσμα του αίματος αντισταθμίζεται με την αποδόμηση οστού, όπου προσφέρει τα αντίστοιχα ιόντα. Ο μυελός των οστών που βρίσκεται στο διακενό ορισμένων οστών, διακρίνεται σε ερυθρό και κίτρινο και παράγει τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα οποία αποτελούν βασικό συστατικό του αίματος και συμβάλλει στην αιμοποιητική λειτουργία. Τέλος, κατά τη διάρκεια της ζωής τα οστά αναδομούνται και προσαρμόζονται σε καινούριες μηχανικές συνθήκες λειτουργίας [1,2].

1.1. Δομικά συστατικά οστού

Το οστό αποτελεί ένα εξαιρετικά σύνθετο υλικό που χαρακτηρίζεται από μία πολύπλοκη ιεραρχική δομή. Η περιεκτικότητα σε μικροστοιχεία του σκελετού είναι 99% ασβέστιο, 35% νάτριο και περίπου 60% μαγνήσιο. Ο οστίτης ιστός χαρακτηρίζεται από σκληρή εξωκυττάρια ουσία και αποτελείται από τρεις βασικές

φάσεις, οι οποίες είναι η ανόργανη, η οργανική και η υδατική. Η οργανική και η ανόργανη φάση δημιουργούν ένα σύμπλεγμα μέσω της ασβεστοποίησης της οργανικής φάσης. Το ανόργανο τμήμα κυριαρχεί καθώς αποτελεί περίπου το 60-70% της κατά βάρος περιεκτικότητας του οστού, ενώ η οργανική φάση αποτελεί το 20-30 % της μάζας του. Το υπόλοιπο ποσοστό αντιστοιχεί στην υδατική φάση και στο νερό που βρίσκεται στο οστό και συμβάλει σημαντικά στη συνολική αντοχή του [3].

Ο οστίτης ιστός αποτελείται από δύο κυρίως μέρη: α) το **κυτταρικό** και β) την **θεμέλια εξωκυττάρια ουσία** :

α) Η σύσταση του κυτταρικού μέρους περιλαμβάνει τέσσερις τύπους κυττάρων:

- Τα οστικά αρχέγονα κύτταρα
- Τους οστεοβλάστες
- Τα οστεοκύτταρα
- Τους οστεοκλάστες

Στα εξειδικευμένα κύτταρα του οστίτη ιστού ανήκουν και οι οστεοβλάστες επιφανείας. Συνοπτικά, οι οστεοβλάστες είναι υπεύθυνοι για την σύνθεση του οστού, τα οστεοκύτταρα για τη συντήρηση, ενώ η αποδόμηση είναι λειτουργία των οστεοκλαστών.

Οι οστεοβλάστες αποτελούν τα οστεοπαραγωγικά κύτταρα που παράγουν τη μεσοκυττάρια ουσία, η οποία μετά την οστεοποίηση της περικλείει τους οστεοβλάστες και τελικά σε αυτή τη φάση μετατρέπονται σε οστεοκύτταρα. Τα οστεοκύτταρα βρίσκονται στη μήτρα του οστού και δημιουργούν αποφυάδες που κυκλοφορούν μέσα στα οστικά σωληνάκια και με αυτό τον τρόπο επικοινωνούν μεταξύ τους. Τα κύτταρα αυτά συμμετέχουν ενεργά στο μεταβολισμό και την ομοιοστάση του ασβεστίου. Όσον αφορά τους οστεοκλάστες είναι πολυπύρηννα γιγάντια κύτταρα, με κατά μέσο όρο περίπου 2-60 πυρήνες, με εξειδίκευση στην απορρόφηση του οστίτη ιστού. Τα κύτταρα αυτά βρίσκονται σε θέσεις στις οποίες γίνεται αποδόμηση του οστίτη ιστού και ενεργοποιούνται ύστερα από τη δράση της παραθορμόνης. Η παραθορμόνη είναι μια ειδική ορμόνη η οποία ελέγχει τη συγκέντρωση του ασβεστίου στο πλάσμα του αίματος και η δράση της έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση ασβεστίου από τα οστά.

β) Όσον αφορά την θεμέλια εξωκυττάρια ουσία αποτελείται κυρίως από την οργανική εξωκυττάρια ουσία και τα ανόργανα άλατα. Σχετικά με το οργανικό μέρος αντιστοιχεί περίπου στο 30% της κατά βάρος περιεκτικότητας του οστού και περιλαμβάνει :

- Τα κύτταρα του οστίτη ιστού.
- Τα κολλαγόνα ινίδια
- Τη θεμέλια ουσία (πρωτεΐνες, όπως κυρίως οι πολυσακχαρίδες).

Τα κολλαγόνα ινίδια και η θεμέλια ουσία συνιστούν τη μεσοκυττάρια ουσία του οστίτη ιστού. Τα κολλαγόνα ινίδια παράγονται από τους οστεοβλάστες και η σύσταση τους διαφέρει από ινίδια άλλων ιστών και έτσι καθίσταται δυνατή η εναπόθεση αλάτων ασβεστίου σε αυτά. Ακόμα, η οργανική εξωκυττάρια ουσία, η οποία ονομάζεται οστεοειδές, κυριαρχείται από τη παρουσία της πρωτεΐνης κολλαγόνο (τύπου Ι), με ποσοστό περίπου 90%. Περιλαμβάνει, επιπλέον, εξωκυττάριο υγρό και πρωτεογλυκάνες, όπως οι γλυκοζαμινογλυκάνες, οι οποίες περιέχουν γλυκοπρωτεΐνες που μπορούν να δεσμεύουν μεγάλες ποσότητες ασβεστίου. Το υπόλοιπο τμήμα που εναπομένει καταλαμβάνεται από πλήθος άλλων πολύτιμων κολλαγονούχων πρωτεϊνών, οργανικών ενώσεων, κυττάρων και μυελού. Παρά το γεγονός ότι το οστό είναι άκαμπτο, οι ίνες κολλαγόνου του προσδίδουν μικρό βαθμό ελαστικότητας.

Το ανόργανο τμήμα του οστού αποτελείται από ένα φωσφορικό άλας, το οποίο προσομοιάζεται σε χημικό και δομικό επίπεδο με το γεωλογικό υδροξυαπατίτη $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, HAP] και για το λόγο αυτό συνήθως χαρακτηρίζεται ως βιοαπατίτης (BioApatite, BAP) ή βιολογικός απατίτης. Αποτελείται κυρίως από φωσφορικό ασβέστιο (80-90%) και βρίσκεται με τη μορφή υπερμικροσκοπικών κρυστάλλων του υδροξυαπατίτη, το ανθρακικό ασβέστιο (8-10%), το φθοριούχο και χλωριούχο ασβέστιο (0,5%), το φωσφορικό μαγνήσιο (1-2%) και τα αλκαλικά άλατα (2%). Τα συστατικά αυτά εμποτίζουν την θεμέλια ουσία, με τη μορφή κρυστάλλων υδροξυαπατίτη, και τα κολλαγόνα ινίδια. Τα άλατα του ασβεστίου προσδίδουν στο οστό μηχανική ισχύ.

1.1.1. Θεμέλια εξωκυττάρια ουσία

Όπως προαναφέρθηκε η θεμέλια εξωκυττάρια ουσία αποτελείται από την οργανική εξωκυττάρια ουσία και από τα ανόργανα άλατα, τα οποία αναλύονται παρακάτω.

Οργανική φάση οστού

Η οργανική φάση των οστών αποτελείται κυρίως από ινίδια κολλαγόνου Τύπου Ι με ποσοστό 98%, καθώς επίσης και από μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες, μυελό και κύτταρα (οστεοβλάστες, οστεοκλάστες, οστεοκύτταρα), που καταλαμβάνουν το υπόλοιπο 2%. Στο κολλαγόνο οφείλονται και οι περισσότερες μηχανικές και βιοχημικές ιδιότητες του οστού. Παρακάτω αναλύονται τα δομικά μέρη της οργανικής φάσης.

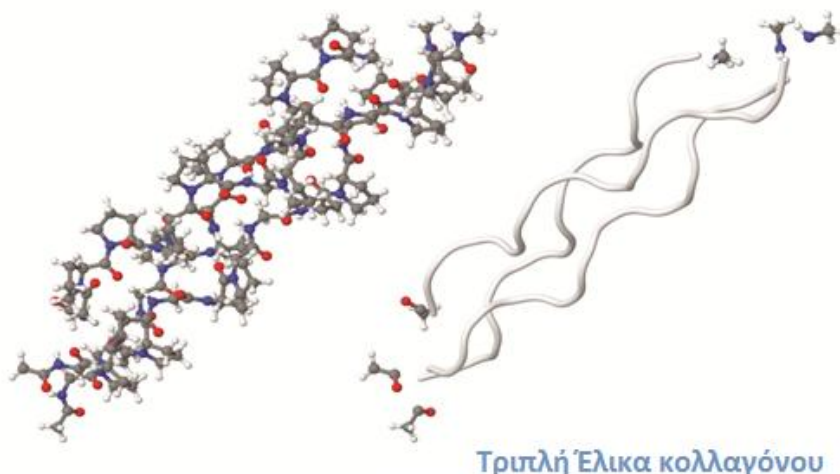
- **Κολλαγόνο**

Το κολλαγόνο συνιστά την πλειοψηφία των πρωτεϊνών των οργανισμών (περίπου 50% αυτών) και το μεγαλύτερο μέρος του εντοπίζεται στον οστέινο ιστό, καθώς επίσης ανιχνεύεται και στους τένοντες και στο δέρμα. Το κολλαγόνο είναι μια επιμήκης ομάδα ινωδών πρωτεϊνών, όπου προσδίδουν ελαστικότητα και εκτατική ισχύ στους συνδετικούς ιστούς, καθώς και αντοχή στον εκφυλισμό. Υπάρχουν περίπου 20 διαφορετικά γονίδια κολλαγόνου, τα οποία κωδικοποιούν διάφορες μορφές κολλαγόνου [3]. Η οικογένεια του κολλαγόνου περιλαμβάνει συνολικά 28 διαφορετικούς τύπους στον ανθρώπινο οργανισμό, οι οποίοι συνίσταται από 46 διαφορετικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες [4].

Οι τύποι κολλαγόνου χωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες κολλαγόνων : α) τα ινίδια κολλαγόνα (fibrillar), όπου την κατηγορία αυτή απαρτίζουν οι τύποι I, II, III, V, XI και β) τα μη ινίδια κολλαγόνα, στα οποία ανήκουν οι υπόλοιποι τύποι. Συγκεκριμένα, οι τύποι που συναντώνται πιο συχνά με ποσοστό 80-90% είναι το κολλαγόνο τύπου I,II,III, με το κολλαγόνο τύπου I να αποτελεί την πιο άφθονη πρωτεΐνη στο σώμα [5]. Η παρουσία διαφορετικών τύπων κολλαγόνου εξυπηρετεί εξειδικευμένες λειτουργίες σε διαφορετικούς ιστούς και οργανώνονται με διαφορετικό τρόπο, από τον οποίο προκύπτει ο διαχωρισμός στις κατηγορίες. Συνοπτικά, τα ινίδια κολλαγόνα είναι μόρια που παρουσιάζουν μορφή ράβδου με μακριές επαναλαμβανόμενες τριπλές έλικες και προσφέρουν αντοχή στους ιστούς, ενώ από την άλλη πλευρά τα μη ινίδια κολλαγόνα σχηματίζουν μια ετερογενή ομάδα υπερμοριακών δομών και δικτύων.

Η δομή του κολλαγόνου

Όλοι οι τύποι κολλαγόνου, παρά τις τροποποιήσεις που παρουσιάζουν στη δομή τους, παρουσιάζουν ένα κοινό χαρακτηριστικό ως προς τη σύνθεση τους, καθώς το τυπικό μόριο του κολλαγόνου παρουσιάζει μακριά, τρίκλωνη, άκαμπτη ελικοειδή μορφή. Η βασική δομική τους μονάδα αποτελείται από τρεις α-πολυπεπτιδικές αλυσίδες, οι οποίες περιελίσσονται η μία γύρω από την άλλη σχηματίζοντας μια σχοινοειδή, τριπλή, δεξιόστροφη έλικα.



Εικόνα 1 : Η δομή της τριπλής έλικας του κολλαγόνου και οι α-πολυπεπτιδικές αλυσίδες.

Από έρευνες οι οποίες έχουν πραγματοποιηθεί στο παρελθόν σχετικά με τη δομή του κολλαγόνου, διαπιστώθηκε αρχικά ότι πρόκειται για μία πρωτεΐνη με σχετικά μεγάλο μέγεθος, όπου το μήκος της φθάνει περίπου τα 300 nm και το πλάτος της τα 1,5 nm [6]. Στη συνέχεια, επόμενες μελέτες έδειξαν ότι το κολλαγόνο αποτελείται από τρεις μακρομοριακές πολυπεπτιδικές αλυσίδες, δύο όμοιες ($\alpha 1$ chains) και μία διαφορετική ($\alpha 2$ chain), η οποία διαφέρει λίγο στη χημική της σύνθεση. Η κάθε αλυσίδα σχηματίζει από μόνη της μια αριστερόστροφη έλικά με βήμα 18 αμινοξέων ανά στροφή και αποτελείται συνολικά από 1000 αμινοξέα. Οι τρεις αλυσίδες σχηματίζουν, τελικά, μια ελικοειδή δεξιόστροφη δομή ως προς έναν κεντρικό άξονα και συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ του αμινοξέος υδροξυπρολίνη και άλλων φορτισμένων καταλοίπων [7]. Έτσι, δημιουργείται μία τριπλή έλικά βήματος 8,6 nm και σχηματίζεται μια άκαμπτη ράβδος μήκους 300 nm και μοριακού βάρους 300 kDa. Σε κάθε περιστροφή της έλικας συναντώνται 3 αμινοξέα.

Χαρακτηριστικό της ακολουθίας των αμινοξέων του βασικού σκελετού και προϋπόθεση για τη συναρμολόγηση της τριπλής έλικας είναι η ύπαρξη της γλυκίνης (Gly), μετά από κάθε τρία αμινοξέα στις πολυπεπτιδικές α- αλυσίδες. Η αυξημένη συχνότητα της γλυκίνης στην αλληλουχία των αμινοξέων (καταλαμβάνει περίπου το ένα τρίτο όλων των αμινοξέων του μορίου [8]), οφείλεται στο μικρό μέγεθος του μορίου, καθώς επίσης και στο ότι διαθέτει ένα άτομο υδρογόνου στη πλευρική της ομάδα, που διευκολύνει τη διαμόρφωση της τριπλής έλικας, καθώς σχηματίζονται εύκολα δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των αλυσίδων στο κέντρο της έλικας. Με τον τρόπο αυτό, οι α έλικες συναθροίζονται γύρω από τον κεντρικό άξονα της τριπλής έλικας με τρόπο τέτοιο ώστε η γλυκίνη να βρίσκεται τοποθετημένη στο εσωτερικό κέντρο της έλικας, ενώ οι βαρύτερες και ογκώδεις πλευρικές ομάδες των υπόλοιπων αμινοξέων καλύπτουν τις εξωτερικές θέσεις. Αποτέλεσμα αυτής της αναδίπλωσης

είναι η ύπαρξη της επαναλαμβανόμενης ακολουθίας Gly-X-Y στη πολυπεπτιδική αλυσίδα, στην οποία όπου X,Y είναι διαφορετικά αμινοξέα. Συνήθως στη θέση του X αμινοξέος βρίσκεται η προλίνη (Pro) και του Y η υδροξυπρολίνη (Hyp). Το συμπέρασμα αυτό έχει προκύψει από μία σειρά μελετών στις οποίες εφαρμόστηκε περίθλαση ακτίνων-X και άλλες φασματοσκοπικές μέθοδοι [9]. Τα αμινοξέα αυτά απαντώνται σε μεγαλύτερη αφθονία, μετά τη γλυκίνη, στην πρωτεΐνη και έτσι το κολλαγόνο χαρακτηρίζεται από την επαναλαμβανόμενη ακολουθία του τριπεπτιδίου, Gly-Pro-Hyp [10]. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι υπάρχουν και διαφορετικές τριάδες αμινοξέων, που εμφανίζονται στο μόριο του κολλαγόνου, άλλες με μεγαλύτερη και άλλες με μικρότερη συχνότητα [11]. Άλλο αμινοξύ το οποίο εντοπίζεται στη σύσταση του κολλαγόνου και δεν παρουσιάζεται τόσο σε άλλες πρωτεΐνες είναι η υδροξυλυσίνη (Hyl). Αξιοσημείωτο είναι ότι το μοτίβο Gly-Pro-Hyp εντοπίζεται κυρίως στους τύπους κολλαγόνου οι οποίοι συνδέονται με το σχηματισμό ινιδίων (κολλαγόνο τύπου I, II, III). Τα υπόλοιπα είδη κολλαγόνου μπορεί να παρουσιάζουν διαφορετική οργάνωση και αλληλουχία αμινοξέων.

Ακόμα, σχετικά με τις α-αλυσίδες, μπορεί να διαφοροποιούνται ως προς το μέγεθος και τη σύσταση ανάλογα με το τύπο του κολλαγόνου. Η δομή μπορεί να αποτελείται από όμοιες πεπτιδικές αλυσίδες, όπως οι έλικες που παρουσιάζουν τα κολλαγόνα τύπου II, III, VII, VIII, X ή από δύο ή τρεις τύπους αλυσίδων, όπως για παράδειγμα στα κολλαγόνα τύπου I, IV, V,VI,IX και XI. Οι αλυσίδες αποτελούνται από ένα βασικό σκελετό με 1000 αμινοξέα. Όμως υπάρχουν και πλευρικά τμήματα με μικρότερο μήκος τα οποία συνίσταται από περίπου 20 αμινοξέα το καθένα και τα οποία βρίσκονται σε αμινοτελικά και καρβοξυλικά άκρα που ονομάζονται τελοπεπτίδια. Οι περιοχές αυτές βρίσκονται στα άκρα των α-αλυσίδων, είναι μη ελικοειδείς και αποτελούν περίπου το 4% του συνολικού μορίου. Τα τελοπεπτίδια έχουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό μικροινιδίων και ινιδίων κολλαγόνου.

Η δομή του κολλαγόνου έχει την ιδιότητα να συμμετέχει σε μακρομοριακές αλυσίδες μορίων νερού [12], καθώς η τριπλή έλικα του κολλαγόνου διαθέτει ισχυρά συνδεδεμένα μόρια νερού, τα οποία αποτελούν ένα ολόκληρο δίκτυο. Τα μόρια του νερού προκύπτει ότι ενώνονται μεταξύ τους καθώς και με συγκεκριμένα άτομα από τη δομή της τριπλής έλικας και συνεισφέρουν στη σταθεροποίηση της τριπλής έλικας του κολλαγόνου στο χώρο [13]. Οι δεσμοί υδρογόνου οι οποίοι συνδέουν το πεπτιδικό δεσμό $-NH$ της γλυκίνης με μια καρβονυλική ομάδα γειτονικού πολυπεπτιδίου και δημιουργούν δεσμούς του τύπου $NH...C=O$ [14] συμβάλουν στη συγκράτηση των τριών αλυσίδων μαζί. Η κατεύθυνση των δεσμών υδρογόνου είναι κάθετη στον κεντρικό άξονα της ράβδου του κολλαγόνου.

Στη δομή του κολλαγόνου σε κάθε τριπλέτα αμινοξέων του μοτίβου Gly-X-Y, η αμιδική ομάδα της γλυκίνης σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το καρβονύλιο του αμινοξέος στη θέση X της γειτονικής αλυσίδας. Έτσι, τελικά, προκύπτει ότι τα

καρβονύλια της γλυκίνης και του αμινοξέος στη θέση Υ μένουν χωρίς διαθέσιμη αμιδική ομάδα έτσι ώστε να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου. Ακόμα, το υδροξύλιο της υδροξυπρολίνης είναι πιο απομακρυσμένο από το βασικό σκελετό της τριπλής έλικας, με αποτέλεσμα να μην έχει κατάλληλη απόσταση ώστε να δημιουργηθούν δεσμοί υδρογόνου με τα διαθέσιμα καρβονύλια. Σε αυτή τη περίπτωση η ύπαρξη νερού ευνοεί τη σταθεροποίηση της τριπλής έλικας, καθώς το νερό καλύπτει όλες τις διαθέσιμες θέσεις για τη δημιουργία δεσμών υδρογόνου. Η υδροξυπρολίνη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη παραπάνω δομή και αυτό γιατί το υδροξύλιο της μπορεί να συμμετάσχει στο σχηματισμό ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου με τα καρβονύλια των άλλων αμινοξέων. Με άλλα λόγια, η υδροξυπρολίνη παρέχει θέσεις για τη δημιουργία δεσμών υδρογόνου και συνεισφέρει στη σταθερότητα της ελικοειδούς δομής του κολλαγόνου. Για το λόγο αυτό το αμινοξύ της προλίνης ενσωματώνεται συχνά στη θέση Υ στην αλυσίδα του κολλαγόνου και στη συνέχεια υφίσταται κάποια μεταφραστική τροποποίηση και μετατρέπεται σε υδροξυπρολίνη [15].

Τελικά, η τριπλή έλικα η οποία σχηματίζεται στο μόριο του κολλαγόνου εμφανίζει τη μορφή μιας ευθείας ή λυγισμένης ράβδου και φέρει την ιδιότητα να προσκολλάται σε διάφορες υπερμοριακές δομές και να προσδένεται σε μόρια όπως υποκαταστάτες, υποδοχείς, πρωτεάσες, πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας, γλυκοζαμινογλυκάνες (GAGs), νουκλεϊκά οξέα και λιπίδια. Για το λόγο αυτό η τριτοταγής δομή του κολλαγόνου είναι ιδιαίτερα σημαντική για κυτταρικές λειτουργίες όπως η προσκόλληση και η ενεργοποίηση της εξωκυττάριας μήτρας και για ενζυματικές λειτουργίες όπως η υδροξυλίωση των αμινοξέων λυσίνης και προλίνης του κολλαγόνου [16].

Οι σταυροδεσμοί του κολλαγόνου

Με τρόπο αντίστοιχο με τη δομή της τριπλής έλικας, η οποία σταθεροποιείται με το σχηματισμό δεσμών που αναπτύσσονται ανάμεσα στα αμινοξέα της, τα ινίδια κολλαγόνου σταθεροποιούνται με το σχηματισμό δεσμών μεταξύ των μονομερών του κολλαγόνου (μικροϊνίδια). Οι δεσμοί αυτοί που σχηματίζονται ονομάζονται σταυροδεσμοί, δημιουργούνται για τη σταθεροποίηση του δικτύου του κολλαγόνου και παρατηρήθηκαν αρχικά από τον J. P. Orgel και την ερευνητική του ομάδα. Η ανάπτυξη σταυροδεσμών βελτιώνει τις εσωτερικές συνδέσεις του δικτύου κολλαγόνου, προσδίδει στα ινίδια κολλαγόνου δύναμη και σταθερότητα και κατ' επέκταση των ινών. Ο σχηματισμός σταυροδεσμών σε υπερβολικό βαθμό, αποτελεί χαρακτηριστικό της γήρανσης και οδηγεί σε εύθραυστες ίνες κολλαγόνου επηρεάζοντας αρνητικά τη σταθερότητα του κολλαγόνου, προσδίδοντας του μειωμένη αντοχή στη θραύση.

Στην έρευνα του Orgel, ανακάλυψαν ότι τα γειτονικά τελοπεπτίδια μέσα σε ένα μονομερές κολλαγόνου συνδέονται ομοιοπολικά με σταυροδεσμούς για να

σχηματίσουν ινίδια κολλαγόνου [17]. Οι ομοιοπολικοί αυτοί δεσμοί σχηματίζονται εντός των μορίων του κολλαγόνου (ενδομοριακοί) αλλά και μεταξύ αυτών (διαμοριακοί). Η διαδικασία αρχίζει μέσω του ενζύμου λυσυλοξειδάσης, η οποία καταλύει την οξείδωση αμινοξέων λυσίνης και υδροξυλυσίνης με αποτέλεσμα το σχηματισμό αντίστοιχων αλδεϋδικών παραγώγων. Έτσι, οι αντιδραστικές αλδεϋδες που παράγονται (Lys ή Hyl), υπόκεινται σε μια σειρά αντιδράσεων συμπύκνωσης για να σχηματίσουν δισθενείς (π.χ DHLNL), τρισθενείς (π.χ Pyg, Dyd) και τετρασθενείς σταυροδεσμοί περιλαμβάνοντας την τοποθέτηση αμινοξέων της λυσίνης, υδροξυλυσίνης σε γειτονικά μόρια [18]. Στα πρώτα στάδια της οστικής ανάπτυξης του οργανισμού επικρατούν οι δισθενείς δεσμοί, οι οποίοι μπορούν να αναχθούν (αναγώγιμοι), ενώ κατά την ωρίμανση του κολλαγόνου οι δισθενείς σταυροδεσμοί (DHLNL) μετατρέπονται σταδιακά σε τρισθενείς (PYD) ή και τετρασθενείς, πιο ισχυρούς σταυροδεσμούς (μη αναγώγιμους).

Το κολλαγόνο στα οστά

Οι τύποι κολλαγόνου οι οποίοι εντοπίζονται στα οστά είναι το κολλαγόνο τύπου I και V, με το μεγαλύτερο τμήμα να καλύπτεται από το πρώτο και με τα δύο να συνδέονται με το σχηματισμό ινιδίων. Από τη σύγκριση των δύο τύπων προκύπτει ότι η τριπλή έλικα στο κολλαγόνο τύπου I σχηματίζεται από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες, δύο τύπου α_1 και μια τύπου α_2 . Από την άλλη πλευρά το κολλαγόνο τύπου V σχηματίζεται από τρεις διαφορετικές αλυσίδες α_1 , α_2 και α_3 . Ο ρόλος του κολλαγόνου τύπου I είναι ιδιαίτερα σημαντικός για το οστό, ενώ εκείνος του τύπου V δεν είναι πλήρως καθορισμένος. Παρόλα αυτά είναι ευρέως αποδεκτό ότι η αλληλεπίδραση των δύο τύπων κολλαγόνου καθορίζει τη διάμετρο των ινιδίων κολλαγόνου κατά το σχηματισμό τους και συνεισφέρουν στη διαμόρφωση της δομής του οστικού ιστού.

Τα μόρια κολλαγόνου τύπου I σχηματίζουν ινίδια κολλαγόνου στην εξωκυττάρια μήτρα τα οποία στη πορεία δομούν το οστό και τους ινώδεις ιστούς. Τα ινίδια αυτά έχουν μήκος 30 nm και διάμετρο 67 nm. Στο χώρο διατάσσονται κατά μήκος το ένα με το άλλο σε απόσταση 67 nm και σχηματίζουν μια εξαγωνική μονάδα με διάμετρο 50-200 nm. Το μονομερή του κολλαγόνου I, πακετάρονται με τέτοιο τρόπο ώστε να σχηματίζονται συμπλεγμένα, δεξιόστροφα μικροϊνίδια τα οποία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με αποτέλεσμα τη δημιουργία της σπειροειδούς δομής της ώριμης ίνας του κολλαγόνου [19].

- **Μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες**

Στην οργανική φάση του οστού εκτός από το κολλαγόνο συμμετέχει και ένα σύνολο μη κολλαγονούχων πρωτεϊνών, οι οποίες αποτελούν ένα πολύ μικρό μέρος της. Συμβάλλουν ενεργά στη διαδικασία της οστεοσύνθεσης, καθώς και σε λειτουργικές ιδιότητες του οστού. Ένα παράδειγμα τέτοιων πρωτεϊνών αποτελεί η οστεοκαλσίνη,

η οποία αποτελεί το 10-20 % της κ.β αναλογίας των μη κολλαγονούχων πρωτεϊνών και αποτελεί μια πρωτεΐνη μικρού μοριακού βάρους. Κύριο χαρακτηριστικό είναι ότι τα τρία κατάλοιπα γλουταμινικού οξέος που διαθέτει καρβοξυλιώνονται, ως αποτέλεσμα μιας διαδικασίας μετάφρασης εξαρτώμενη από τη βιταμίνη Κ. Μέσω της διαδικασίας της καρβοξυλίωσης, η οστεοκαλσίνη προσφέρει την ικανότητα πρόσδεσης σε αυτή ασβεστίου και συμβάλλει με αυτόν τον τρόπο στην ασβεστοποίηση της μήτρας του κολλαγόνου. Ακόμα, λειτουργεί ως αναστολέας του σχηματισμού νέου οστού και επηρεάζει διάφορα χαρακτηριστικά του βιοαπατίτη, τα οποία σχετίζονται με τη ποιότητα του, όπως για παράδειγμα το μέγεθος των κρυσταλλιτών του και η ποσότητα των ανθρακικών ιόντων του [20].

Υπάρχουν και άλλες πρωτεΐνες εκτός από την οστεοκαλσίνη οι οποίες σχετίζονται με τη σύνθεση και τις λειτουργίες της ανόργανης φάσης, όπως η κρυστάλλωση και η κρυσταλλική ανάπτυξη. Λόγου χάρη, υπάρχουν πρωτεΐνες όπως η οστεοποντίνη, η οστική σιαλοπρωτεΐνη, οι οποίες συνδέονται με την ανόργανη φάση μέσω όξινων ομάδων και περιέχουν την ακολουθία αμινοξέων αργινίνη-γλυκίνη-ασπαρτικό οξύ, η οποία είναι χαρακτηριστική μιας οικογένειας πρωτεϊνών που δεσμεύονται στη κυτταρική μεμβράνη των ιντεγκρινών. Όσον αφορά τις ιντεγκρίνες έχουν την ικανότητα να ανοίγουν την κυτταρική μεμβράνη και να συνδέουν το εξωκυττάριο περιβάλλον με τον κυτταροσκελετό και κατά συνέπεια συμβάλλουν στη διενέργεια διαδικασιών που αφορούν την καταστροφή και σύνθεση των οστών. Για παράδειγμα, στην περίπτωση οστικών κυττάρων, δηλαδή των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών, ανοίγουν την κυτταρική μεμβράνη και προκαλούν την έκφραση του φαινοτύπου τους, οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο στην καταστροφή του οστού [21].

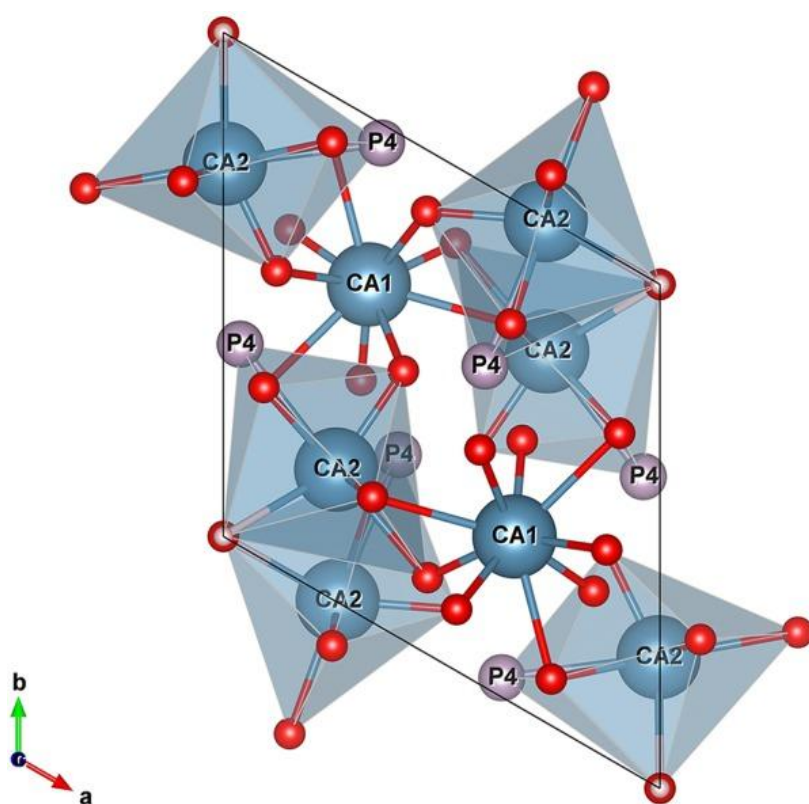
Επιπρόσθετα, στο οστό υπάρχουν σε πολύ μικρές ποσότητες και άλλες πρωτεΐνες και οργανικές ενώσεις όπως η οστεοπρωτογενίνη (OPG), η ινερφερόνη-γ, οι ιντερλευκίνες, οι μορφογενετικές πρωτεΐνες του οστού (BMP), οι κυτταροκίνες και οι αυξητικοί παράγοντες TGF και IGF. Οι ουσίες αυτές σχετίζονται με λειτουργίες του οστέινου σκελετού η διαίρεση, η αύξηση και η λειτουργικότητα των κυττάρων. Επιπλέον, οι αυξητικοί παράγοντες συμβάλλουν στις διαδικασίες σχηματισμού και ανάπτυξης του οστού. Τέλος, στον οστέινο ιστό βρίσκεται και ένα μικρό ποσοστό λιπιδίων τα οποία συμβάλλουν στην κρυστάλλωση του βιοαπατίτη [22].

1.1.2. Ανόργανη φάση οστού

Οι μηχανικές ιδιότητες του οστού σχετίζονται άμεσα με τη χημική σύσταση και δομή της ανόργανης φάσης του. Το ανόργανο μέρος του οστού, που χαρακτηρίζεται ως βιοαπατίτης (BAP), αποτελείται κυρίως από ένα άλας του φωσφορικού ασβεστίου το οποίο προσομοιάζει σε μεγάλο βαθμό, χημικά και δομικά, το γεωλογικό υδροξυαπατίτη, με χημική σύσταση $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, HAP. Το υπόλοιπο τμήμα του αποτελείται από ιχνοστοιχεία όπως είναι τα ιόντα μαγνησίου, νατρίου, καλίου

και τα κιτρικά. Τα υπόλοιπα ανόργανα άλατα, όπως και τα ελεύθερα ιόντα προσροφώνται στην επιφάνεια των κρυστάλλων απατίτη. Ο βιοαπατίτης καλύπτει, εξολοκλήρου το ανόργανο τμήμα του οστού, με τη μορφή νανο-κρυστάλλων. Επιπλέον, το μέγεθος των κρυστάλλων του βιοαπατίτη, αυξάνεται κατά τη διαδικασία της ωρίμανσης του οστού και βρίσκονται τοποθετημένοι στην κενή περιοχή μεταξύ των μορίων κολλαγόνου. Προσκολλούνται στην επιφάνεια των ινιδίων κολλαγόνου, καθώς και μέσα στη τριπλή έλικα του μορίου του κολλαγόνου.

Το φωσφορικό άλας του ασβεστίου, παρουσιάζει πεπλατυσμένο ή ραβδοειδές σχήμα, εξαγωνική συμμετρία και οργανώνεται με τη μορφή μικρών κρυστάλλων, οι οποίοι έχουν σχήμα βελόνων ή ραβδίων με διάμετρο 30-50 Å και μήκος περίπου ίσο με 600 Å. Πιο συγκεκριμένα, μελέτες κρυσταλλογραφίας έχουν δείξει ότι η εξαγωνική μορφή την οποία φέρει ο απατίτης χαρακτηρίζεται από ένα εξαπλό c-άξονα που βρίσκεται κάθετος σε τρεις ίσους α-άξονες ($\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$), σχηματίζοντας μεταξύ τους γωνία 120°. Έτσι, η στοιχειώδης κυψελίδα του απατίτη αποτελείται από δυο τριγωνικές υπομονάδες, οι οποίες σχηματίζουν ένα πρίσμα με ρομβοειδείς κάθετες πλευρές. Στις γωνίες της κυψελίδας βρίσκονται τα ιόντα OH^- , τα οποία παρεμβάλλονται από δύο άτομα Ca με τριγωνική διάταξη, από δύο φωσφορικές ομάδες που παρουσιάζουν εξίσου τριγωνική διάταξη και από άτομα Ca σε απομακρυσμένες αποστάσεις έχοντας εξαγωνική παράταξη στο χώρο [23].

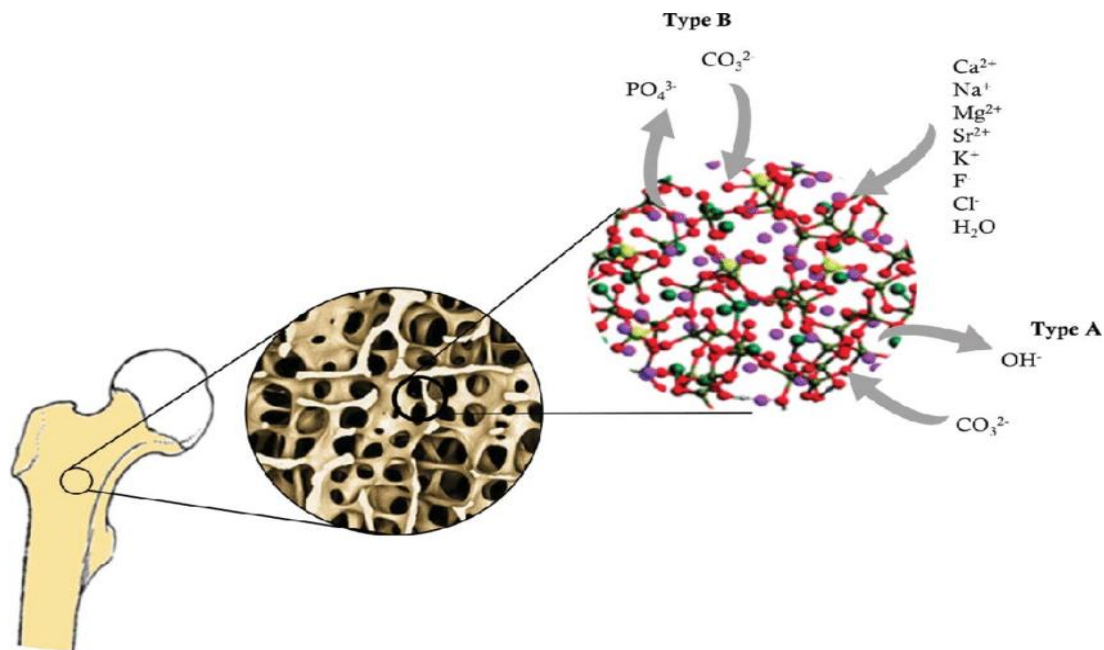


Εικόνα 2: Δομή κρυστάλλου υδροξυαπατίτη [24]

Ο βιολογικός απατίτης φέρει ιδιαίτερη χημική σύσταση, και διαφέρει κάποιες φορές από αυτή του γεωλογικού απατίτη, καθώς χαρακτηριστική είναι η παρουσία χημικών αντικαταστάσεων των ιοντικών ειδών του στο μόριό του. Εξαιτίας της μη σταθερής δομής του βιοαπατίτη, παρουσιάζεται δυσκολία στη ταυτοποίηση της χημικής του σύστασης, καθώς η εκτεταμένη αντικατάσταση των βασικών ιόντων του βιοαπατίτη από άλλα ιόντα προκαλεί απώλεια της συμμετρίας του κρυσταλλίτη [25].

Πιο αναλυτικά, στο ιοντικό σύστημα του απατίτη, μπορούν να προκύψουν μερικές ή ολικές υποκαταστάσεις. Οι υποκαταστάσεις μπορεί να περιλαμβάνουν ιόντα ίδιου ή αντίθετου φορτίου. Όμως η υποκατάσταση από ιόντα με διαφορετικό φορτίο απαιτεί αποζημίωση φορτίων για τη διατήρηση της ηλεκτρονιακής ουδετερότητας. Η αποζημίωση αυτή μπορεί να αποτελείται από τη δημιουργία ελλείμματος στη θέση των ιόντων αντίθετων φορτίων ή συνδέοντας υποκαταστάτες διαφορετικών φορτίων. Για παράδειγμα, ιόντα PO_4^{3-} αντικαθίσταται από HPO_4^{2-} οδηγώντας στο σχηματισμό ελλείμματος Ca^{2+} και OH^- [26].

Στη περίπτωση του βιολογικού απατίτη, η κύρια χημική αντικατάσταση που συμβαίνει είναι η αντικατάσταση μέρους των φωσφορικών ιόντων (PO_4^{-3}) και των υδροξυλίων (OH^-) του απατίτη από τα ανθρακικά ιόντα (CO_3^{-2}) [27]. Η παραπάνω αντικατάσταση πρόκειται για μία από τις πιο σημαντικές αντικαταστάσεις χημικών ειδών, καθώς η κατά βάρος περιεκτικότητα των ανθρακικών ιόντων στον απατίτη των οστών αγγίζει περίπου το 7%. Έτσι, οι διαμορφώσεις αυτές οδηγούν στο σχηματισμό ανθρακικών απατιτών τύπου Β ή Α ή ΑΒ. Ο τύπος Β ανθρακικού απατίτη περιέχει έλλειμμα ιόντων ασβεστίου και υδροξειδίου. Η υποκατάσταση Α τύπου οδηγεί αποκλειστικά στη δημιουργία ελλείμματος υδροξειδίου. Λόγω αυτής της σημαντικής ποσότητας των ανθρακικών ιόντων, ο βιοαπατίτης των οστών θεωρείται ένα είδος ανθρακικού απατίτη. Το ποσοστό των ανθρακικών ιόντων στο μόριο του βιοαπατίτη αυξάνεται συναρτήσει της ηλικίας του οργανισμού. Ακόμα, στο κρυσταλλικό πλέγμα του βιοαπατίτη εντοπίζονται και άλλα ιόντα, σε μικρότερο ποσοστό, όπως για παράδειγμα Na^+ , Mg^{2+} , K^+ στις θέσεις των Ca^{2+} και στη θέση των OH^- εντοπίζονται τα ανιόντα F^- και Cl^- . Τα ιόντα αυτά ανάλογα με τις ανάγκες του οργανισμού απελευθερώνονται ή αποθηκεύονται από τους κρυστάλλους βιοαπατίτη.



Εικόνα 3: Οι βασικές υποκαταστάσεις στο κρυσταλλικό πλέγμα του βιοαπατίτη [28].

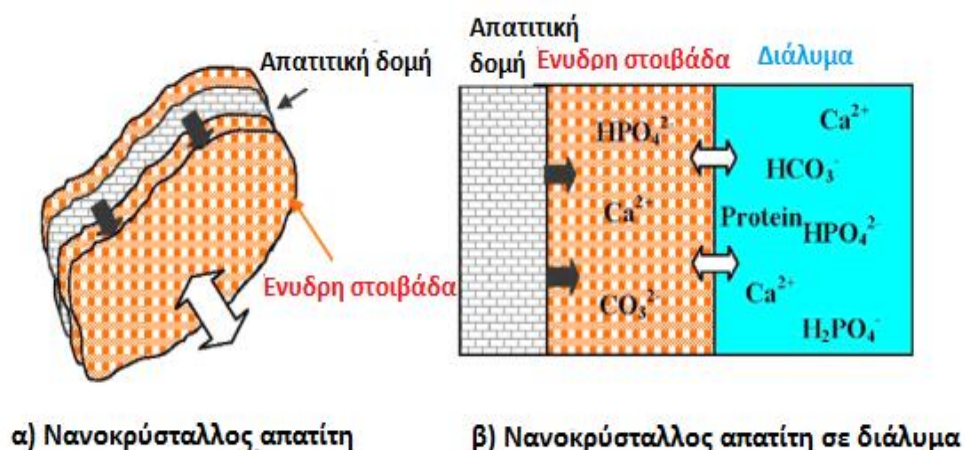
Φασματοσκοπικές μελέτες της ανόργανης φάσης του οστού έχουν υποδείξει την ύπαρξη ανόργανων ιόντων και σε μη – απατιτικές περιοχές [29]. Στη βιβλιογραφία προτείνεται ένα μοντέλο μιας δομημένης ενυδατωμένης στρώσης, η οποία βρίσκεται στην επιφάνεια των νανοκρυστάλλων του απατίτη και περιλαμβάνει ένα περιβάλλον ιοντικά μη απατητικό, υπεύθυνο για τη χημική δραστηριότητα και εξέλιξη του απατίτη (ωρίμανση, κινητικότητα ιόντων και ιδιότητες απορρόφησης) [30]. Η ένυδρη αυτή στοιβάδα που περιβάλλει τους νανοκρυστάλλους του βιοαπατίτη περιέχει κινητά ιοντικά είδη (μη απατητικά), όπως τα όξινα φωσφορικά, τα οποία συνήθως εντοπίζονται σε νεοσχηματισθέντα οστά και τα οποία μειώνονται με την αύξηση της ηλικίας.

Η χημική σύνθεση του ένυδρου στρώματος δεν είναι πλήρως καθορισμένη. Όμως, το ένυδρο αυτό στρώμα μπορεί να προσδίδει σημαντικές ιδιότητες στους νανοκρυστάλλους απατίτη, σημαντικές για τους ζωτικούς οργανισμούς στην ομοίωση. Η στοιβάδα αυτή αποτελεί μια δεξαμενή ιόντων, η οποία έχει διαφορετική σύσταση από το χημικό περιβάλλον που περιβάλλει τον οστέινο ιστό και τα ιόντα αυτά αξιοποιούνται από τον οργανισμό όταν υπάρχει ανάγκη. Ακόμα, το ένυδρο στρώμα μπορεί να βοηθήσει στην κατανόηση και εξήγηση της συμπεριφοράς των βιολογικών απατιτών και θεωρείται υπεύθυνο για τις περισσότερες ιδιότητες αυτών, ιδιαίτερα της υψηλής ηλεκτρικής αγωγιμότητας που πιθανώς προκύπτει από μια υψηλή επιφανειακή ιοντική κινητικότητα. Συμμετέχει στην ομοίωση λόγω της πολύ υψηλής ειδικής επιφάνειας των κρυστάλλων των οστών και επίσης αποτελεί σημαντική δεξαμενή ιόντων με διαθεσιμότητα που εξαρτάται από την κατάσταση ωρίμανσης. Η ωρίμανση είναι ένα αναπόφευκτο φυσικό - χημικό φαινόμενο που οδηγεί σε απώλεια ζωτικών ιδιοτήτων ανταλλαγής ιόντων. Έτσι, είναι απαραίτητο η ανόργανη φάση του οστού να ανανεώνεται. Ωστόσο, με τη γήρανση, ο κύκλος αναδιαμόρφωσης γίνεται πιο αργός και οι

επιφανειακές ιδιότητες υποβαθμίζονται. Η ωρίμανση αντιστοιχεί σε μείωση του ποσοστού αυτών των ιδιαίτερα ασταθών, μη απατιτικών περιβαλλόντων και σε αύξηση του απατιτικού περιβάλλοντος. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, ένας αριθμός ιόντων από την ενυδατωμένη στιβάδα μπορεί να ενσωματωθεί στο απατιτικό δίκτυο.

Η στοιβάδα υπολογίζεται ότι έχει πάχος μόλις 1nm και αποτελείται από μια άμορφη φάση που περιέχει κυρίως δεσμευμένα μόρια νερού και επίσης σημαντικές ποσότητες από ιόντα όπως Ca^{2+} , CO_3^{2-} , HPO_4^{2-} , Mg^{2+} κ.α. Τα ιόντα αυτά εντοπίζονται σε μια ένυδρη περιοχή στην επιφάνεια των κρυστάλλων, εκ των οποίων μεγάλο μέρος αποτελείται από ιόντα CO_3^{2-} και HPO_4^{2-} . Τα ιόντα της ένυδρης στοιβάδας μπορούν εύκολα να ανταλλάσσονται με αμφίδρομες αντιδράσεις με ιόντα άλλων διαλυμάτων ή με φορτισμένες πρωτεΐνες καθορίζοντας έτσι τις αλληλεπιδράσεις της επιφάνειας στην οποία περιέχονται οι νανοκρύσταλλοι [31]. Όταν ένας απατίτης βυθίζεται σε διάλυμα, πλούσιο σε αθρακικά, τότε τα ανθρακικά ιόντα μπορούν γρήγορα να υποκαταστήσουν τα επιφανειακά υδρογονοφωσφορικά ιόντα και αντίστροφα. Αυτή η ικανότητα ανταλλαγής μειώνεται με το χρόνο λόγω των φαινομένων ωρίμανσης που οδηγούν σε μείωση του ενυδατωμένου στρώματος που αντικαθίσταται από έναν πιο σταθερό απατίτη.

Δεδομένα στη βιβλιογραφία επιβεβαιώνουν την υψηλή αντιδραστικότητα και τη δομική πολυπλοκότητα των νανοκρυστάλλων του απατίτη [32]. Η αφυδάτωση και η ανταλλαγή ιόντων τροποποιούν τα τοπικά ιοντικά περιβάλλοντα και τη δομή του ενυδατωμένου στρώματος. Τροποποιήσεις που παρατηρούνται από φασματοσκοπία FTIR (Fourier-transform infrared spectroscopy) σε υγρά δείγματα αφορούν κυρίως φωσφορικές, ανθρακικές ομάδες και δονήσεις αμιδικών δεσμών [30]. Η πιο ισχυρή αλλαγή σχετίζεται με μπάντα που αντιστοιχεί σε ιόντα HPO_4^{2-} και επιβεβαιώνεται η αντικατάσταση ομάδων HPO_4^{2-} από ανθρακικό άλας. Τα εντελώς διαφορετικά φάσματα σε δείγματα ανταλλαγής ιόντων υποδηλώνουν μια πλήρη δομική τροποποίηση του φωσφορικού περιβάλλοντος που σχετίζεται με την πρόσληψη ανθρακικών και μαγνησίου πιθανώς λόγω της αναδιοργάνωσης μορίων νερού και ιόντων στην ενυδατωμένη στιβάδα [33].

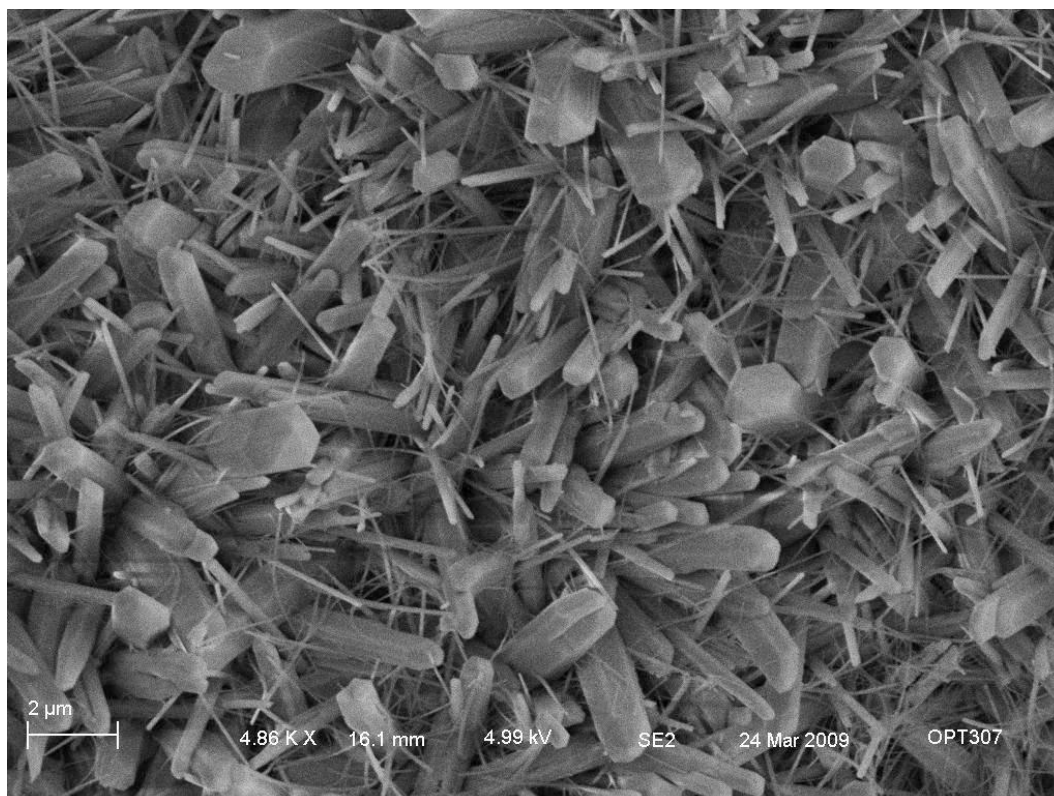


Εικόνα 4: Κρυσταλλίτης απατίτη με την ένυδρη στοιβάδα που τον περιβάλλει [34].

Η διαδικασία σχηματισμού των κρυστάλλων του απατίτη, καθώς και η ασβεστοποίηση των ινιδίων κολλαγόνου είναι η εξής :

Ο οστεοβλάστης αφού δημιουργήσει το κολλαγονικό υπόστρωμα στέλνει στο περιβάλλον του, με εξωκύττωση τμήματα-σωματίδια της λιποειδικής μεμβράνης του, τα οποία περιέχουν αλκαλική φωσφατάση. Στο περιβάλλον του υπάρχουν άφθονα ιόντα ασβεστίου και φωσφόρου (υπερκορεσμός). Τα σωματίδια αυτά αποτελούν τους πυρήνες για τη δημιουργία των κρυστάλλων του απατίτη. Ακολούθως, οι θετικά φορτισμένοι κρύσταλλοι ελκύονται από τις γλυκοζαμινογλυκάνες, οι οποίες αποτελούν μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες αλλά ισχυρά ανιονικές ουσίες, που βρίσκονται ανάμεσα στα ινίδια του κολλαγόνου και χρησιμοποιούνται για τη συγκόλληση τους και τελικά καθιλώνονται πάνω στο κολλαγονούχο υπόστρωμα.

Ο βιοαπατίτης εκτός από την σταθερότητα και την σκλήρυνση που παρέχει στα οστά, αποτελεί και τη βασική αποθήκη ασβεστίου για τον οργανισμό. Για το λόγο αυτό σε περιπτώσεις όπου το ασβέστιο του αίματος είναι μειωμένο, εκκρίνεται από τους παραθυρεοειδείς αδένες η παραθορμόνη, η οποία δρώντας, διαμέσου των οστεοβλαστών, στους οστεοκλάστες, τους διεγείρει αυξάνοντας την οστεόλυση. Έτσι, διαμέσου της οστεόλυσης ικανοποιείται η ανάγκη για παροχή ασβεστίου στον οργανισμό και επιτυγχάνεται με τη διάλυση των κρυστάλλων του βιοαπατίτη.



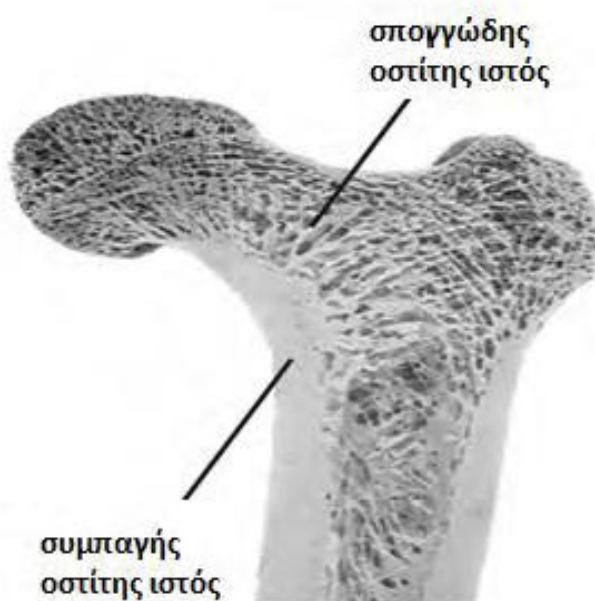
Εικόνα 5: Απεικόνιση κρυστάλλων βιοαπατίτη με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) [35].

1.2. Ιεραρχική δομή οστού

Τα οστά αποτελούνται από τον οστίτη ιστό, ο οποίος αποτελεί το μεγαλύτερο συνδετικό ιστό στο ανθρώπινο σώμα. Η σύνθεση του οστίτη ιστού περιλαμβάνει τη μεσοκυττάρια ουσία και οστεοκύτταρα τα οποία βρίσκονται στις κοιλότητες της. Όπως αναφέρθηκε και σχολιάστηκε λεπτομερώς παραπάνω, η μεσοκυττάρια ουσία αποτελείται από οργανικά και ανόργανα συστατικά, με το κολλαγόνο τύπου I και το βιοαπατίτη να κυριαρχούν. Ο συνδυασμός των παραπάνω μορίων διαφέρει ανάλογα με τη μορφολογία του οστίτη ιστού και προκύπτει διαφορετική οργάνωση στο οστό. Η κατανόηση της δομής του έγκειται στην ανάλυση του σχηματισμού των οστών μέσω της διαδικασίας της οστεογένεσης και την ανάλυση των επτά επιπέδων της ιεραρχικής δομής των οστών από μακρο- σε μικρο και νάνο- βαθμίδα [36]. Σε μακροσκοπικό επίπεδο παρατήρησης της οργάνωσης του οστού, διακρίνονται δύο μορφές οστών: το συμπαγές (cortical ή compact) και το σπογγώδες (trabecular ή cancellous).

Μορφολογικοί τύποι οστίτη οστού

Σε μακροσκοπικό επίπεδο οι τύποι οστίτη ιστού οι οποίοι προαναφέρθηκαν ως συμπαγές και σπογγώδες οστό είναι βιολογικά και χημικά όμοιοι, όμως παρουσιάζουν διαφορές ως προς την οργάνωση τους, το βαθμό πορώδους, την ανάπτυξη, την αρχιτεκτονική, τη λειτουργία, την απόσταση από το μυελό των οστών, τη παροχή αίματος, την ταχύτητα του χρόνου ανακατασκευής και το βαθμό των μεταβολών οι οποίοι εξαρτώνται από την ηλικία [37]. Το συμπαγές οστό αποτελεί το τμήμα εκείνο που βρίσκεται κοντά στην επιφάνεια, ενώ το σπογγώδες βρίσκεται πιο εσωτερικά.



Εικόνα 6: Απεικόνιση συμπαγούς και σπογγώδους οστού.

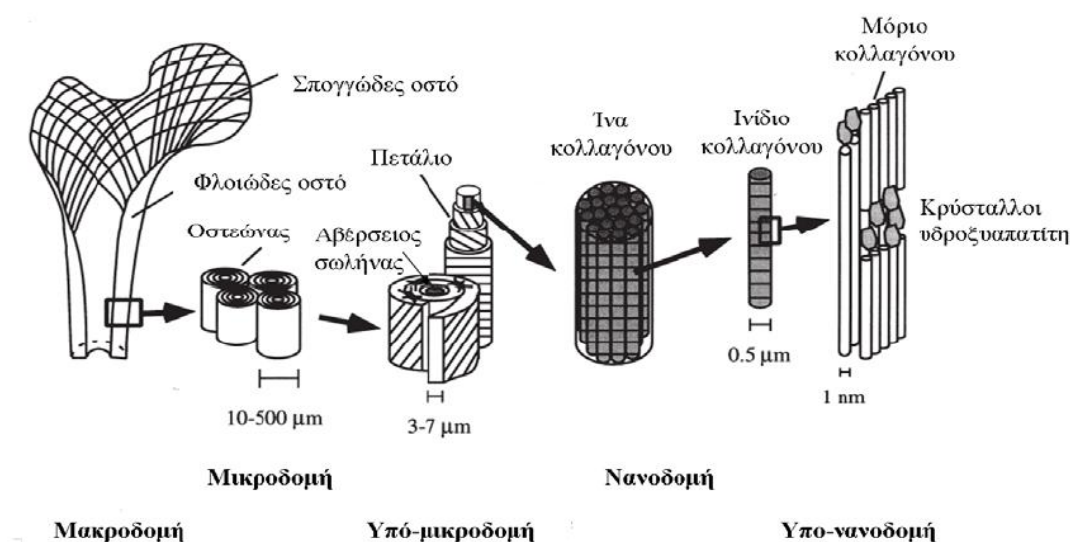
Συμπαγές οστό

Στον ενήλικο ανθρώπινο σκελετό το συμπαγές οστό καταλαμβάνει περίπου το 80% της μάζας του οστού και σε σχέση με το σπογγώδες οστό καταλαμβάνει πολύ μικρότερο εμβαδό επιφάνειας εξαιτίας του μικρού πορώδους του το οποίο εντοπίζεται μεταξύ 5% και 10%. Το πορώδες του συμπαγούς οστού οφείλεται κατά κύριο λόγο στα Χαρβεσιανά κανάλια και στα κανάλια Volkmann. Το συμπαγές οστό είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση της μηχανικής σταθερότητας και αντοχής των οστών και τη προστασία που παρέχει στον οργανισμό ο σκελετός, καθώς σχηματίζει το εξωτερικό περίβλημα όλων των οστών και περιβάλλει τη κεντρική κοιλότητα του μυελού. Το μεγαλύτερο μέρος του συμπαγούς οστού εντοπίζεται στον άξονα των επιμήκων οστών του σκελετού. Εκτός από το εξωτερικό κέλυφος γύρω από το

σπογγώδες οστό, εμφανίζεται στο τέλος των αρθρώσεων και της σπονδυλικής στήλης.

Η βασική δομική μονάδα του συμπαγούς οστού και το ανώτερο επίπεδο οργάνωσης του είναι ο οστεώνας [38], σύμφωνα με την ιεραρχική δομή των επτά επιπέδων που προτάθηκε για τη δομή του οστού από τον Weiner.

Στη βάση της ιεραρχίας βρίσκονται τα αμινοξέα τα οποία συνθέτουν αρχικά το τροποκολλαγόνο το οποίο τελικά μετατρέπεται σε κολλαγόνο. Τα μικροσκοπικά πετάλια του υδροξυαπατίτη (HA) βρίσκονται προσανατολισμένα και ευθυγραμμισμένα με τις ίνες του κολλαγόνου, οι οποίες στοιβάζονται παράλληλα και τυλίγονται σε ομόκεντρα στρώματα και συνθέτουν το οστικό πετάλιο. Έτσι, δημιουργούνται ομάδες 10-30 ομόκεντρων κύκλων και το κάθε πετάλιο έχει πάχος μερικά μικρόμετρα (3-7 μm) και αποτελείται από ασβεστοποιημένες ίνες κολλαγόνου, όπου πάνω σε καθεμία από τις ίνες που το αποτελούν βρίσκονται κρύσταλλοι υδροξυαπατίτη σε συμμετρική διάταξη. Το πετάλιο διατάσσεται ομόκεντρα γύρω από τα αιμοφόρα αγγεία σχηματίζοντας τους οστεώνες ή διαφορετικά Αβερσειανά συστήματα, τα οποία ανακαλύφθηκαν το 1961 από τον Harves. Ο ορισμός του οστεώνα περιλαμβάνει κυκλικά δαχτυλίδια πεταλίων (ομόκεντρα πετάλια) τα οποία περιβάλλουν κατά μήκος ένα αγγειακό κανάλι. Μοιάζει με κύλινδρο (200-300 μm) και είναι σχεδόν παράλληλος με τον μακρύ άξονα του οστού. Ο πόρος που βρίσκεται στο κέντρο των ομόκεντρων κύκλων ευνοεί την ανάπτυξη φλεβών, αρτηριών και νεύρων, γύρω από τα οποία αναπτύσσεται το οστό με τη διαμόρφωση των ομόκεντρων κύκλων.



Εικόνα 7: Ιεραρχική δομή συμπαγούς οστού [39].

Σπογγώδες οστό

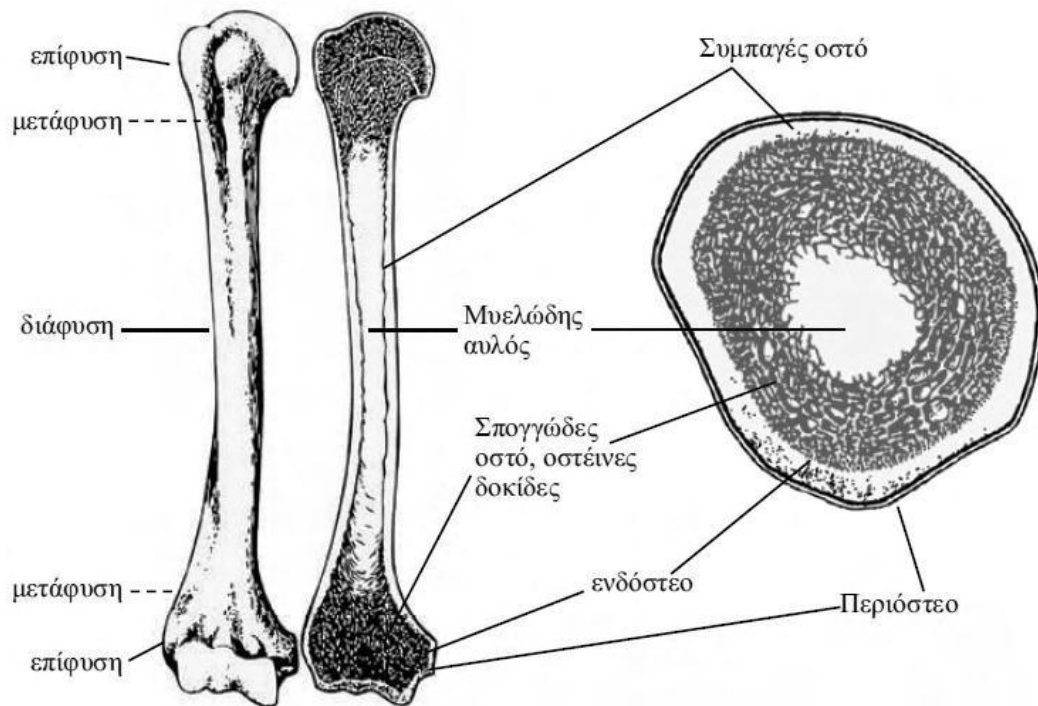
Το σπογγώδες οστό αποτελεί το 20% της συνολικής οστικής μάζας και βρίσκεται στο εσωτερικό των επιμήκων οστών, τους σπονδύλους και σε επίπεδα οστά, όπως για παράδειγμα το λαγόνιο. Σε αντίθεση με τα συμπαγές οστό, το σπογγώδες οστό εμφανίζει μεγαλύτερο πορώδες, με ποσοστό που ξεπερνά το 40%. Η βασική δομική μονάδα του σπογγώδους οστού είναι οι δοκίδες (trabeculae), οι οποίες διευθετούνται με διάφορους τρόπους σχηματίζοντας δοκιδωτές ράβδους ή πλάκες. Η ανοιχτή δομή του, εμφανίζει κοιλότητες που ονομάζονται μυελοκυψέλες και παρουσιάζει εικόνα όμοια με κηρήθρα. Αποτελείται από οστεοκύτταρα και από μεσοκυττάρια ουσία. Οι οπές στην επιφάνεια του κυμαίνονται από 100-500 μm. Σημαντικό μέρος του μυελού των οστών εντοπίζεται στον όγκο του σπογγώδους οστού.

Σχετικά με τις διαφορές που παρουσιάζουν οι περιοχές του οστέινου ιστού σημειώνονται εμφανείς μορφολογικές και δομικές διαφορές, οι οποίες εντοπίζονται στο αυξημένο πορώδες και στο μεγαλύτερο λόγο επιφάνειας/ όγκο που χαρακτηρίζει το σπογγώδες οστό. Επιπλέον, σημειώνονται διαφορές οι οποίες σχετίζονται με φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της ανόργανης και οργανικής φάσης. Για παράδειγμα σε προηγούμενες μελέτες έχει αποδειχθεί ότι η χημική σύσταση του βιοαπατίτη διαφέρει ανάμεσα στα δύο είδη οστού, καθώς ο λόγος Ca/ P παρουσιάζεται μεγαλύτερος στο συμπαγές οστό. Ακόμα, αναφέρεται ότι ο λόγος αυτός συγκεκριμένα αυξάνεται με πιο γρήγορο ρυθμό στο σπογγώδες οστό με την αύξηση της ηλικίας. Όσον αφορά, το ποσοστό των ανθρακικών ιόντων (CO_3^{2-}) που βρίσκεται στο κρυσταλλικό πλέγμα του απατίτη φαίνεται ότι και αυτή η ποσότητα διαφέρει μεταξύ των δύο τύπων οστού, με το βιοαπατίτη του συμπαγούς οστού να παρουσιάζει μεγαλύτερη περιεκτικότητα ανθρακικών.

Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό το οποίο αποτελεί δείγμα διαφοροποίησης των δύο ειδών οστίτη ιστού είναι η μορφή των κρυστάλλων βιοαπατίτη. Με τη χρήση XRD βρέθηκε ότι το συμπαγές οστό παρουσιάζει κρυστάλλους με μεγαλύτερο μέγεθος σε σχέση με αυτούς του σπογγώδους οστού [40]. Ακόμα, σχετικά με την οργανική φάση το συμπαγές οστό διαθέτει μεγαλύτερο αριθμό αμινοξέων (residues) υδροξυλυσίνης καθώς επίσης και σταυροδεσμών, στις οποίες ο συντελεστής Young, ο οποίος σχετίζεται με την ελαστικότητα, παρουσιάζεται μεγαλύτερος στο συμπαγές οστό [41].

Επιπρόσθετα, στο οστό διακρίνονται επιπλέον δύο περιοχές : η επίφυση (epiphysis) και η διάφυση (diaphysis). Πιο αναλυτικά, η επίφυση είναι πλούσια σε σπογγώδες οστό ενώ αντίθετα η διάφυση κυρίως σε συμπαγές αλλά με σημαντική ποσότητα σπογγώδους. Το οστό περιβάλλεται εξωτερικά από έναν υμένα, ο οποίος ονομάζεται περιόστεο και εξασφαλίζει την απομόνωση του εσωτερικού τμήματος του οστού από το περιβάλλον του. Στην περιοχή που βρίσκεται η επίφυση εντοπίζεται ακόμα

έναν υμένας ο οποίος ονομάζεται ενδόστεο και απομονώνει το συμπαγές οστό από το μυελό των οστών. Άξιο αναφοράς είναι ότι στο εσωτερικό του μυελού παρατηρούνται αρτηρίες οι οποίες τροφοδοτούν με χρήσιμα συστατικά το οστό.



Εικόνα 8: Μορφολογική απεικόνιση οστού [42].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Φασματοσκοπία Raman

2.1. Εισαγωγή στη Φασματοσκοπία Raman

Η φασματοσκοπία Raman (Raman Spectroscopy) είναι μια φασματοσκοπική τεχνική που χρησιμοποιείται για την έρευνα και τη μελέτη μοριακών, ιοντικών και κρυσταλλικών δομών. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο οπτικό φαινόμενο Raman, το οποίο ανακαλύφθηκε από τον Ινδό φυσικό Sir Chandrasekhara Venkata Raman, ο οποίος παρατήρησε για πρώτη φορά το φαινόμενο στα μοριακά υγρά το 1928 [43]. Το φαινόμενο αυτό σχετίζεται με την αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη και πιο ειδικά με τη σκέδαση του φωτός. Για το έργο του σχετικά με τη σκέδαση του φωτός, και ειδικότερα της μερικής μεταβολής του μήκους κύματος μονοχρωματικού φωτός όταν διέρχεται από διαφανές μέσο το οποίο ονομάζεται Φαινόμενο Raman και στο οποίο βασίζεται η τεχνική της φασματοσκοπίας Raman, βραβεύτηκε με Νόμπελ Φυσικής (1930). Το φαινόμενο Raman διαθέτει θεμελιώδη χαρακτήρα για τη σκέδαση του φωτός, κάτι ανάλογο του φαινομένου Compton.

Η συγκεκριμένη τεχνική αποτελεί βασικό εργαλείο σε αναλυτικό και ερευνητικό επίπεδο καθώς μπορεί να εφαρμοστεί σε διάφορους επιστημονικούς κλάδους όπως στην Ιατρική, τη Φαρμακευτική, τις θετικές επιστήμες, τη φυσική ημιαγωγών κ.α. Με τη χρήση της Φασματοσκοπίας Raman καθίσταται ικανή η χημική εξακρίβωση και ο χαρακτηρισμός μοριακών δομών, με τον προσδιορισμό των δονούμενων χημικών δεσμών. Επιτυγχάνεται η διερεύνηση οργανικών και ανόργανων ενώσεων σε υγρή ή στερεή κατάσταση ή σε διαλύματα. Γενικά τα φάσματα Raman είναι χαρακτηριστικά για κάθε μόριο, καθώς περιέχουν πληροφορίες για τα δονητικά τους επίπεδα και αποτελούν το δακτυλικό αποτύπωμα του μορίου [44].

2.2.Θεωρία σκέδασης Raman

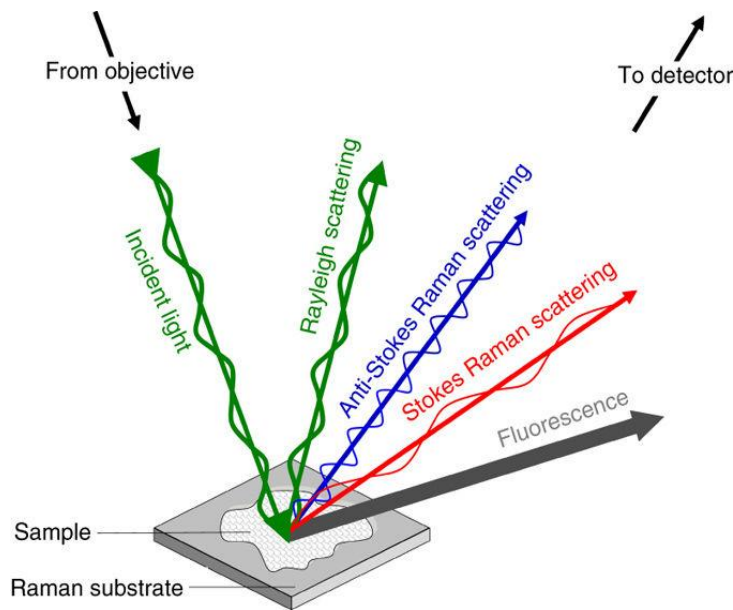
Η σκέδαση Raman είναι ένα από τα φαινόμενα που προκύπτουν από την αλληλεπίδραση ακτινοβολίας. Όταν μία μονοχρωματική δέσμη φωτός (laser) προσπίπτει σε ένα υλικό (αέριο, υγρό ή στερεό) τότε ένα ποσοστό αυτής διέρχεται μέσω του υλικού, ένα ποσοστό απορροφάται, ένα ποσοστό ανακλάται και ένα ποσοστό σκεδάζεται σε τυχαίες γωνίες, με ένταση σημαντικά χαμηλότερη

από την προσπίπτουσα. Το ποσοστό που συμμετέχει σε κάθε διαδικασία εξαρτάται από τις οπτικές ιδιότητες του υλικού.

Εάν η ελαστικά σκεδαζόμενη ακτινοβολία προέρχεται από κέντρα σκέδασης με διαστάσεις πολύ μικρότερες του μήκους κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας όπως είναι τα μόρια, η σκέδαση ονομάζεται Rayleigh. Έτσι, η σκέδαση γίνεται σημαντική όταν το μήκος κύματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας είναι αρκετά μεγαλύτερο από τη διάμετρο των μορίων και οφείλεται στην ηλεκτρική πολωσιμότητα αυτών [45].

Εάν όμως, η μονοχρωματική δέσμη φωτός η οποία προσπίπτει σε μία ουσία, εξέρχεται κάθετα από την αρχική της διεύθυνση και δεν είναι μονόχρωμη αλλά περιέχει και άλλες ακτινοβολίες, με ελαφρώς μετατοπισμένα μήκη κύματος σκεδαζόμενης ακτινοβολίας, διαφορετικών συχνοτήτων (μερική μεταβολή συχνότητας και φάσης της διερχόμενης ακτινοβολίας), τότε το φαινόμενο αυτό ονομάζεται ανελαστική σκέδαση. Αυτό συμβαίνει όταν σε ένα υλικό προσπέσει δέσμη ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με μήκος κύματος διαφορετικό από αυτό στο οποίο απορροφά. Η σκέδαση αυτή είναι εντελώς διαφορετική από τη συνήθη ελαστική, αρκετά ασθενέστερη καθώς είναι ένα σπάνιο φαινόμενο με εξαιρετικά μικρή πιθανότητα να συμβεί (~ 1 φωτόνιο Raman στα 10^8 σκεδαζόμενα φωτόνια) σε σύγκριση με τη σκέδαση Rayleigh και συνήθως παρατηρείται σε διευθύνσεις κάθετες προς την προσπίπτουσα ακτινοβολία [46]. Λαμβάνει χώρα κατά την χρήση ακτινοβολίας υψηλής έντασης και σημειώνεται ότι οι διαφορές μήκους κύματος και συχνότητας μεταξύ ελαστικής και ανελαστικής σκέδασης εξαρτάται από τη χημική δομή του μορίου που σκεδάζει την ακτινοβολία και προσφέρει πληροφορίες σχετικά με τη σύστασή του.

Στη παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται συνοπτικά η αρχή της ελαστικής και ανελαστικής σκέδασης όταν αναλύονται βιολογικά δείγματα με τη χρήση φασματοσκοπίας Raman.



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση της σκέδασης του φωτός μετά την έκθεση ενός δείγματος σε μονοχρωματικό φως *laser*. Όταν τα φωτόνια αλληλεπιδρούν με τους χημικούς δεσμούς μέσα στο βιολογικό δείγμα, ηλεκτρόνια εξέρχονται σε κάθετα ενεργειακά επίπεδα. Αυτά τα βιολογικά μόρια επιστρέφουν στα αρχικά τους ενεργειακά επίπεδα με την εκπομπή φωτονίων γνωστή ως ελαστική σκέδαση ή αλλιώς σκέδαση Rayleigh ή μπορεί να υποστούν μια ενεργειακή αλλαγή και να επιστρέψουν σε χαμηλότερα (Stokes) ή υψηλότερα (Anti-Stokes) ενεργειακά επίπεδα. Η Stokes Raman σκέδαση είναι πιο έντονη από την Anti-Stokes σκέδαση [47].

Κατά την ανάλυση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας, παρατηρείται ότι εκτός από τη συχνότητα της προσπίπτουσας (ω_0), ανιχνεύεται και μικρή ένταση σε συχνότητες $\omega_s = \omega_0 \pm \omega_N$. Στη παραπάνω σχέση οι συχνότητες ω_N συνδέονται με τις στοιχειώδεις διεγέρσεις του εκάστοτε υλικού.

Πιο αναλυτικά, η σκέδαση Raman οφείλεται στη μεταφορά ενέργειας μεταξύ φωτονίων και μορίων κατά την αλληλεπίδραση τους και εξηγείται μέσω της κβάντωσης των ενεργειακών επιπέδων. Η μεταφορά ενέργειας επιτυγχάνεται μέσα από τις διαδικασίες απορρόφησης ή της προσφοράς ενέργειας. Με άλλα λόγια όταν η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία αλληλεπιδρά με τα μόρια και η προσπίπτουσα ακτινοβολία έχει συχνότητα τέτοια ώστε να μην ευνοείται η άμεση δονητική ή ηλεκτρονιακή μετάπτωση, το μόριο αρχικά διεγείρεται σε μια εικονική ηλεκτρονιακή ασταθή κατάσταση (virtual state) και έτσι μπορεί να αποκτήσει οποιαδήποτε τιμή ενέργειας από ένα άπειρο πλήθος τιμών που αντιστοιχούν στις εικονικές καταστάσεις. Οι ασταθείς αυτές ηλεκτρονιακές καταστάσεις βρίσκονται μεταξύ της θεμελιώδους και της πρώτης διεγερμένης ηλεκτρονιακής κατάστασης. Όμως, το μόριο δε μπορεί να παραμείνει σε αυτή τη κατάσταση για μεγάλο διάστημα, καθώς είναι ηλεκτρονικά ασταθής και επιστρέφει στην ενεργειακά θεμελιώδη [48]. Σημειώνεται ότι μια εικονική κατάσταση έχει ενέργεια μικρότερη από μια πραγματική ηλεκτρονιακή μετάπτωση, ενώ οι διαδικασίες διέγερσης και αποδιέγερσης συμβαίνουν σχεδόν ταυτόχρονα.

Η επιστροφή αυτή στη θεμελιώδη κατάσταση (αποδιέγερση) επιτυγχάνεται με τρεις τρόπους. Στη πρώτη περίπτωση, το μόριο επιστρέφει στο ενεργειακό επίπεδο στο οποίο βρισκόταν και πριν την ακτινοβόληση. Στη περίπτωση αυτή η σκέδαση αυτή ονομάζεται ελαστική ή σκέδαση Rayleigh και κατά την οποία η σκεδαζόμενη ακτινοβολία δεν υφίσταται μεταβολή ενέργειας σε σχέση με τη προσπίπτουσα και διατηρεί το ίδιο μήκος κύματος κατά την επιστροφή της στο ενεργειακό επίπεδο που βρισκόταν πριν την ακτινοβόληση. Στις επόμενες περιπτώσεις το μόριο μπορεί να μην επιστρέφει στο αρχικό θεμελιώδες ενεργειακό επίπεδο, αλλά σε κάποιο από τα διεγερμένα δονητικά επίπεδα. Η σκέδαση Rayleigh είναι σημαντικά πιο πιθανή από τη σκέδαση Raman καθώς είναι πιθανότερη η μεταφορά ενέργειας σε μόρια που βρίσκονται ήδη στη θεμελιώδη κατάσταση και η επανεκπομπή της λόγω της επαναφοράς αυτών των μορίων στη θεμελιώδη κατάσταση.

Ακολουθώντας, στη δεύτερη περίπτωση αποδιέγερσης, το μόριο μετά τη σκέδαση καταλήγει σε ένα δονητικό επίπεδο της θεμελιώδους ηλεκτρονιακής κατάστασης, το οποίο χαρακτηρίζεται με ενέργεια υψηλότερη από αυτό που βρισκόταν αρχικά (το μόριο μετά την εικονική ασταθή κατάσταση στην οποία βρίσκεται μετά τη διέγερση επιστρέφει σε υψηλότερο ενεργειακό δονητικό επίπεδο της θεμελιώδους κατάστασης). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η σκεδαζόμενη ακτινοβολία να χαρακτηρίζεται από μικρότερη ενέργεια, συνεπώς και μικρότερη συχνότητα σε σχέση με τη προσπίπτουσα. Η ανελαστική σκέδαση αυτή ονομάζεται Stokes.

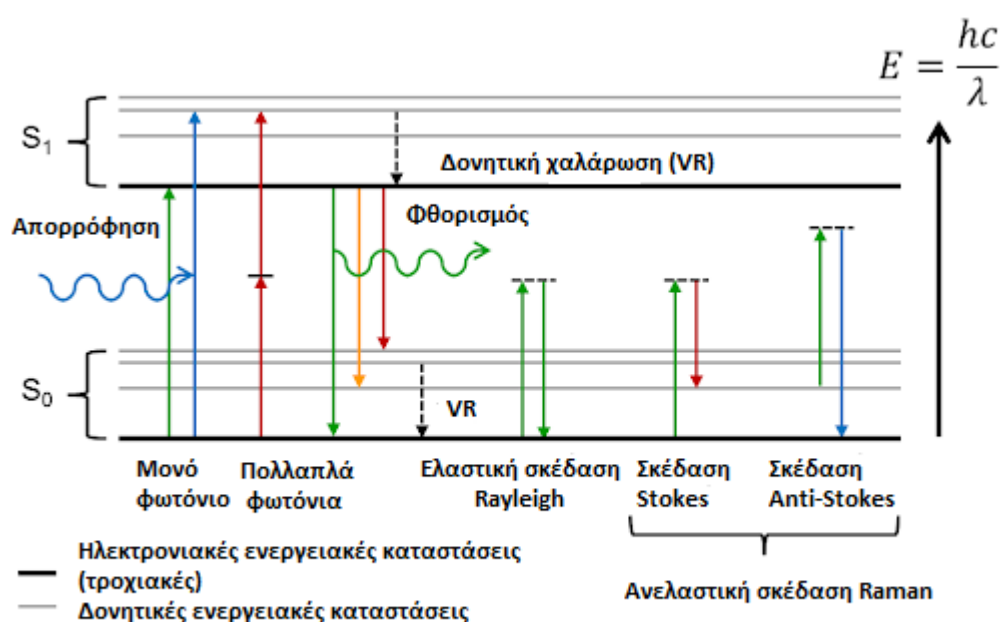
Τέλος, στη τελευταία περίπτωση, το μόριο μεταπίπτει σε δονητικό επίπεδο χαμηλότερης ενέργειας από το αρχικό και η σκεδαζόμενη ακτινοβολία χαρακτηρίζεται από υψηλότερη ενέργεια και μεγαλύτερη συχνότητα από την προσπίπτουσα (το μόριο πριν την ακτινοβόληση ήταν διεγερμένο και βρισκόταν σε υψηλότερο ενεργειακό δονητικό επίπεδο της θεμελιώδους κατάστασης και ακολουθώντας αποδιεγείρεται από την εικονική κατάσταση στη θεμελιώδη). Η μετατόπιση αυτή ονομάζεται Anti-Stokes. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι σε θερμοκρασία δωματίου ο αριθμός των μορίων που βρίσκονται αρχικά διεγερμένα σε αυτή τη κατάσταση είναι πολύ μικρός, με αποτέλεσμα το σήμα Anti – Stokes να είναι μικρό. Αυτό εξηγείται και μέσω της κατανομής Boltzmann, η οποία προβλέπει ότι ο πληθυσμός μιας κατάστασης μειώνεται εκθετικά με την ενέργεια της κατάστασης και σε χαμηλές θερμοκρασίες μόνο οι χαμηλότερες ενεργειακές καταστάσεις έχουν σημαντικό πληθυσμό. Έτσι, είναι δύσκολο να υπάρχει μεγάλος αριθμός διεγερμένων μορίων τα οποία μετά την αλληλεπίδραση θα αποδιεγερθούν και επιστρέψουν στην θεμελιώδη κατάσταση.

Φθορισμός στη σκέδαση Raman

Ο φθορισμός δημιουργείται όταν η προσπίπτουσα ακτινοβολία μεγάλης ενέργειας διεγείρει το υλικό σε υψηλότερη ενεργειακή στάθμη και στη συνέχεια

αποδιεγείρεται εκπέμποντας ακτινοβολία. Με άλλα λόγια, είναι το φαινόμενο κατά το οποίο μία φωτιζόμενη ουσία από μια φωτεινή δέσμη εκπέμπει ακτινοβολία του ίδιου μήκους κύματος με την ακτινοβολία που απορροφάει από τη δέσμη και είναι συνήθως 10^3 και 10^{11} φορές ισχυρότερος από τη συντονισμένη και μη συντονισμένη σκέδαση Raman αντίστοιχα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να επηρεάζεται η μορφή του φάσματος Raman και οι κορυφές να καλύπτονται από το φθορισμό και μερικές φορές να υπάρχει αλληλοεπικάλυψη κορυφών. Λύση σε αυτό το πρόβλημα αποτελεί η χρήση μικρής ενέργειας φωτονίων όπου η σκεδαζόμενη ακτινοβολία θα είναι πολύ μικρότερης έντασης και άρα ο λόγος σήματος προς τον αντίστοιχο θόρυβο θα είναι αρκετά χαμηλός και το υπόβαθρο δεν θα αποτελεί βασικό πρόβλημα. Η χρήση ενός laser μικρού μήκους κύματος βελτιώνει την ένταση του σήματος Raman και παρέχεται καλύτερη αναλογία σήματος προς το θόρυβο. Όταν η ακτινοβολία βρίσκεται στη περιοχή του υπερύθρου, η ενέργεια της ακτινοβολίας είναι μικρή με αποτέλεσμα να μη διεγείρεται το υλικό σε ανώτερη ηλεκτρονική κατάσταση, με αποτέλεσμα να αποφεύγεται ταυτόχρονη εμφάνιση φθορισμού.

Συγκεκριμένα, τα βιολογικά δείγματα, παρουσιάζουν μεγαλύτερο φθορισμό και το υπόβαθρο του δημιουργείται από τα δείγματα καθώς φθορίζονται τα μόρια [49].

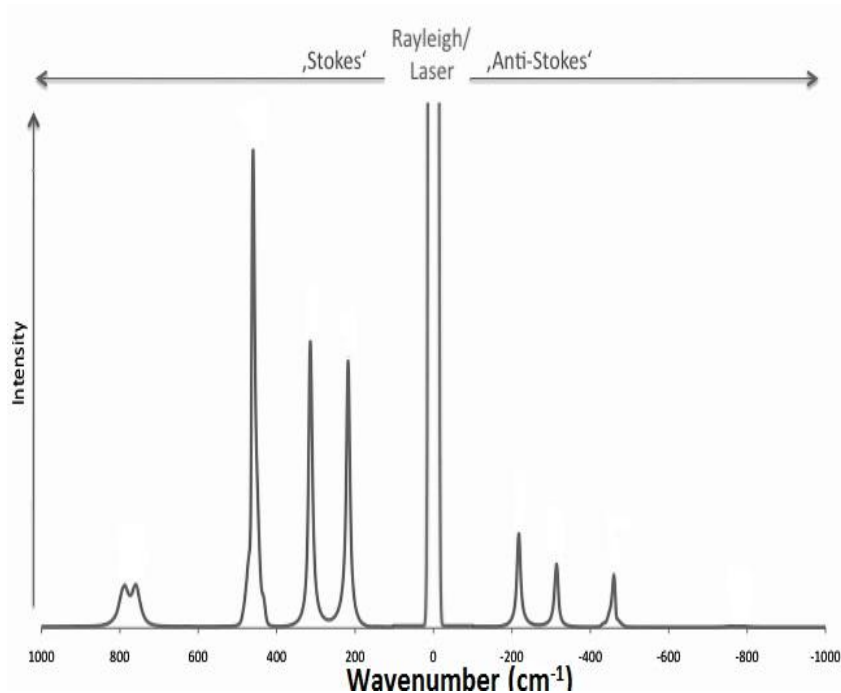


Εικόνα 10: Συνοπτική απεικόνιση των διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα κατά το Φαινόμενο Raman και η παραγωγή του φθορισμού.

Γραμμές Raman

Οι νέες γραμμές στο φάσμα της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας ονομάζονται γραμμές Raman και συνολικά αποτελούν το φάσμα Raman του υλικού που εξετάζεται. Οι γραμμές Raman με συχνότητες της μορφής $\omega_s = \omega_0 - \omega_N$, ονομάζονται γραμμές Stokes και προκύπτουν από την διαδικασία κατά την οποία ένα φωτόνιο απορροφάται και σκεδάζεται ένα φωτόνιο μικρότερης ενέργειας από το αρχικό. Αντίθετα, οι γραμμές με συχνότητες της μορφής $\omega_s = \omega_0 + \omega_N$ ονομάζονται γραμμές Anti-Stokes και προκύπτουν από τη διαδικασία απορρόφησης ενός φωτονίου και τη δημιουργία ενός φωτονίου ενέργειας μεγαλύτερης από το αρχικό καθώς τα μόρια επανέρχονται στην αρχική θεμελιώδη κατάσταση. Η διαφορά ενέργειας και συχνοτήτων μεταξύ προσπίπτουσας και σκεδαζόμενης ακτινοβολίας, αντιστοιχεί στην ενεργειακή διαφορά μεταξύ των δονητικών επιπέδων της αρχικής και τελικής κατάστασης και είναι χαρακτηριστική για κάθε είδος μορίου, με τη διαφορά αυτή της ενέργειας να αντιστοιχεί στην ενέργεια των συμμετεχόντων οπτικών φωνονίων. Συνήθως η ενέργεια του προσπίπτοντος φωτός από τη πηγή διέγερσης (laser) κυμαίνεται από 1.2 έως 3 eV και η ενέργεια της στοιχειώδους διέγερσης από 1 έως 250 meV ($10\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$).

Επιπλέον ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει ότι η Stokes Raman σκέδαση είναι πιο έντονη από την Anti-Stokes και για αυτό συνηθίζεται να καταγράφεται και να μελετάται μόνο η περιοχή Stokes του φάσματος. Αυτό συμβαίνει γιατί ο πληθυσμός του θεμελιώδους δονητικού επιπέδου είναι πολύ μεγαλύτερος από τα υπόλοιπα με αποτέλεσμα τα περισσότερα φωτόνια να μπορούν μόνο να διεγείρουν μια κανονική μορφή δόνησης, με επακόλουθο να μπορούν να υποστούν μόνο μείωση της ενέργειάς τους και έτσι τα φάσματα Raman εμφανίζουν στη περιοχή των γραμμών Stokes κορυφές με ισχυρότερες εντάσεις [50]. Με άλλα λόγια η αρχική κατάσταση από την οποία ξεκινάει το μόριο στη σκέδαση Stokes είναι πολύ πιο πιθανή σε σχέση με την σκέδαση Anti-Stokes. Η αναλογία της έντασης των Anti-Stokes και Stokes γραμμών σε οποιαδήποτε δονητική συχνότητα αποτελεί μέτρο της θερμοκρασίας, καθώς ο λόγος των εντάσεων αυξάνει με την αύξηση της θερμοκρασίας επειδή υπό αυτές τις συνθήκες, ένα μεγάλο μέρος των μορίων θα βρίσκεται στη πρώτη δονητική διεγερμένη κατάσταση. Από την άλλη πλευρά, το φάσμα των Anti-Stokes μπορεί να χρησιμοποιηθεί όταν το φάσμα των Stokes δεν είναι άμεσα παρατηρήσιμο, λόγω κακής αποδοτικότητας του φασματογράφου.



Εικόνα 11 : Φάσμα Raman στο οποίο διακρίνονται οι περιοχές Stokes, Rayleigh, Anti-Stokes.

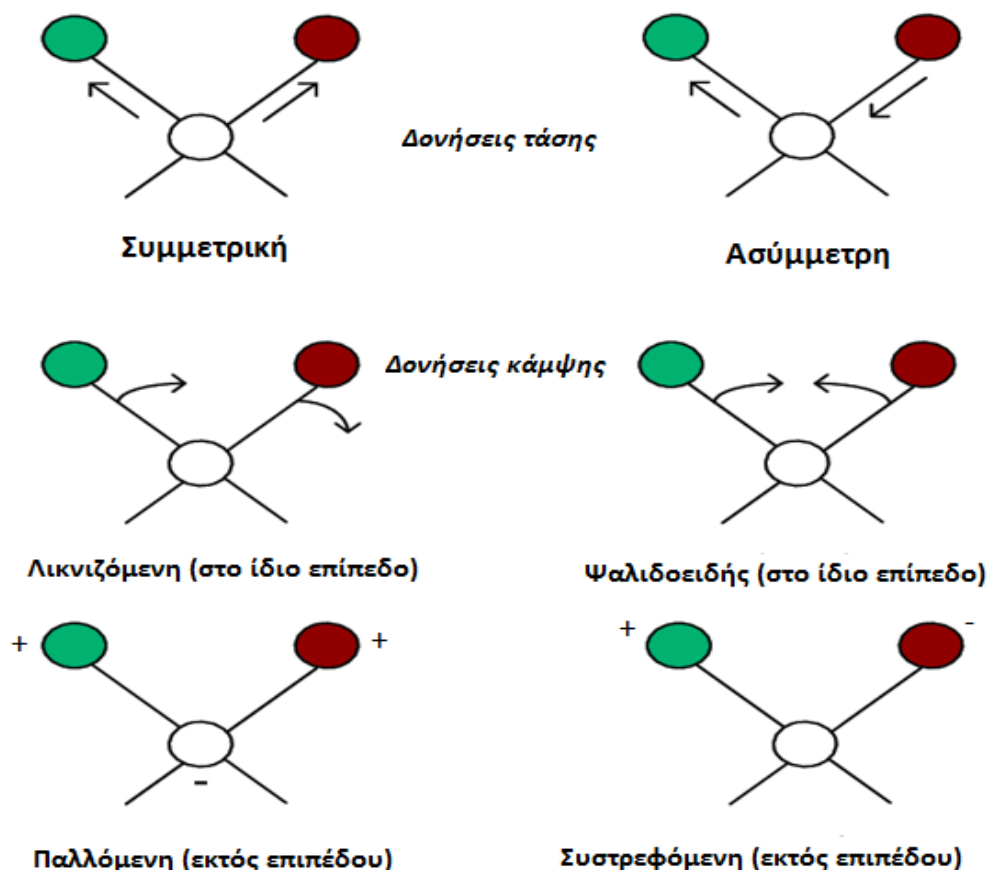
Μετατοπίσεις Raman και δονήσεις

Σύμφωνα με τους νόμους της κβαντομηχανικής, κατά τις ανελαστικές συγκρούσεις φωτονίων και μορίων, τα μόρια χάνουν ή κερδίζουν ποσά ενέργειας. Η διαφορά της ενέργειας, ΔE , μεταξύ των δύο επιτρεπόμενων ενεργειακών καταστάσεων, αντιπροσωπεύει τις αλλαγές στην περιστροφική και την δονητική ενέργεια του μορίου. Με αυτό τον τρόπο, αναγνωρίζοντας δηλαδή τις μετατοπίσεις Raman στο φάσμα της ανελαστικά σκεδαζόμενης ακτινοβολίας του, αναγνωρίζονται και οι διάφοροι τύποι δόνησης των δεσμών του μορίου, με αποτέλεσμα τη λήψη χρήσιμων πληροφοριών σχετικά με την χημική σύσταση του δείγματος.

Κατά τη σκέδαση Raman το μήκος κύματος της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας μετατοπίζεται. Οι μετατοπίσεις αυτές της συχνότητας, οι οποίες ονομάζονται μετατοπίσεις Raman αποδίδονται σε συγκεκριμένες μοριακές δονήσεις και καταγράφονται σε ένα φάσμα. Το φάσμα αυτό, όπως παρουσιάστηκε παραπάνω, είναι μια γραφική παράσταση της απόκρισης του φωτοπολλαπλασιαστή σε συνάρτηση με τη διαφορά των συχνοτήτων. Η συχνότητα ω εκφράζει τον αριθμό των δονήσεων των μορίων στη μονάδα του χρόνου. Η διαφορά ενέργειας μεταξύ των δονητικών επιπέδων είναι χαρακτηριστική για κάθε μόριο, όπως και το αντίστοιχο φάσμα Raman, παρέχοντας χημικές και δομικές πληροφορίες για το εξεταζόμενο δείγμα [51-54].

Οι διαφορετικοί τύποι δόνησης ενός μορίου μπορούν να ταυτοποιηθούν με την αναγνώριση των μετατοπίσεων Raman στο φάσμα της ανελαστικά σκεδαζόμενης ακτινοβολίας του. Υπάρχουν δύο βασικές μορφές δονήσεων οι οποίες αξιοποιούνται από τη φασματοσκοπία Raman και αυτές είναι οι δονήσεις τάσης (stretching) και οι δονήσεις κάμψης (bending).

- **Δονήσεις τάσης (stretching):** Τα άτομα του δεσμού διαδοχικά πλησιάζουν και απομακρύνονται μεταξύ τους, καθώς οι αποστάσεις μεταξύ των ατόμων κατά μήκος του δεσμού τους μεταβάλλονται διαρκώς. Οι δονήσεις αυτές διακρίνονται σε δύο υποκατηγορίες τη συμμετρική και την ασύμμετρη δόνηση τάσης. Στην πρώτη περίπτωση η ισχύς της πρόσδεσης του ηλεκτρονίου στην ελάχιστη διαπυρηνική απόσταση διαφέρει από εκείνη στη μέγιστη. Με αυτό τον τρόπο μεταβάλλεται η πολωσιμότητα και είναι ενεργή η δόνηση Raman. Από την άλλη πλευρά, στην ασύμμετρη δόνηση, δεν υπάρχει συνολική μεταβολή της πολωσιμότητας κατά την έκταση και συμπίεση του δεσμού του μορίου, καθώς κατά την επέκταση του δεσμού τα ηλεκτρόνια είναι ευκολότερα πολώσιμα και λιγότερο κατά τη συμπίεση και για το λόγο αυτό χαρακτηρίζεται ως ανενεργή.
- **Δονήσεις κάμψης (bending) :** Παρατηρείται αλλαγή στη γωνία μεταξύ δυο δεσμών και διακρίνεται σε *ψαλιδοειδής* (scissoring), *λικνιζόμενη* (rocking), *παλλόμενη* (wagging) ή *συστρεφόμενη* (twisting).



Εικόνα 12: Δονήσεις τάσης και κάμψης.

Το φαινόμενο Raman παρατηρείται κυρίως σε ομοιοπολικούς δεσμούς και σε πολύ μικρότερο βαθμό σε ιοντικούς. Ο λόγος που συμβαίνει αυτό είναι ότι για να προκληθεί σκέδαση Raman σε ένα μόριο, η προϋπόθεση που πρέπει να ικανοποιείται είναι η αλλαγή στη πολωσιμότητα του, δηλαδή η παραμόρφωση του εξωτερικού φλοιού του μορίου υπό την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου. Ένα μόριο είναι ικανό να πολώνεται, δηλαδή να υφίσταται το διαχωρισμό των αρνητικών και θετικών φορτισμένων κέντρων του υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου. Η πολωσιμότητα διαφέρει ανάλογα με τον τύπο της δόνησης και εξαρτάται από το πόσο ισχυρά έλκονται τα ηλεκτρόνια από τον πυρήνα. Έτσι λοιπόν μόνο σε αυτούς τους δεσμούς όπου εμφανίζεται αυτό το φαινόμενο πραγματοποιείται σκέδαση Raman. Ακόμα, η ένταση ή η ισχύς μιας κορυφής Raman εξαρτάται από παράγοντες όπως είναι η πολωσιμότητα του μορίου και η ένταση της πηγής. Συγκεκριμένα, απουσία απορρόφησης η ένταση της εκπομπής Raman είναι ανάλογη της τέταρτης δύναμης της συχνότητας της πηγής.

2.3.Κλασσική περιγραφή του φαινομένου Raman

Η κλασσική περιγραφή του φαινομένου Raman στηρίζεται στη θεμελιώδη έννοια της πολωσιμότητας (polarizability) των υλικών και παρουσιάζει σημαντικές ομοιότητες με γνωστά φαινόμενα της κυματικής και του ηλεκτρομαγνητισμού. Μπορεί να ερμηνευτεί ως εκπομπή ακτινοβολίας λόγω της ταλάντωσης διπόλου επαγομένου από την επίδραση εξωτερικά επιβαλλόμενου ηλεκτρομαγνητικού πεδίου και την ανάπτυξη διπολικής ροπής σε αυτό. Τα μόρια περιγράφονται ως ένα σύνολο ατόμων που εκτελούν απλές αρμονικές δονήσεις χωρίς να λαμβάνονται υπόψη η ποσοτικοποίηση των περιστροφικών και δονητικών ενεργειακών επιπέδων.

Με άλλα λόγια, μία μονοχρωματική δέσμη φωτός laser, με συχνότητα ω_i και πόλωση e_i προσπίπτει στο δείγμα. Κατά την αλληλεπίδραση του φωτός με το υλικό μέσο, η προσπίπτουσα ακτινοβολία ανταλλάσσει ενέργεια και ορμή. Στη συνέχεια το μέσο ακτινοβολεί πάλι την σκεδαζόμενη ακτινοβολία συχνότητας $\omega_s \neq \omega_i$ και πόλωσης e_s . Στο υλικό, λοιπόν, που βρίσκεται υπό την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου E , σε ένα ομογενές και ισότροπο μέσο αναπτύσσεται μία επαγόμενη πόλωση, (polarization = P , διπολική ροπή ανά μόριο, ανά μονάδα όγκου, ή ανά μοναδιαία κυψελίδα, ανάλογα με το είδος του εξεταζόμενου υλικού συστήματος), η οποία είναι ανάλογη του ηλεκτρικού πεδίου σύμφωνα με τη γραμμική σχέση :

$$\vec{P} = a\vec{E} \quad (1)$$

όπου a : η πολωσιμότητα (ανά μόριο, ανά μονάδα όγκου, ή ανά μοναδιαία κυψελίδα, αντίστοιχα), η οποία εκφράζει την επιδεκτικότητα του μορίου στην πόλωση, δηλαδή εκφράζει την ευκολία με την οποία τα μοριακά τροχιακά μπορούν να παραμορφωθούν κατά την αλληλεπίδραση της ακτινοβολίας με το ηλεκτρονικό νέφος του δεσμού ενός μορίου και να αποκτήσουν μορφή διπόλου [55]. Η μεταβολή της πόλωσης εξαρτάται από τη συμμετρία του μέσου καθώς και από τη γωνία πρόσπτωσης της ακτινοβολίας και το επίπεδο πόλωσης αυτής. Ο συντελεστής της πολωσιμότητας a είναι ένας τανυστής δεύτερης τάξης, όπου στην περίπτωση των ισότροπων υλικών εκφυλίζεται σε ένα βαθμωτό μέγεθος ή ισοδύναμα γινόμενο ενός βαθμωτού μεγέθους με έναν διαγώνιο ταυτοτικό τανυστή δεύτερης τάξης.

Πιο αναλυτικά, κατά το φαινόμενο Raman, η διεγείρουσα ακτινοβολία δημιουργεί ένα εναλλασσόμενο μονοχρωματικό ηλεκτρομαγνητικό κύμα. Το κύμα αυτό περιγράφεται με δύο ανύσματα κάθετα μεταξύ τους, το ένα από τα οποία αποτελεί την ηλεκτρική συνιστώσα (άξονας x) και το άλλο τη μαγνητική (άξονας y). Από εδώ και στο εξής θα γίνεται αναφορά μόνο στο πρώτο, αφού δεν πρόκειται να μας απασχολήσουν μαγνητικά φαινόμενα. Έτσι, το ηλεκτρικό πεδίο που προέρχεται από το κύμα, μία δεδομένη χρονική στιγμή, είναι της μορφής : $\vec{E} = \vec{E}_0 \sin(\omega_i t)$. Επομένως, η σχέση (1) γίνεται:

$$\vec{P} = a\vec{E_0}\sin(\omega_i t) \quad (2)$$

Αυτή η ταλαντούμενη πόλωση έχει ως αποτέλεσμα την δευτερογενή εκπομπή (ή σκέδαση) ακτινοβολίας με συχνότητα ω_i της διεγείρουσας ακτινοβολίας. Η ακτινοβολία αυτή είναι η ελαστική σκέδαση Rayleigh.

Στην περίπτωση που το υλικό σύστημα εκτελεί και μία εσωτερική κίνηση, όπως για παράδειγμα έναν κανονικό τρόπο ταλάντωσης με συχνότητα ω_{01} , η κίνηση αυτή θα έχει επίπτωση και στην πολωσιμότητα, η οποία, σε αυτή την περίπτωση, γράφεται ως:

$$\alpha = \alpha_0 + \beta \sin(\omega_{01} t) \quad (3)$$

Όπου α είναι η πολωσιμότητα του συστήματος στη διαπυρηνική απόσταση ισορροπίας (r_{eq}) και β είναι το πλάτος μεταβολής της πολωσιμότητας εξαιτίας του κανονικού τρόπου ταλάντωσης.

Η πολωσιμότητα αποτελεί συνάρτηση της απόστασης των πυρήνων που συμμετέχουν στο δεσμό σύμφωνα με τη σχέση :

$$\alpha = \alpha_0 + (r - r_{eq}) \left(\frac{\partial \alpha}{\partial r} \right) \quad (4)$$

Στη παραπάνω σχέση r είναι η απόσταση σε οποιαδήποτε στιγμή.

Από την αντικατάσταση της (3) στη σχέση (2) προκύπτει ότι :

$$\vec{P} = (\alpha_0 + \beta \sin(\omega_{01} t))\vec{E_0}\sin(\omega_i t) = \alpha_0\vec{E_0}\sin(\omega_i t) + \beta\vec{E_0}\sin(\omega_{01} t)\sin(\omega_i t) \quad (5)$$

Όπου αναπτύσσοντας το γινόμενο των τριγωνομετρικών συναρτήσεων σε άθροισμα έχουμε :

$$\vec{P} = \alpha_0\vec{E_0}\sin(\omega_i t) + \frac{\beta\vec{E_0}}{2}[\cos(\omega_i - \omega_{01})t - \cos(\omega_i + \omega_{01})t] \quad (6)$$

Παρατηρούμε ότι η επαγόμενη πόλωση η οποία είναι χρονικά μεταβαλλόμενη, έχει υποστεί μία «κατά πλάτος διαμόρφωση», με συχνότητα ω_{01} , που οφείλεται στις εσωτερικές διεγέρσεις του υλικού συστήματος, στο οποίο προσπίπτει το Η/Μ κύμα. Η συχνότητα ω_{01} αντιστοιχεί στη μεταβολή της συχνότητας της προσπίπτουσας ακτινοβολίας σε σχέση με τη σκεδαζόμενη και αντιστοιχεί στην ενέργεια που απαιτείται για μια δονητική μετάπτωση. Επίσης, παρατηρούμε ότι το διαμορφωμένο Η/Μ κύμα, που ανιχνεύεται ως σκεδαζόμενη ακτινοβολία, περιέχει πλέον, εκτός από την συχνότητα ω_i της ελαστικής σκέδασης Rayleigh, και τις νέες συχνότητες, $(\omega_i - \omega_{01})$, $(\omega_i + \omega_{01})$, που αντιστοιχούν στις πλευρικές ζώνες Stokes και Anti-Stokes, της σκέδασης Raman και οι τρεις αυτοί όροι επηρεάζουν την πολωσιμότητα του δεσμού.

Από τη προηγούμενη ανάλυση μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η παρουσία των πλευρικών ζωνών μη-ελαστικής σκέδασης (Stokes και Anti-Stokes) εξαρτάται από την τιμή του β , και παύουν να παρατηρούνται όταν $\beta = 0$, καθώς μηδενίζεται ο δεύτερος όρος της σχέσης (6).

Για το λόγο αυτό εξετάζεται η εξάρτηση του β από την φύση της εσωτερικής κίνησης, η οποία διαμορφώνει την πολωσιμότητα με την δική της συχνότητα.

Έτσι, λοιπόν, αναπτύσσεται η σχέση $\alpha = \alpha_0 + \beta \sin(\omega_{01}t)$, σε ένα ανάπτυγμα Taylor γύρω από τη τιμή ισορροπίας της πολωσιμότητας α_0 . Αυτό γίνεται στη περίπτωση που η μοριακή δόνηση επηρεάζει τη πολικότητα και εάν το πλάτος των δονήσεων είναι μικρό. Άρα, σε πρώτη τάξη ως προς τον κανονικό τρόπο ταλάντωσης $Q_1 = Q_{01} \sin(\omega_{01}t)$ έχουμε :

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_1}\right)_{Q_1=0} Q_1 = \alpha_0 + \left[\left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_1}\right)_{Q_1=0} Q_{01}\right] \sin(\omega_{01}t) \quad (7)$$

Και καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι $\beta = \left[\left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_1}\right)_{Q_1=0} Q_{01}\right]$ και εκφράζει τη μεταβολή της πολωσιμότητας του μορίου κατά τη διάρκεια της δόνησης των πυρήνων γύρω από τη θέση ισορροπίας.

Επομένως, συμπεραίνουμε ότι μόνο όταν η παράγωγος της πολωσιμότητας ως προς την κανονική συντεταγμένη είναι μη-μηδενική, δηλαδή όταν υπολογίζεται γύρω από το σημείο ισορροπίας, παρατηρείται στο φάσμα Raman ένας κανονικός τρόπος ταλάντωσης ως ζεύγος πλευρικών ζωνών στις συχνότητες $(\omega_i \pm \omega_{01})$. Για να συμβαίνει αυτό η πολωσιμότητα μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της δόνησης.

Η παραπάνω ανάλυση εξηγεί την εμφάνιση των πλευρικών ζωνών ανά ζεύγη και προβλέπει ότι για την παρατήρηση των αντιστοίχων ζωνών πρέπει να ισχύει η σχέση (7). Έτσι, επιβεβαιώνεται ότι για να παρατηρηθεί το φαινόμενο Raman θα πρέπει η προσπίπτουσα ακτινοβολία να προκαλεί μεταβολή στην πολωσιμότητα κάποιου δεσμού [43,48].

Από την μέχρι στιγμής ανάλυση, δεν προκύπτει η διαφορετική ένταση ανάμεσα στις δύο συμμετρικές ζώνες του ίδιου ζεύγους. Μία πληρέστερη περιγραφή που εξηγεί την διαφορά εντάσεων Stokes – Anti Stokes, για το ίδιο ζεύγος, καθώς και άλλα σημαντικά χαρακτηριστικά των φασμάτων, πρέπει να λαμβάνει υπόψη των κβαντικό χαρακτήρα του υλικού συστήματος, της ακτινοβολίας και της αλληλεπίδρασής τους [56].

2.4.Κβαντομηχανική περιγραφή του φαινομένου Raman

Όπως είδαμε προηγουμένως, η κλασική περιγραφή μας επιτρέπει την ποιοτική κατανόηση του φαινομένου Raman. Ο μηχανισμός του φαινομένου αναδεικνύεται πλήρως εάν μελετηθεί το φαινόμενο κβαντομηχανικά μέσω της ημικλασικής προσέγγισης ή προσέγγιση της διπολικής ροπής, η οποία απαιτεί την εφαρμογή της χρονικά εξαρτημένης θεωρίας διαταραχών. Η κβαντική θεωρία εξηγεί τη σχέση μεταξύ των μοριακών ιδιοτήτων και της σκέδασης Raman.

Η κβαντομηχανική προσέγγιση του φαινομένου Raman στηρίζεται στη θεώρηση της πρόκλησης διαταραχής στις κυματοσυναρτήσεις του μορίου που σκεδάζεται από το ηλεκτρικό πεδίο του προσπίπτοντος φωτός και στην εισαγωγή της έννοιας της επαγόμενης ροπής μετάπτωσης, P_{nm} , που σχετίζεται με τη μετάπτωση μεταξύ της αρχικής (n) και τελικής κατάστασης (m) και ορίζεται από τη παρακάτω σχέση :

$$P_{nm} = \int \Psi_m^* P \Psi_n d\tau \quad (8)$$

όπου P_{nm} είναι η επαγομένη διπολική ροπή, Ψ_m και Ψ_n είναι οι χρονικά ανεξάρτητες κυματοσυναρτήσεις της τελικής και αρχικής κατάστασης, ενώ το ολοκλήρωμα υπολογίζεται σε όλο το χώρο των συντεταγμένων στον οποίο είναι πιο πιθανές οι κυματοσυναρτήσεις.

Η σχέση στην οποία καταλήγει κανείς με βάση την κβαντομηχανική θεωρία είναι:

$$P_{nm} = \frac{1}{\hbar} \sum r \left[\frac{M_{nr}M_{rm}}{V_{rn}-V_0} + \frac{M_{nr}M_{rm}}{V_{rm}+V_0} \right] \quad (9)$$

όπου $\hbar$ είναι η σταθερά του Planck, r είναι οποιοδήποτε από τα ενεργειακά επίπεδα του μη διαταραγμένου μορίου, V_{rn} και V_{rm} είναι οι συχνότητες που αντιστοιχούν στις διαφορές μεταξύ των καταστάσεων που υποδηλώνουν οι δείκτες (ουσιαστικά είναι οι διαφορές μεταξύ των συχνοτήτων των αντίστοιχων καταστάσεων), M_{nr} και M_{rm} είναι οι αντίστοιχες ροπές μετάπτωσης [57]. Ακόμα ως J συμβολίζουμε την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου του προσπίπτοντος φωτός. Τα επίπεδα r αποτελούν τα ενδιάμεσα ή δυνητικά (virtual) και ο ρόλος τους είναι καθαρά βοηθητικός. Το τετράγωνο της επαγόμενης ροπής μετάπτωσης προσδιορίζει την ένταση της σκέδασης Raman κατά την επαγομένη μετάπτωση nm , σύμφωνα με την εξίσωση :

$$I_{nm} = C(V_0 + V_{nm})^4 P_{nm}^2 \quad (10)$$

Όπου C αποτελεί παγκόσμια σταθερά και είναι ίση με $\frac{64\pi^2}{3c^2}$, c είναι η ταχύτητα του φωτός. Η ολική ένταση ισούται με το γινόμενο της (10) με τον αριθμό των μορίων N_n που περιέχονται στο υπό μελέτη σύστημα στην αρχική του κατάσταση n . Η συχνότητα της σκεδάζουσας ακτινοβολίας είναι $\nu_0 + \nu_{nm}$. Όταν $n=m$, η κατάσταση του σκεδάζοντος μορίου παραμένει αμετάβλητη και έχουμε σκέδαση Rayleigh. Στην αντίθετη περίπτωση ($n \neq m$) έχουμε σκέδαση Raman.

Η διαφορά συχνοτήτων ν_{nm} ,

$$\nu_{nm} = \frac{E_n - E_m}{h}$$

είναι θετική, αν συμβαίνει μετάπτωση σε χαμηλότερη ενέργεια (γραμμή Anti-Stokes) ενώ είναι αρνητική εάν η μετάπτωση οδηγεί σε υψηλότερη ενέργεια (γραμμή Stokes). Επιπλέον, για τη παρατήρηση της σκέδασης Raman θα πρέπει να ικανοποιείται η συνθήκη η οποία αναφέρει ότι η ενέργεια του προσπίπτοντος φωτονίου $h\nu_0$ πρέπει να είναι μεγαλύτερη από την ενεργειακή διαφορά $E_m - E_n$ της τελικής και αρχικής ενεργειακής κατάστασης της πραγματικής μετάπτωσης.

Αν η συχνότητα ν_0 βρίσκεται πολύ κοντά σε μια συγκεκριμένη συχνότητα απορρόφησης ν_{rn} , τότε ο όρος που περιέχει τον παράγοντα $1/(\nu_{rn} - \nu_0)$ είναι σημαντικότερος για τον προσδιορισμό της έντασης. Στην πραγματικότητα η ένταση I_{nm} αυξάνεται σημαντικά καθώς η συχνότητα ν_0 προσεγγίζει τη συχνότητα απορρόφησης και σε αυτή την αρχή στηρίζεται το φαινόμενο συντονισμού Raman.

Εναλλακτικά μπορούμε να πούμε ότι σύμφωνα με τη κβαντική θεωρία το φαινόμενο Raman μπορεί να θεωρηθεί ως σύγκρουση μεταξύ των φωτονίων του σκεδαζόμενου φωτός των μορίων του υλικού [58]. Το μόριο υφίσταται αλλαγή στην ενέργεια μετά τη σύγκρουση, καθώς γίνεται ανταλλαγή ενέργειας μεταξύ του μορίου και του προσπίπτοντος φωτός. Τότε η νέα ενεργειακή κατάσταση του μορίου μετά τη σύγκρουση μπορεί να περιγραφεί από το νόμο της αρχής διατήρησης της ενέργειας :

$$E_\beta + \frac{1}{2}mv^2 + h\nu = E_q + \frac{1}{2}mv'^2 + h\nu'$$

Όπου v = η ταχύτητα του μορίου, m = η μάζα του μορίου πριν τη σύγκρουση με το φωτόνιο, E_β = η ενέργεια του μορίου πριν τη σύγκρουση, $h\nu$ = η ενέργεια του προσπίπτοντος φωτονίου, v' = η ταχύτητα του μορίου μετά τη σύγκρουση, E_q = η ενέργεια μετά τη σύγκρουση.

Μπορεί εύκολα να αποδειχθεί ότι η μεταβολή στη ταχύτητα του μορίου είναι αμελητέα. Έτσι οι παραπάνω εξισώσεις γράφονται :

$$E_\beta + h\nu = E_q + h\nu'$$

$$v' = \frac{v + (E_\beta - E_q)}{h}$$

$$v' = v + \Delta v$$

Παρατηρώντας τις παραπάνω σχέσεις συμπεραίνουμε ότι :

- Όταν $E_\beta = E_q$, η διαφορά της συχνότητας (μετατόπιση Raman) ισούται με μηδέν, καθώς $\frac{(E_\beta - E_q)}{h} = 0$. Αυτό σημαίνει ότι $\nu' = \nu$ και αναφέρεται στη μη τροποποιημένη γραμμή (unmodified line) κατά την οποία το μόριο απλά έκτρεψε το φωτόνιο χωρίς να λάβει ενέργεια από αυτό. Αυτή η σύγκρουση είναι ελαστική και ανάλογη με τη σκέδαση Rayleigh.
- Όταν $E_\beta > E_q$, τότε $\nu' > \nu$ το οποίο αναφέρεται στις Anti-stokes γραμμές. Αυτό σημαίνει ότι το μόριο ήταν προηγουμένως σε διεγερμένη κατάσταση και μετέφερε ένα μέρος της εσωτερικής του ενέργειας στο προσπίπτον φωτόνιο. Έτσι, το σκεδαζόμενο φωτόνιο έχει μεγαλύτερη ενέργεια.
- Όταν $E_\beta < E_q$, τότε $\nu' < \nu$, το οποίο αντιστοιχεί στις Stokes γραμμές. Το μόριο έχει απορροφήσει ένα ποσό ενέργειας από το φωτόνιο και συνεπώς το σκεδαζόμενο φωτόνιο έχει χάσει ενέργεια. Από τη τελευταία εξίσωση προκύπτει ότι η διαφορά συχνοτήτων $\nu - \nu'$ ανάμεσα στο προσπίπτον και σκεδαζόμενο φωτόνιο στο φαινόμενο Raman αντιστοιχεί στη χαρακτηριστική συχνότητα του μορίου, ν_c . Επομένως, η χαρακτηριστική συχνότητα εκφράζεται από τη σχέση :

$$\nu - \nu' = \pm \nu_c \approx \Delta \nu$$

2.5. Πλεονεκτήματα και περιορισμοί του φαινομένου

Η φασματοσκοπία Raman έχει αρκετά πλεονεκτήματα τα οποία την καθιστούν χρήσιμο εργαλείο στις σύγχρονες έρευνες. Συνοπτικά, αναφέρεται ότι είναι σε θέση να ανιχνεύσει λεπτές βιοχημικές μεταβολές σε βιολογικά δείγματα που περιέχουν χημικές και συνθετικές πληροφορίες. Πρώτα από όλα, είναι κατάλληλη μέθοδος για βιολογικά και ανόργανα δείγματα, είναι μη επεμβατική και έχουμε την ικανότητα να αναλύσουμε πολύπλοκα φάσματα εξαιτίας της εξαιρετικά υψηλής διακριτικής ισχύς του φαινομένου και τα δείγματα τα οποία χρησιμοποιούμε δε χρειάζονται κάποια ιδιαίτερη προετοιμασία πριν τη χρήση τους. Κατά τη φασματοσκοπία Raman το νερό παρουσιάζει ελάχιστη σκέδαση Raman, ενώ σε σύγκριση με τη φασματοσκοπία υπερύθρου, απορροφά έντονα την υπέρυθρη ακτινοβολία [59].

Όμως όπως οι περισσότερες πειραματικές τεχνικές έτσι και η φασματοσκοπία Raman παρουσιάζει κάποια μειονεκτήματα. Για παράδειγμα, εάν το δείγμα ακτινοβοληθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα, η επαγόμενη από το laser θέρμανση μπορεί να επιφέρει αφύγρανση του δείγματος και να προκαλέσει την αλλοίωση του. Ακόμα, ένα από τα κύρια μειονεκτήματα είναι η ύπαρξη του φαινομένου του φθορισμού, δηλαδή η παρεμβολή ισχυρού υποβάθρου.

2.6. Πειραματική διάταξη- Οργανολογία

Μία συνήθης πειραματική διάταξη καταγραφής φασμάτων Raman αποτελείται από τα παρακάτω μέρη :

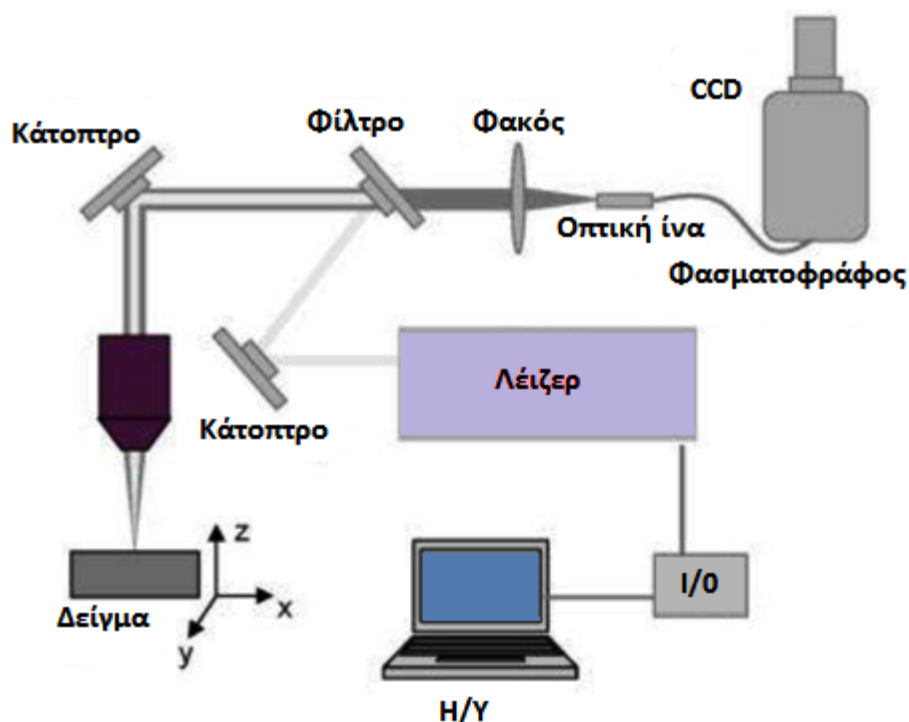
- Μία πηγή ακτίνων μονοχρωματικού φωτός laser, το οποίο μπορεί να ανήκει σε μήκη κύματος που αντιστοιχούν στο ορατό, υπέρυθρο ή υπεριώδες φάσμα ακτινοβολίας.
- Ένα σύστημα φωτισμού του υπό εξέταση δείγματος.
- Κάτοπτρα για την καθοδήγηση και εστίαση της δέσμης laser.
- Ένα οπτικό σύστημα συλλογής φωτός και μεταφοράς της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας στην είσοδο του φασματογράφου.
- Ένα σύστημα το οποίο εκλέγει και απομονώνει φωτόνια συγκεκριμένων μηκών κύματος (φίλτρα και μονοχρωματιστές).
- Ένας ανιχνευτής (διάταξη φωτοδιόδων ή κάμερα CCD).
- Ένα φασματόμετρο για την ανάλυση του φάσματος της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας [60].

Οι πηγές ακτίνων laser παρέχουν μια στενή μονοχρωματική ακτίνα φωτός, υψηλής ακρίβειας και σχετικά μεγάλης ενέργειας (σε συγκεκριμένη περιοχή συχνοτήτων), που μπορεί να εστιάσει σε αρκετά μικρό δείγμα και δεν προκαλούν έντονο φθορισμό. Παρέχεται η δυνατότητα μελέτης όχι μόνο στερεων δειγμάτων αλλά και υγρών. Τα φάσματα Raman στερεων δειγμάτων λαμβάνονται είτε με απευθείας ακτινοβολήση του δείγματος, είτε σε μερικές κοιλότητες γεμάτες με λειοτριβημένο δείγμα. Όσον αφορά τα υγρά δείγματα μπορούν να τοποθετηθούν σε κυψελίδες είτε σε αντικειμενοφόρους πλάκες, πλακίδια Si κ.α..

Η ελαστική σκέδαση (Rayleigh), αποτελεί κύριο πρόβλημα της φασματοσκοπίας Raman, καθώς σε μήκη κύματος κοντά σε αυτό του laser, η ένταση του φωτός που προέρχεται από τη σκέδαση Rayleigh είναι πολύ πιο έντονη από την ένταση της σκεδαζόμενης Raman ακτινοβολίας, με αποτέλεσμα να μην καταγράφεται το κατάλληλο φάσμα. Το πρόβλημα αυτό λύνεται με τη χρήση φίλτρων συμβολής, για την αποκοπή του φάσματος κοντά στη συχνότητα της δέσμης της διεγείρουσας πηγής (σε ένα εύρος της τάξης του $\pm 80 - 120 \text{ cm}^{-1}$ από το σημείο όπου εμφανίζεται η κορυφή), όπου και κυριαρχεί το ανεπιθύμητο φως ή με τη χρήση διπλών και τριπλών φασματόμετρων. Σε τέτοια συστήματα οι ενεργοί τρόποι ταλάντωσης στο φαινόμενο Raman ακόμα και με κυματαριθμούς αρκετά μικρούς ανιχνεύονται με ακρίβεια.

Στη φασματοσκοπία Raman τη κύρια επιλογή για την ανίχνευση φωτονίων και την ανάλυση του ασθενούς σήματος Raman αποτελούν οι ανιχνευτές συζευγμένων φορτίων CCD (Charged-Coupled Devices), καθώς παρέχουν φάσματα με υψηλή διακριτική ικανότητα και μπορούν να συλλάβουν σχεδόν το 60% των φωτονίων που προσπίπτουν σε αυτούς.

Τελικά, μετά την ενίσχυση, τα σήματα καταγράφονται σε οθόνη Η/Υ για επόμενη ανάλυση [61] και έτσι συντίθεται το φάσμα Raman.



Εικόνα 13: Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διάταξης καταγραφής φασμάτων Raman.

2.6.1. Πηγές Laser

Συνήθη laser που χρησιμοποιούνται στη φασματοσκοπία Raman είναι τα laser ιόντων Αργού, ιόντων Κρυπτού, He/Ne, laser διόδου και αυτά στερεάς κατάστασης όπως Nd:YAG (το οποίο εκπέμπει στο πράσινο) και NIR laser τα οποία εκπέμπουν σε υψηλές συχνότητες και χρησιμοποιούνται για τη μείωση του φθορισμού για δείγματα με υψηλή πιθανότητα φθορισμού [62].

Στη παρούσα εργασία τα φάσματα συλλέχθηκαν με laser διόδου 785 nm σε ανάλυση $\sim 4\text{-}5\text{ cm}^{-1}$ και χρόνος μέτρησης 6 sec.

Για τα laser διόδου σημειώνονται τα εξής :

Τα laser ημιαγωγών ή διοδικά laser έχουν γενικά μικρή ισχύ και συγκαταλέγονται στη κατηγορία των μαλακών laser (μερικές δεκάδες mW). Σε αυτή τη χαμηλή ισχύ η ακτινοβολία τους δε προκαλεί σημαντική θερμότητα, ούτε μακροχημικές ή ανατομικές μεταβολές στους ιστούς. Σημαντικό πλεονέκτημα είναι ότι παρέχουν τη δυνατότητα εκπομπής διαφορετικών μηκών κύματος, από ορατά μέχρι και υπέρυθρα, ανάλογα με το είδος της διόδου που χρησιμοποιείται.

Κεφάλαιο 3

Φασματοσκοπία Raman και ποιότητα οστών

Οι μεταβολές της συχνότητας που λαμβάνουν χώρα κατά τη φασματοσκοπία Raman χρησιμεύουν στην αξιολόγηση της σύνθεσης των ιστών, καθώς για παράδειγμα στη περίπτωση των οστών, αποτελούν σημαντική πηγή αντίθεσης μεταξύ των θέσεων των ανθρακικών και των φωσφορικών υποκαταστάσεων. Το ίδιο συμβαίνει και με την οργανική μήτρα, η οποία περιέχει πολλούς τρόπους δόνησης πρωτεϊνών, που αντιστοιχούν κυρίως σε συστατικά του κολλαγόνου όπως τα αμίδια (amide backbone), η δευτεροταγής δομή των πρωτεϊνών και η σύνθεση των πλευρικών αλυσίδων.

Συγκεκριμένα, η φασματοσκοπία Raman είναι αρκετά ευαίσθητη κυρίως στις δευτεροταγείς δομές στο μακρομόριο του κολλαγόνου: τη δομή της α -έλικας και της β -sheet. Η δευτεροταγής δομή αποκαλύπτει πληροφορίες για το πώς οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες αναδιπλώνονται, σχηματίζοντας τους αντίστοιχους σχηματισμούς. Μια μονή πολυπεπτιδική αλυσίδα η οποία περιέχει το μοτίβο γλυκίνη-X-Y σχηματίζει κυρίως δομή α -έλικας (άφθονη σε κολλαγόνο τύπου I και III). Όπου, για να σταθεροποιηθεί αυτή η δομή, συμβαίνει σύνδεση υδρογόνου ανάμεσα στην ομάδα $-NH$ ενός αμινοξέος και της ομάδας $C=O$ άλλου αμινοξέος μέσα στην ίδια αλυσίδα. Αντίθετα, πολυπεπτιδικές αλυσίδες οι οποίες μπορεί να είναι διατεταγμένες σε παράλληλη ή αντιπαράλληλη κατεύθυνση σχηματίζουν κυρίως μια β -sheet δευτεροταγή δομή (άφθονη σε κολλαγόνο τύπου IV και VII). Η δομή αυτή σταθεροποιείται από τη δέσμευση υδρογόνου ανάμεσα στην ομάδα $C=O$ ενός κλώνου και στην ομάδα $-NH$ ενός άλλου κλώνου. Είναι λογικό να αναμένονται περισσότερες παραλλαγές στη δομή β -sheet από ότι στη δομή της α -έλικας, καθώς τα ινίδια κολλαγόνου είναι μοναδικά στη παρουσία της δευτεροταγούς δομής.

Συνήθως, μόνο τα κύρια συστατικά του οστού παρατηρούνται φασματοσκοπικά, όπως τα ανόργανα φωσφορικά, τα ανθρακικά και η μήτρα του κολλαγόνου. Έχουν παρατηρηθεί ακόμα και τα λιπίδια του οστού καθώς και τα φωσφολιπίδια [63], παρόλο που αυτά συνήθως είναι μη ανιχνεύσιμα λόγω της απομάκρυνσης τους κατά τις διαδικασίες προετοιμασίας των δειγμάτων. Οι μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες συνεισφέρουν επίσης στο φάσμα του οστού [64], όμως η χαμηλή περιεκτικότητα τους και η φασματική ομοιότητα τους με το κολλαγόνο [64] καθιστούν δύσκολη την φασματοσκοπική απομόνωσή τους. Επιπλέον, τα φθορίζοντα στοιχεία του αίματος στο οστό προκαλούν έντονο υπόβαθρο, το οποίο μπορεί να υποβαθμίζει το φάσμα [65].

3.1.Φάσμα Raman οστών

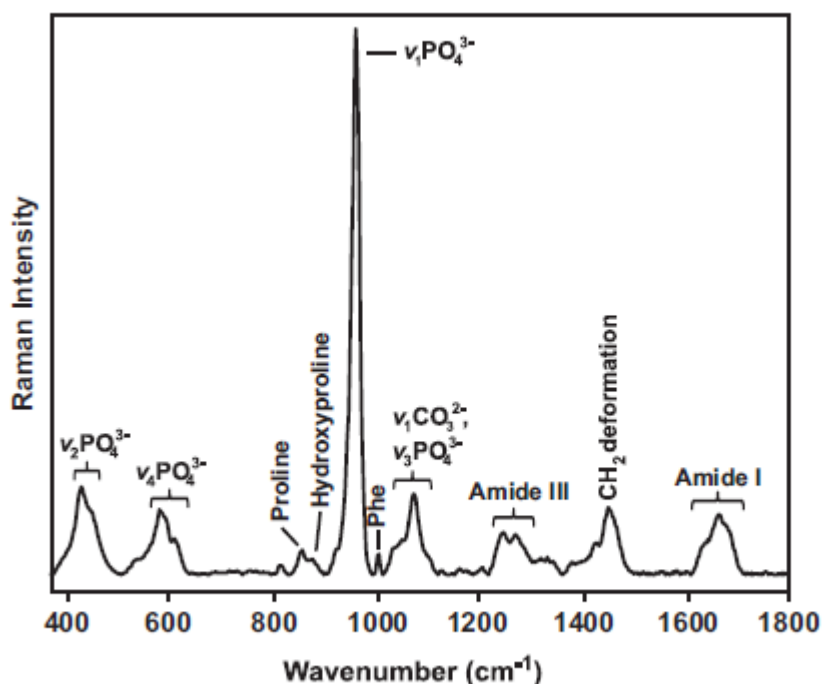
Σε ένα οστικό φάσμα, όπως προκύπτει μετά την επεξεργασία ενός οστικού ιστού με φασματοσκοπία Raman παρατηρούμε την εμφάνιση χαρακτηριστικών κορυφών σε συγκεκριμένους κυματάριθμους. Τα περισσότερα φάσματα αναφέρονται και αναλύονται στη περιοχή $400-1750\text{ cm}^{-1}$. Η περιοχή αυτή περιέχει χαρακτηριστικές κορυφές των ανόργανων δεσμών και της οργανικής μήτρας των οστών.

Οι περισσότερες κορυφές σε ένα φάσμα Raman οστού αποδίδονται στα φωσφορικά, ανθρακικά άλατα ή στο κολλαγόνο. Όμως, ακριβείς εντάσεις κορυφών σπάνια χρησιμοποιούνται στη φασματοσκοπία Raman καθώς αυτές επηρεάζονται από τη απόδοση της σκέδασης Raman αλλά και από άλλες οπτικές επιρροές, όπως η τραχύτητα του δείγματος, ο δείκτης διάθλασης και το μέγεθος των κρυστάλλων (grain size) [66]. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιούμε τις σχετικές εντάσεις των κορυφών (ή τα ολοκληρώματα αυτών) ώστε να ελαχιστοποιούμε τα λεγόμενα matrix effects που προκύπτουν από την ετερογένεια των βιολογικών δειγμάτων.

Φασματικές περιοχές οστικού ιστού

Τα φάσματα διακρίνονται σε τέσσερις φασματικές περιοχές, οι οποίες είναι :

- η περιοχή των προλινών – υδροξυπρολινών ($830-900\text{ cm}^{-1}$)
- η περιοχή του βιοαπατίτη – φωσφορικών ($900-1000\text{ cm}^{-1}$)
- η περιοχή των ανθρακικών ($1020 - 1120\text{ cm}^{-1}$)
- η περιοχή του αμιδίου I ($1600 - 1700\text{ cm}^{-1}$)



Εικόνα 14: Βασικές κορυφές ανόργανων και οργανικών συστατικών οστικού φάσματος. [67]

Η περιοχή των φωσφορικών του βιοαπατίτη χαρακτηρίζει την ανόργανη φάση του οστού, όπως και η περιοχή των ανθρακικών, ενώ για την οργανική φάση χρησιμοποιούνται οι περιοχές των προλινών – υδροξυπρολινών, καθώς και η περιοχή του Αμιδίου Ι του κολλαγόνου. Οι δεσμοί οι οποίοι σχετίζονται με το οργανικό τμήμα των οστών είναι εκείνοι που αντιστοιχούν κυρίως στο κολλαγόνο τύπου Ι. Επιπλέον, ενδιαφέρον για την οργανική φάση παρουσιάζει και η οξεία κορυφή γύρω στα 2940 cm^{-1} που αποδίδεται σε δονήσεις του C-H δεσμού.

Σημειώνεται ότι σημαντικό μέρος της έρευνας, είναι ο διαχωρισμός των κορυφών οι οποίες αλληλεπικαλύπτονται στις παραπάνω περιοχές, έτσι ώστε να μελετηθούν μόνο εκείνες που παρέχουν τις πιο χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με τη ποιότητα των οστών. Οι κορυφές οι οποίες παρουσιάζονται σε ένα φάσμα Raman ενός πολύπλοκου δείγματος, όπως για παράδειγμα ο οστίτης ιστός, είναι αποτέλεσμα της άθροισης κορυφών οι οποίες βρίσκονται αρκετά κοντά η μία με την άλλη, με συνέπεια την αλληλοεπικάλυψη τους. Έτσι, είναι απαραίτητη η ανάλυση των επιμέρους φασματικών περιοχών, όπως αναφέρθηκαν παραπάνω, και ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση αυτών.

Πιο αναλυτικά, όσον αφορά τις περιοχές και τις κορυφές οι οποίες εμφανίζονται σε αυτές προκύπτουν αντίστοιχα :

3.1.1. Περιοχή Προλινών – Υδροξυπρολινών

Η περιοχή αυτή εντοπίζεται στο οστικό φάσμα Raman στα $830\text{--}900\text{ cm}^{-1}$. Για τη διερεύνηση του κολλαγόνου υπάρχουν πολλές δονήσεις που μπορούν να εξεταστούν και αφορούν χαρακτηριστικές ομάδες των αμινοξέων του, όπως της προλίνης και της υδροξυπρολίνης. Η ανάλυση των κορυφών κάτω από την ευρεία μπάντα η οποία εμφανίζεται σε αυτό το διάστημα, οδηγεί στην ανάδειξη των κορυφών, με σχετικά υψηλή ένταση, που αντιστοιχούν στους κυματάριθμους 856 cm^{-1} και 876 cm^{-1} και οι οποίες κατ' επέκταση αντιστοιχούν στις δονήσεις των μορίων της προλίνης του κολλαγόνου (δονήσεις κάμψης $\delta(\text{C-C-H})$) και της υδροξυπρολίνης (δονήσεις έκτασης $\nu(\text{C-C})$) [67]. Τα αμινοξέα αυτά αποτελούν δύο από τα πιο συχνά δομικά συστατικά της τριπλής έλικας του κολλαγόνου τύπου I των οστών και συνεισφέρουν στη σταθερότητα [68]. Δόνηση της προλίνης εντοπίζεται και στα 920 cm^{-1} και 940 cm^{-1} . Η περιοχή των αμινοξέων προλίνης-υδροξυπρολίνης χρησιμοποιείται ως δείκτης ποιότητας του οστού για τον υπολογισμό του λόγου ανόργανων/οργανικών των συστατικών του.

3.1.2. Περιοχή φωσφορικών βιοαπατίτη

Η περιοχή αυτή εμφανίζεται στο φάσμα του οστού μεταξύ $900\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$. Παρατηρώντας τα φάσματα των οστών και σε συνδυασμό με την κατάλληλη επεξεργασία και στηριζόμενοι σε πληροφορίες της βιβλιογραφίας, εντοπίζεται η ύπαρξη τεσσάρων επιμέρους κορυφών οι οποίες αντιστοιχούν στους κυματάριθμους 920 cm^{-1} , 940 cm^{-1} , 947 cm^{-1} , 959 cm^{-1} .

Οι M. D Morris και συνεργάτες σε μελέτες άκρων ανθρώπινων αντιβραχίων αποδίδουν τη κορυφή στα 920 cm^{-1} , σε δόνηση έκτασης δεσμού $\nu(\text{C-C})$ του δακτυλίου της προλίνης του κολλαγόνου τύπου I του οστού [69]. Η κορυφή στα 940 cm^{-1} αποδίδεται στο κολλαγόνο και στη σκελετική δόνηση έκτασης $\nu(\text{C-C})$ της προλίνης.

Στη συνέχεια, εντοπίζεται η κορυφή στα 947 cm^{-1} , όπου σύμφωνα με τη βιβλιογραφία είναι χαρακτηριστική του βιοαπατίτη με ανθρακικές υποκαταστάσεις, αντιστοιχεί σε αρωματικές δονήσεις $\nu(\text{C-C})$ του απατίτη [70]. Επιπλέον, διακρίνουμε την ισχυρότερη κορυφή του φάσματος, περίπου στα 959 cm^{-1} , η οποία αποδίδεται στη συμμετρική δόνηση έκτασης $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ των φωσφορικών δεσμών του βιοαπατίτη (phosphate band) [71] και αποτελεί χαρακτηριστική κορυφή του ανθρακικού απατίτη.

Η κορυφή αυτή αποτελεί δείκτη ποιότητας του οστού με τον υπολογισμό του αντίστοιχου λόγου με τις τιμές που αντιστοιχούν στο Αμίδιο Ι ή στις προλίνες του κολλαγόνου [67].

3.1.3. Περιοχή ανθρακικών βιοαπατίτη

Ακολουθώς, η περιοχή η οποία αναλύεται είναι εκείνη των ανθρακικών του βιοαπατίτη, η οποία εντοπίζεται στα $1020-1120\text{ cm}^{-1}$ και αποτελεί χαρακτηριστική περιοχή για την αναγνώριση της ύπαρξης ανόργανων στοιχείων στο οστό. Στο φάσμα Raman του οστού εμφανίζονται με σχετικά μεγάλη ένταση οι κορυφές στους κυματάριθμους : 1003 cm^{-1} , 1035 cm^{-1} , 1048 cm^{-1} , 1060 cm^{-1} , 1070 cm^{-1} , 1076 cm^{-1} . Ενώ σε ορισμένες εργασίες έχουν αναφερθεί η παρουσία κορυφών στις τιμές 1065 cm^{-1} , 1086 cm^{-1} , 1096 cm^{-1} , 1101 cm^{-1} , 1108 cm^{-1} , 1124 cm^{-1} [72]. Από τις παραπάνω κορυφές ξεχωρίζει με τη μεγαλύτερη σχετική ένταση σε σύγκριση με τις υπόλοιπες, η πιο βασική κορυφή του άνθρακα (B-type carbonate), η συμμετρική οξεία κορυφή που εμφανίζεται περίπου στα 1070 cm^{-1} ($\nu_1\text{CO}_3^{2-}$) [67].

Η περιοχή των ανθρακικών έχει μελετηθεί, από τον Awonusi και την ερευνητική του ομάδα, οι οποίοι μελέτησαν τις διαφοροποιήσεις στη μορφή των φασμάτων Raman ανάλογα με το βαθμό υποκατάστασης των ανθρακικών ιόντων στο πλέγμα του απατίτη [73]. Σύμφωνα με τη παραπάνω εργασία, τα φάσματα δειγμάτων απατίτη με μηδενικό βαθμό υποκατάστασης ανθρακικών αντιπροσωπεύονται από κορυφές οι οποίες αποδίδονται σε δονήσεις ν_3 των φωσφορικών υποκαταστατών [73]. Όταν τις θέσεις υποκατάστασης στο πλέγμα του βιοαπατίτη αρχίζουν να καταλαμβάνουν ανθρακικά ιόντα, γίνεται η εμφάνιση μιας έντονης κορυφής περίπου στα 1070 cm^{-1} . Η σχετική ένταση της κορυφής αυτής είναι ανάλογη με το βαθμό υποκατάστασης στο κρυσταλλικό πλέγμα. Έτσι λοιπόν, με την αύξηση του βαθμού υποκατάστασης των ανθρακικών στο πλέγμα του βιοαπατίτη, παρατηρούμε μετακίνηση του μέγιστου της κορυφής προς τα δεξιά, με αποτέλεσμα οι τιμές της κορυφής να εντοπίζονται στο εύρος κυματάριθμων $1070-1074\text{ cm}^{-1}$. Η κορυφή στα 1070 cm^{-1} αποδίδεται στη δόνηση $\nu_1\text{CO}_3^{2-}$, συμμετρική δόνηση έκτασης (C-O) των ανθρακικών του απατίτη [74]. Η κορυφή αυτή βρίσκεται κοντά σε ένα συστατικό της κορυφής του φωσφόρου στα 1076 cm^{-1} ($\nu_3\text{PO}_4^{3-}$).

Επιπλέον, διάφορες μελέτες αποδίδουν κορυφές στη περιοχή των ανθρακικών, σε δονήσεις δεσμών του μορίου του κολλαγόνου [76]. Για παράδειγμα, η κορυφή που εντοπίζεται στα 1035 cm^{-1} αντιστοιχεί σε δόνηση $\nu_3\text{PO}_4^{3-}$, η οποία επικαλύπτεται με συστατικά προλίνης $\nu(\text{C-C})$, ενώ στα 1086 cm^{-1} και 1124 cm^{-1} εμφανίζονται δονήσεις δεσμών της προλίνης. Η ταυτοποίηση της κορυφής στα 1035 cm^{-1} αποδίδεται επίσης, σε αμινοξέα του μορίου του κολλαγόνου(προλίνη,

φαινυλαλανίνη, τυροσίνη, θρεονίνη) [75]. Ακόμα, στα 1108 cm^{-1} της γλυκίνης και στους 1048 cm^{-1} , 1060 cm^{-1} , 1101 cm^{-1} παρουσιάζονται δονήσεις άλλων αμινοξέων του κολλαγόνου [76].

Η κορυφή 1060 cm^{-1} μπορεί να αποδοθεί σε δόνηση του trans δεσμού ν (C-C) των λιπιδίων, η οποία έχει παρατηρηθεί στα 1067 cm^{-1} σε προηγούμενη ερευνητική εργασία [70]. Επιπλέον, η κορυφή που εμφανίζεται στους 1096 cm^{-1} στα οστικά φάσματα μπορεί να αντιστοιχεί στη δόνηση του δεσμού ν(C-C) του κολλαγόνου, ενώ η χαμηλής έντασης κορυφή στα 1101 cm^{-1} αποδίδεται σε δονήσεις ανθρακικών υποκαταστατών τύπου Α. Τέλος, όσον αφορά τη κορυφή στα 1124 cm^{-1} αποδίδεται και αυτός σε δονήσεις trans δεσμών ν(C-C) του μορίου του κολλαγόνου [75].

Ο λόγος ανθρακικών προς φωσφορικούς υποκαταστάτες, δίνεται από το λόγο της έντασης της κορυφής στα 1070 cm^{-1} προς την ένταση της κορυφής στα 959 cm^{-1} και χρησιμοποιείται ομοία για τη μελέτη της ανόργανης φάσης του οστού. Πιο αναλυτικά, είναι δείκτης μέτρησης της ποσότητας ανθρακικών στο πλέγμα του οστού.

3.1.4. Περιοχή Αμιδίου Ι

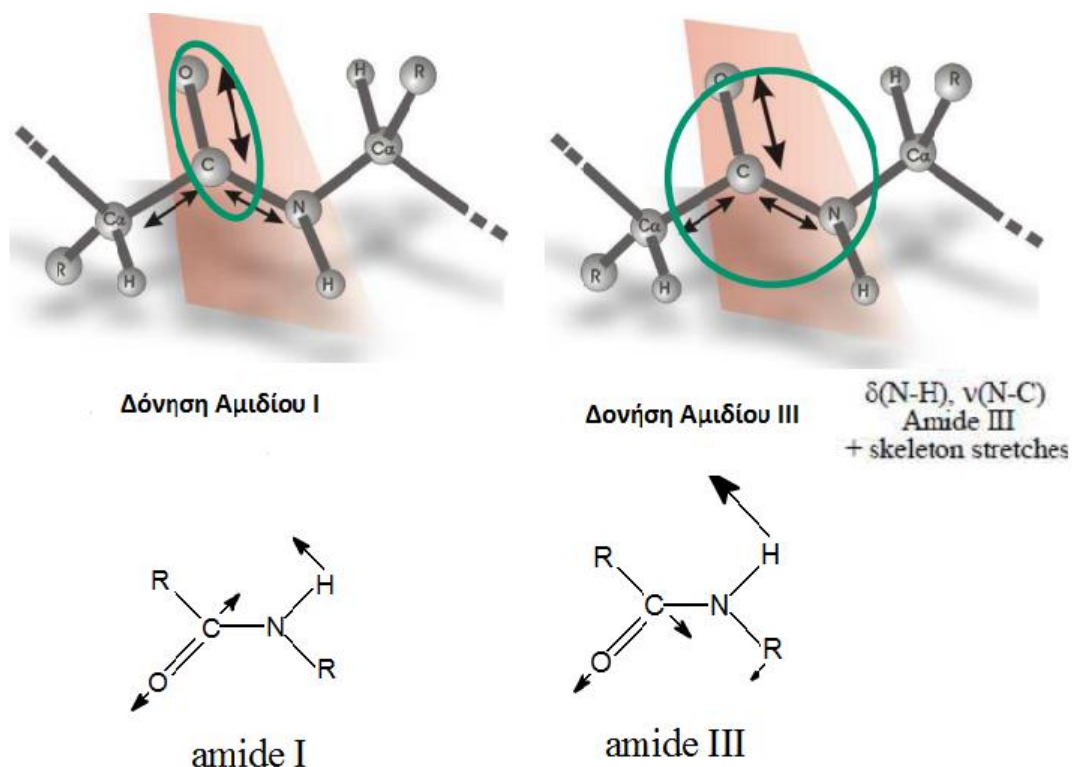
Η περιοχή του Αμιδίου Ι εντοπίζεται στο φάσμα του οστού στο εύρος $1600\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$. Για την περαιτέρω διερεύνηση του κολλαγόνου μπορούν να εξεταστούν δονήσεις που αποδίδονται σε αμιδικούς δεσμούς ακόμα και σε δεσμούς της βασικής αλυσίδας της πρωτεΐνης. Η κορυφή η οποία αποδίδεται στη δόνηση του Αμιδίου Ι και ξεχωρίζει στο διάστημα αυτό με την ευρεία μορφή της είναι εκείνη που εντοπίζεται γύρω στα 1660 cm^{-1} (Amide I). Η περιοχή αυτή στο οστικό φάσμα αποτελεί χαρακτηριστική της δευτεροταγούς δομής του κολλαγόνου τύπου Ι του οστού. Οφείλεται στη δόνηση του πεπτιδικού δεσμού (C=O) του κολλαγόνου. Οι σχετικές εντάσεις των επιμέρους κορυφών που την αποτελούν εξαρτώνται από τη δευτεροταγή δομή του κολλαγόνου. Η μορφή της μπάντας του Αμιδίου Ι εξαρτάται από τη σύσταση των αμινοξέων. Πιο συγκεκριμένα, στο εύρος της περιοχής του Αμιδίου Ι, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, εντοπίζεται η ύπαρξη τεσσάρων επιμέρους κορυφών, οι οποίες αντιστοιχούν στους κυματάριθμους : 1609 cm^{-1} , 1640 cm^{-1} , 1660 cm^{-1} , 1690 cm^{-1} . Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω η κορυφή 1660 cm^{-1} εμφανίζεται με τη μεγαλύτερη σχετική ένταση, η οποία αποδίδεται στη δόνηση ενός συνόλου δεσμών του Αμιδίου Ι στα αμινοξέα της τριπλής έλικας του κολλαγόνου τύπου Ι [79]. Από το σύνολο των δονήσεων τη μεγαλύτερη συνεισφορά έχει η δόνηση έκτασης του δεσμού C=O των καρβονυλικών ομάδων του πεπτιδίου [77], η οποία βρίσκεται προσανατολισμένη παράλληλα με τη δομή του κολλαγόνου και

λιγότερο στη δόνηση έκτασης του δεσμού C-N, η οποία εντοπίζεται περίπου στα 1242 cm^{-1} και αποδίδεται στη δόνηση του Αμιδίου ΙΙΙ [78].

Όσον αφορά τις δευτερεύουσες κορυφές που παρουσιάζονται στα φάσματα του οστού, η κορυφή στα 1640 cm^{-1} , εμφανίζεται ως ώμος της κύριας μπάντας του Αμιδίου Ι, είναι χαρακτηριστική της δευτεροταγούς δομής του κολλαγόνου και αποδίδεται σε δόνηση του δεσμού C=C [75].

Επιπρόσθετα, σχετικά με τις κορυφές στα 1660 cm^{-1} και 1690 cm^{-1} , σημειώνεται ότι αντιστοιχούν στους μη αναγώγιμους και αναγώγιμους crosslinking δεσμούς του κολλαγόνου [79]. Ο λόγος των κορυφών αυτών χρησιμοποιείται ως δείκτης ωρίμανσης και ποιότητας του κολλαγόνου. Τα συστατικά του Αμιδίου Ι είναι περισσότερο μέτρο αλλαγής της δευτεροταγούς δομής του κολλαγόνου, και όχι απευθείας μέτρηση σταυροδεσμών του κολλαγόνου.

Στις δονήσεις των αμιδικών δεσμών που συνυπάρχουν στα φάσματα των οστών συγκαταλέγονται εκτός από τις δονήσεις του Αμιδίου Ι και εκείνες του Αμιδίου ΙΙΙ. Πιο αναλυτικά, κορυφές σχετικά με τις πρωτεΐνες του Αμιδίου ΙΙΙ εντοπίζονται περίπου στα 1242 cm^{-1} και 1272 cm^{-1} , οι οποίες αντιστοιχούν σε δονήσεις του β-φύλλου και της α-έλικας αντίστοιχα [71]. Ακόμα, μια κορυφή που αντιστοιχεί σε δονήσεις της α-έλικας της πρωτεΐνης του Αμιδίου ΙΙΙ ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{ wag}$) εντοπίζεται στα 1340 cm^{-1} [71].



Εικόνα 15: Δονήσεις Αμιδίου Ι και ΙΙΙ της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών[80].

Παρακάτω παρουσιάζεται ένας συγκεντρωτικός πίνακας με τις κύριες κορυφές οι οποίες εντοπίζονται σε ένα φυσιολογικό, υγιές οστικό φάσμα και τον αντίστοιχο κυματάρημο στον οποίο εντοπίζονται.

Πίνακας 1: Βασικές κορυφές ανόργανων και οργανικών συστατικών οστικού φάσματος

Περιοχή οστικού φάσματος	Raman shift (cm^{-1})	Δόνηση
Προλινών-Υδροξυπρολινών	855	Δόνηση κάμψης δ(C-C-H) προλίνης
Προλινών-Υδροξυπρολινών	876	Δόνηση έκτασης ν(C-C) υδροξυπρολίνης
Βιοαπατίτη-Φωσφορικών	920	Δακτυλίου προλίνης
Βιοαπατίτη-Φωσφορικών	936	Δόνηση έκτασης ν(C-C) προλίνης
Βιοαπατίτη-Φωσφορικών	947	Χαρακτηριστική απατίτη με ανθρακικούς υποκαταστάτες
Βιοαπατίτη-Φωσφορικών	959	$\nu_1 PO_4^{3-}$
Ανθρακικών	1035	$\nu_3 PO_4^{3-}$
Ανθρακικών	1048	$\nu_3 PO_4^{3-}$
Ανθρακικών	1060	Δόνηση trans δεσμού ν(C-C) λιπιδίων, Proteoglycan
Ανθρακικών	1070	$\nu_1 CO_3^{2-}$
Ανθρακικών	1076	$\nu_3 PO_4^{3-}$
Ανθρακικών	1086	$\nu_3 PO_4^{3-}$, Calcite
Ανθρακικών	1100	Δονήσεις ανθρακικών υποκαταστατών τύπου A
Αμιδίου I	1609	Αρωματικών δακτυλίων κολλαγόνου δ(C=C), phenylalanine, tyrosine
Αμιδίου I	1640	N(C=C)
Αμιδίου I	1660	Μη αναγώγιμοι σταυροδεσμοί (cross-links) αμιδίου I
Αμιδίου I	1690	C=O Αμιδίου I στο αμινοξύ της γλυκίνης – Αναγώγιμοι σταυροδεμοί

3.2. Παράμετροι ποιότητας οστών

Οι πληροφορίες τις οποίες παρέχει η φασματοσκοπία Raman σχετικά με τη σύσταση των οστών και συγκεκριμένα για τα ανόργανα (mineral) και οργανικά (matrix) συστατικά που τα αποτελούν, είναι πολύτιμες για την εκτίμηση των αλλαγών που υφίσταται η σύνθεση του οστού με την αύξηση της ηλικίας, λόγω κάποιας παθολογικής ασθένειας ή τραυματισμού. Για τη μελέτη και την εκτίμηση της μηχανικής συμπεριφοράς των οστών υπάρχει ένα σύνολο παραμέτρων που προσεγγίζονται από τη φασματοσκοπία Raman, οι οποίες χαρακτηρίζουν την οστική ποιότητα (bone quality).

Με τον όρο αυτό λοιπόν, αναφερόμαστε στη σύνθεση και τις αρχιτεκτονικές ιδιότητες του οστικού ιστού, όπου καθορίζουν τις ιδιότητες του υλικού και την ικανότητα του να εκτελέσει τις μηχανικές του λειτουργίες. Στις παραμέτρους αυτές περιλαμβάνονται δομικοί, φυσικοχημικοί και βιολογικοί παράγοντες, όπως είναι το πάχος των δοκίδων του σπογγώδους οστού, η συνεκτικότητα τους, ο προσανατολισμός των κρυστάλλων βιοαπατίτη σε σχέση με τον άξονα των ινιδίων κολλαγόνου, η ποσότητα και το είδος των σταυροδεσμών του, ο λόγος των σχετικών ποσοτήτων βιοαπατίτη προς το κολλαγόνο, η κατανομή του λόγου αυτού κατά μήκος των οστεώνων, το μέγεθος των κρυσταλλιτών του βιοαπατίτη, η περιεκτικότητα σε ανθρακικά ιόντα κ.α. [81].

Με τη χρήση της φασματοσκοπίας Raman προκύπτουν τέσσερις βασικοί δείκτες για τη μελέτη της ποιότητας των οστών, που σχετίζονται με τη σύνθεση του οστού και αποτελούν δείγματα της ποιότητας του, οι οποίοι είναι : ο λόγος των ανόργανων (στοιχεία βιοαπατίτη) προς τα οργανικά συστατικά (όπως το αμίδιο I του κολλαγόνου), Mineral to Matrix Ratio- MMR, ο λόγος των ανθρακικών προς τα φωσφορικά (Carbon to Phosphate Ratio, CPR), η κρυσταλλικότητα του βιοαπατίτη (mineral crystallinity) και η ποιότητα του δικτύου κολλαγόνου (collagen maturity).

✓ **Λόγος ανόργανων προς οργανικά (Mineral to Matrix Ratio, MMR)**

Ο λόγος που αντιστοιχεί στο λόγο mineral/matrix είναι χαρακτηριστικός της ποσότητας των ανόργανων συστατικών στο οστό (mineralization) [82] και υπολογίζεται ως ο λόγος της έντασης των φωσφορικών της περιοχής του βιοαπατίτη (περίπου στο 959 cm^{-1}) με την αντίστοιχη ένταση της κορυφής του Αμιδίου I ($1616\text{-}1720\text{ cm}^{-1}$). Επίσης, χαρακτηρίζει το βαθμό ασβεστοποίησης του οστίτη ιστού [82].

✓ **Λόγος ανθρακικών προς φωσφορικά (Carbonate to Phosphate Ratio, CPR)**

Η παρουσία της κυρίαρχης ζώνης των ανθρακικών γύρω στα 1070 cm^{-1} στο φάσμα Raman είναι σημαντική καθώς υποδεικνύει ότι η θέση των φωσφορικών στο πλέγμα του απατίτη είναι επιρρεπής στην ιοντική υποκατάσταση. Οι μετρήσεις Raman του λόγου των ανθρακικών προς των φωσφορικών θέσεων (στα 959 cm^{-1}) μπορεί να παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για τη χημική σύνθεση των οστών, αποτελεί δείκτη υποκατάστασης των φωσφορικών ιόντων στο κρυσταλλικό πλέγμα του απατίτη [67].

Όμως, ιδιαίτερη προσοχή δίνεται στο γεγονός ότι η ζώνη των ανθρακικών εν μέρει επικαλύπτεται από άλλες ζώνες φωσφορικών γύρω στα 1076 cm^{-1} , η οποία μπορεί να μειώνει την ακρίβεια της μέτρησης, ειδικά για απατίτες που χαρακτηρίζονται από χαμηλό ποσοστό ανθρακικών. Επιπλέον σχετικά με τις παραμέτρους που περιλαμβάνουν την μέτρηση των ανθρακικών υπολογίζεται ο λόγος των ανθρακικών προς το Αμίδιο I (1660 cm^{-1}), η οποία παρέχει πληροφορίες για την οστική ανακατασκευή και αναδιαμόρφωση των οστών (remodeling)[67,82].

✓ **Κρυσταλλικότητα Βιοαπατίτη (Mineral crystallinity)**

Η δύναμη του οστού δεν εξαρτάται μόνο από το ποσό της ανοργανοποίησης (mineralization), αλλά ακόμα και από το βαθμό της ανόργανης κρυσταλλικότητας και τη βέλτιστη κατανομή των διάφορων μεγεθών των κρυστάλλων. Η κρυσταλλικότητα του βιοαπατίτη του οστού συνδέεται άμεσα με την αντοχή του και τη σκληρότητα αυτού, στην οποία συνεισφέρει και η ασβεστοποίηση. Για τον πειραματικό υπολογισμό της τιμής της κρυσταλλικότητας χρησιμοποιείται το εύρος της βασικής μπάντας του φάσματος, των φωσφορικών στα 959 cm^{-1} [71,83].

Πιο συγκεκριμένα, η τιμή της κρυσταλλικότητας προκύπτει μετρώντας το αντίστροφο του πλάτους της κατανομής της υπό μελέτη κορυφής, στο μισό του ύψους της ($1/\text{FWHM}$, όπου FWHM: full width half maximum) [67]. Μια μοναδική Γκαουσιανή καμπύλη χρησιμοποιείται συνήθως για τη προσαρμογή (fit) της μπάντας των φωσφορικών και την απόκτηση της τιμής του full-width half maximal (FWHM). Συγκεκριμένα, το FWHM είναι αντιστρόφως ανάλογο με τους ανόργανους κρυσταλλίτες κατά μήκος του άξονα c. Ο δείκτης αυτός παρέχει πληροφορίες τόσο για την ωρίμανση του οστού όσο και για τη ελαστικότητα και την ευθραυστότητα του [67].

Αλλαγές οι οποίες προκύπτουν από την αύξηση της ηλικίας του ιστού υποδεικνύουν την ωρίμανση του βιοαπατίτη. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το ότι με την ηλικία του ιστού αλλάζει όχι μόνο η ποσότητα των ανθρακικών αλλά και ο τύπος της υποκατάστασης. Σημειώνεται ότι ο τύπος A αντιπροσωπεύει τα ανθρακικά στη θέση των υδροξυλίων, ενώ ο τύπος B αντιπροσωπεύει τα χαλαρά απορροφημένα

ανθρακικά στην επιφάνεια [84]. Αυτό έχει και ως αποτέλεσμα να επηρεάζεται και η διαλυτότητα και κρυσταλλικότητα των κρυστάλλων του βιοαπατίτη ως προς το μέγεθος και το σχήμα τους [85].

✓ **Δίκτυο Κολλαγόνου (Collagen maturity)**

Στη φασματοσκοπία Raman η παράμετρος ποιότητας κολλαγόνου αντλείται από χωρικά αναλυόμενη μπάντα των Αμιδίων I. Από την ευρύτερη περιοχή του και τις κορυφές που αλληλεπικαλύπτονται σε αυτή, λαμβάνονται πληροφορίες σχετικά με τη δομή της πρωτεΐνης [85], καθώς το Αμιδίο I αποτελεί τη βασική κορυφή του κολλαγόνου. Αλλαγές στη δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών μπορούν να επιφέρουν τροποποιήσεις στη συχνότητα και την ένταση των κορυφών που αντιστοιχούν στις δονήσεις των κορυφών του Αμιδίου I, οι οποίες εντοπίζονται στο οστικό φάσμα γύρω στα 1660 cm^{-1} . Από τις κορυφές που εντοπίζονται στην περιοχή του Αμιδίου I μεγαλύτερο ενδιαφέρον για την διερεύνηση της ποιότητας του κολλαγόνου αποτελούν οι κορυφές στα 1660 cm^{-1} και εκείνη στα 1690 cm^{-1} .

Οι λόγοι των εμβαδών των κορυφών που προαναφέρθηκαν αποτελούν δείκτη της ποιότητας του δικτύου του κολλαγόνου [67] και αποτελούν δείγμα των μη αναγώγιμων προς τους αναγώγιμους σταυροδεσμούς του κολλαγόνου. Ο λόγος αυτός σχετίζεται με το βαθμό της ωρίμανσης του κολλαγόνου με τη πάροδο της ηλικίας του ιστού [79,35] και με τη ποσότητα των σταυροδεσμών που ανάγονται ως απάντηση σε μηχανικά ερεθίσματα [86]. Οι αλλαγές στο λόγο έχουν χρησιμοποιηθεί ως απόδειξη για τη διάλυση σταυροδεσμών που προκαλούνται στο οστό.

Έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι κατά την αποικοδόμηση του κολλαγόνου, η σχετική ένταση της κορυφής στα 1660 cm^{-1} μειώνεται ενώ της δεύτερης αυξάνεται. Επιπλέον, ο λόγος αυτός συνήθως διαφέρει μεταξύ υγιών και οστών που παρουσιάζουν κάποια παθολογία, με τον δεύτερο να είναι μεγαλύτερος. Έτσι, συμπεραίνεται ότι η κακή ποιότητα του κολλαγόνου του οστού συμβάλλει στην ευθραυστότητά του [86].

Κεφάλαιο 4

Συντήρηση βιολογικών δειγμάτων

Για την αξιολόγηση των φυσικών ιδιοτήτων των οστών, όταν ένα δείγμα απομακρύνεται από έναν οργανισμό με σκοπό την υποβολή του σε κάποιο μηχανικό έλεγχο ή φασματοσκοπική ανάλυση, σε σύντομο ή μακροχρόνιο διάστημα, συχνά είτε αποθηκεύεται για κάποιο διάστημα σε κατάψυξη είτε υποβάλλεται σε διαδικασία χημικής σταθεροποίησης με τη χρήση χημικών αντιδραστηρίων όπως η φορμαλδεΐδη (φορμαλίνη) και η αιθανόλη ή τέλος υποβάλλεται σε άλλους τρόπους συντήρησης και αποθήκευσης, όπως η ενσωμάτωση των δειγμάτων σε κάποιο υλικό μέσο (embedding) [87]. Αυτό γίνεται με σκοπό την αντισηψία και την αποστείρωση του ιστού, την παρεμπόδιση των εκφυλιστικών διεργασιών και την αποφυγή της αποσύνθεσης, με αποτέλεσμα να διατηρηθεί το βιολογικό υλικό όσο πιο κοντά στη φυσική του κατάσταση κατά τη διαδικασία της προετοιμασίας του για εξέταση.

Οι επιδράσεις αυτών των μεθόδων στη δομή των πρωτεϊνών και στην ανόργανη φάση των οστών δεν είναι ξεκάθαρη, καθώς υπάρχει περιορισμένος αριθμός μελετών δονητικής φασματοσκοπίας στην διεθνή βιβλιογραφία για τις μεταβολές που επάγουν οι διαδικασίες σταθεροποίησης στην ποιότητα των οστών. Σε γενικές γραμμές η μελέτη φρέσκων ιστών προτιμάται, από τα δείγματα εκείνα που έχουν υποστεί επεξεργασία κατά τη συντήρησή τους. Ωστόσο, η χημική σταθεροποίηση είναι μερικές φορές αναπόφευκτη. Η επιλογή του πρωτοκόλλου συντήρησης θα πρέπει να είναι ιδιαίτερα προσεκτική καθώς μπορεί να επηρεάσει σημαντικά ορισμένες ιδιότητες του ιστού.

4.1. Σταθεροποίηση-Fixation

Στους τομείς της ιστολογίας, παθολογίας και βιολογίας κυττάρων η σταθεροποίηση (fixation) είναι το πιο σημαντικό βήμα για την μελέτη ενός ιστολογικού δείγματος και προετοιμασίας του για μικροσκοπική ή φασματοσκοπική ανάλυση. Ο στόχος της είναι η παρεμπόδιση της δραστηριότητας των λυτικών ενζύμων, των βακτηρίων και άλλων μολυσματικών παραγόντων προκειμένου να διατηρηθούν τα χαρακτηριστικά ενός ιστού μετά την συλλογή του, σε παρόμοια με την έμβια κατάσταση. Πολλές φορές η αναγκαιότητα αυτή πηγάζει από τη χρονική καθυστέρηση ανάμεσα στην λήψη των δειγμάτων και τη συλλογή των φασμάτων ή την ανάγκη για επαναλαμβανόμενους πειραματισμούς.

Με τη χρήση ενός σωστού σταθεροποιητικού περιορίζεται η αυτόλυση (η διάλυση των κυττάρων με ενδοκυτταρική ενζυμική πέψη) και η σήψη (η διάσπαση του ιστού με βακτηριακή δράση) απενεργοποιώντας ένζυμα και βακτήρια που αρχίζουν να σχηματίζονται μετά το θάνατο ενός ζωντανού οργανισμού καθώς και τυχόν συνεχιζόμενες βιοχημικές αντιδράσεις. Ακόμα, η σταθεροποίηση προστατεύει τον ιστό από υπερβολική συρρίκνωση ή πρήξιμο με αποτέλεσμα να μην διαλύεται ή παραμορφώνεται και να είναι δυνατή η μεταγενέστερη ανάλυση του. Τα σταθεροποιητικά προστατεύουν επιπλέον τον ιστό κατά την διαδικασία ενσωμάτωσης του σε κάποιο υλικό διατήρησης, διαδικασία όπου πραγματοποιείται με τον εμποτισμό σε πολυμερές με υψηλή θερμοκρασία [88].

Στην ιστολογία εμφυτευμάτων, η σταθεροποίηση πραγματοποιείται με χημικές ενώσεις χωρίς τη φυσική επεξεργασία των δειγμάτων, όπως για παράδειγμα θέρμανση ή κατάψυξη αυτών, καθώς οι τεχνικές αυτές μπορούν να προκαλέσουν συστολή (contraction) ή/και διαστολή (expansion) των ιστών και των βιοϋλικών. Μπορεί να δημιουργηθούν αλλοιώσεις οι οποίες οφείλονται στη διαφορά των συντελεστών θερμικής διαστολής ανάμεσα στους σκληρούς και μαλακούς ιστούς[88,89]. Ο ιστός σταθεροποιείται μέσω των σταυροδεσμών (cross-links) που σχηματίζονται στις πρωτεΐνες, κυρίως μεταξύ των αμινοξέων της λυσίνης. Αυτή η διασύνδεση δεν βλάπτει αρκετά τη δομή των πρωτεϊνών.

Οι σκληροί ιστοί έχουν μία συμπαγή δομή (mineralized), η οποία καθιστά τη διείσδυση του σταθεροποιητικού (fixative), ιδιαίτερα δύσκολη. Όταν επιχειρείται η σταθεροποίηση μεγάλων ανατομικών δειγμάτων, συνήθως μόνο το πιο περιφερικό τμήμα υφίσταται επαρκή συντήρηση, ενώ υπάρχουν αλλαγές περιοχών κοντά στο κέντρο του τμήματος που εμποδίζουν την καλή διείσδυση. Επομένως, σε περίπτωση δειγμάτων μεγάλων διαστάσεων, είναι προτιμητέα η μείωση του μεγέθους του δείγματος για να επιτυγχάνεται καλύτερη σταθεροποίηση.

Μία ποικιλία σταθεροποιητικών χρησιμοποιούνται ανάλογα με τον τύπο του ιστού. Στα πιο κοινά διαλύματα που χρησιμοποιούνται για τη σταθεροποίηση ανήκουν η 10-30% φορμαλίνη, η γλουταραλδεϋδη (glutaraldehyde), η παραφορμαλδεϋδη και τα αλκοολούχα διαλύματα. Ορισμένα από τα σταθεροποιητικά αυτά είναι γνωστά ως κύρια, ενώ άλλα ως δευτερεύοντα, τα οποία προκύπτουν από την ανάμιξη ορισμένων κύριων, έτσι ώστε να αξιοποιούνται όλα τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζονται σε κάθε στοιχείο.

Διάφοροι παράγοντες επηρεάζουν τη διαδικασία σταθεροποίησης, όπως για παράδειγμα οι ακόλουθοι :

- Buffering (Πύθμιση)
- Διείσδυση
- Όγκος

- Θερμοκρασία
- Συγκέντρωση
- Χρόνος [88].

4.1.1. Σταθεροποιητικά – Fixatives

Ένα σταθεροποιητικό σταθεροποιεί τις πρωτεΐνες ώστε να παραμένουν ανθεκτικές έναντι της αυτόλυσης, καθώς διατηρεί την κυτταρική δομή. Τα σταθεροποιητικά μπορεί να είναι είτε φυσικά ή χημικά ή συνδυασμός αυτών [90]. Η φυσική σταθεροποίηση περιλαμβάνει θέρμανση, αποξήρανση κ.α., ενώ η χημική σταθεροποίηση είναι πολύ πιο αξιόπιστη και περιλαμβάνει την εμβάπτιση του ιστού σε υδατική ή αλκοολική βάση.

Για να εκτελέσουν τον προστατευτικό τους ρόλο, μετουσιώνουν τις πρωτεΐνες με πήξη, σχηματίζοντας πρόσθετες ενώσεις ή με έναν συνδυασμό διεργασιών πήξης και πρόσθετων διαδικασιών. Μια ένωση η οποία επιδρά χημικά στα μακρομόρια σταθεροποιεί τη δομή πιο αποτελεσματικά εάν είναι σε θέση να συνδυαστεί με μέρη δύο διαφορετικών μακρομορίων (cross-linking). Επιπλέον η δράση τους έγκειται στην απενεργοποίηση πρωτεολυτικών ενζύμων, τα οποία διαφορετικά υποβαθμίζουν και καταστρέφουν το δείγμα και το προστατεύουν από εξωγενείς βλάβες. Είναι τοξικά για τους πιο συνηθισμένους μικροοργανισμούς (για κάποια βακτήρια) που θα μπορούσαν να αποικίσουν σε κάποιον ιστό. Έτσι, τα περισσότερα σταθεροποιητικά τροποποιούν χημικά το υλικό που έχει υποβληθεί σε σταθεροποίηση ώστε να γίνει τοξικό σε ευκαιριακούς μικροοργανισμούς [91].

Βέβαια κάθε σταθεροποιητικό έχει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά και μειονεκτήματα. Ορισμένα όπως η φορμαλδεΰδη και η γλουταραλδεΰδη ενισχύουν τον σχηματισμό ομοιοπολικών σταυροδεσμών τόσο μεταξύ των πρωτεϊνών όσο και μεταξύ των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων. Χημικά σταθεροποιητικά αφυδάτωσης, όπως η αιθανόλη, μεθανόλη ή και η ακετόνη απομακρύνουν το ελεύθερο νερό από τους ιστούς και έτσι διεισδύουν και πήζουν τις πρωτεΐνες [92]. Ακόμα, άλλα χημικά σταθεροποιητικά όπως το οξικό οξύ και ο οξικός ψευδάργυρος προκαλούν αλλαγές στο pH ή στη συγκέντρωση άλατος με αποτέλεσμα να μετουσιώνουν τις πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα [93].

Ιδιαίτερη σημασία κατά τη διάρκεια της σταθεροποίησης αποτελεί η συγκέντρωση του σταθεροποιητικού που χρησιμοποιείται. Για παράδειγμα, συγκέντρωση φορμαλίνης μεγαλύτερη του 10% προκαλεί περιττή σκλήρυνση, ενώ συγκέντρωση αιθανόλης κάτω από 70% δεν αφυδατώνει σε ικανοποιητικό βαθμό. Ακόμα, η ωσμωτικότητα και η ιοντική συγκέντρωση επηρεάζει τη σταθεροποίηση. Υπερτονικά

διαλύματα μπορεί να προκαλέσουν συρρίκνωση, ενώ υποτονικά θα οδηγήσουν σε διόγκωση.

Όταν εκτίθενται στο φως του ήλιου, τα σταθεροποιητικά υφίστανται τροποποιήσεις. Για παράδειγμα, η φορμαλίνη έχει τη τάση να σχηματίζει πολυμερή μεγαλύτερων διαστάσεων που έχουν χαμηλή διεισδυτική ικανότητα. Για το λόγο αυτό θα πρέπει να διατηρούνται στο σκοτάδι στους 4°.

Τέλος, σημειώνεται ότι τα δείγματα θα πρέπει να ξεπλένονται μετά τη διαδικασία της σταθεροποίησης, σε διάλυμα ρυθμισμένο με φωσφορικά, phosphate buffered saline (PBS), πριν τη διαδικασία επεξεργασίας τους και φασματοσκοπικής μέτρησης τους, ώστε να αφαιρείται εντελώς ή στο μεγαλύτερο βαθμό το σταθεροποιητικό διάλυμα. Το διάλυμα αυτό πρόκειται για ένα υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα άλατος που χρησιμοποιείται συνήθως στις βιολογικές έρευνες και περιέχει όξινο φωσφορικό νάτριο, χλωριούχο νάτριο και σε ορισμένες συνθέσεις χλωριούχο κάλιο και διυδροφωσφορικό κάλιο. Με τη ρυθμιστική του ιδιότητα συμβάλει στη διατήρηση σταθερού pH στα δείγματα, το οποίο μπορεί να έχει επηρεαστεί κατά την επεξεργασία με τα σταθεροποιητικά. Οι συγκεντρώσεις των ιόντων των PBS διαλυμάτων και η ωσμωτικότητα τους ταιριάζουν με εκείνες του ανθρώπινου σώματος (ισοτονικές). Για αυτό και επιλέγεται κατά τις ιστολογικές μελέτες καθώς είναι μη τοξικό για τα περισσότερα κύτταρα. Με αυτό τον τρόπο μειώνονται οι αλλοιώσεις (artifacts) που οφείλονται στη παρουσία των σταθεροποιητικών και μπορεί να καταγράφονται στους ιστούς και να εμφανίζονται στα φάσματα. Η πλήση σε PBS γίνεται με εμβάπτιση του δείγματος.

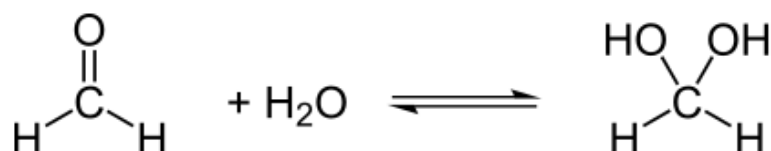
Συνοπτικά τα σταθεροποιητικά επιδρούν στα υλικά με τον εξής τρόπο :

- 1) προσφέροντας χημική σταθερότητα στους ιστούς
- 2) εμποδίζοντας τη δράση του ενζύμου που ενεργοποιεί την αυτόλυση
- 3) σταματώντας τη βακτηριακή σήψη

Στα πιο κοινά διαλύματα που χρησιμοποιούνται για τη σταθεροποίηση ανήκουν η 10-30% φορμαλίνη, η γλουταραλδεϋδη (glutaraldehyde), η παραφορμαλδεϋδη και τα αλκοολούχα διαλύματα με τις επιδράσεις που προκαλούν στους ιστούς να μην είναι ξεκάθαρες και ιδιαίτερα στα οστά. Παρακάτω γίνεται πιο εκτενής αναφορά στα σταθεροποιητικά που έχουν χρησιμοποιηθεί στη παρούσα μελέτη.

Φορμαλδεΰδη- Φορμαλίνη

Η φορμαλίνη είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο σταθεροποιητικό, διεισδύει στους ιστούς αρκετά, όμως η δράση της καθυστερεί. Η φορμαλίνη (φορμόλη) είναι η εμπορική ονομασία για το ενυδατωμένο διάλυμα φορμαλδεΰδης [94]. Το όριο διαλυτότητας της φορμαλδεΰδης στο νερό είναι 40%. Το πρότυπο διάλυμα το οποίο χρησιμοποιείται πιο συχνά είναι το 10% ουδέτερο ρυθμισμένο διάλυμα, neutral buffered formalin (NBF) όπου αποτελείται από 10 mL φορμαλδεΰδης και 90 mL νερό. Με άλλα λόγια, ένα διάλυμα 10% NBF περιέχει περίπου 4% φορμαλδεΰδη.



Σχήμα 1: Αντίδραση ενυδάτωσης φορμαλδεΰδης, με μοριακό τύπο: $\text{CH}_2(\text{OH})_2$

Η ανάγκη για ρυθμιστικό διάλυμα οφείλεται στο ότι εμποδίζει την οξύτητα, η οποία μπορεί να προωθήσει την αυτόλυση. Ακόμα, η υποξία των ιστών μειώνει τη τιμή του pH και για το λόγο αυτό το σταθεροποιητικό θα πρέπει να έχει ρυθμιστική ικανότητα για να αποφευχθεί η περίσσεια οξέων. Η μη ρυθμιστική φορμαλίνη αντιδρά με το οξυγόνο σχηματίζοντας μυρμηκικό οξύ το οποίο έχει χαμηλό pH, περίπου ίσο με 4 και το οποίο διαλύει τα ανόργανα (mineral) συστατικά του οστού όπως το ασβέστιο (Ca) και ο φώσφορος (P). Έτσι λοιπόν, για την καταστολή της έκλυσης (elution) των ανόργανων συστατικών των οστών η σταθεροποίηση πραγματοποιείται κατά βέλτιστο τρόπο κοντά σε ουδέτερο pH, στη περιοχή 6-8.

Η φορμαλίνη ενεργεί δεσμεύοντας τις αμινομάδες των πλευρικών αλυσίδων των πρωτεϊνών και σχηματίζοντας ένα πρωτεϊνικό δίκτυο, τροποποιεί με ουσιαστικό τρόπο τη τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών των ιστών. Πιο συγκεκριμένα, η δράση της φορμαλδεΰδης λειτουργεί σε δύο βήματα: γρήγορη διάχυση (diffusion) και αργή σταθεροποίηση [95]. Είναι κοινά αποδεκτό ότι η σταθερή σύνδεση της φορμαλδεΰδης που εντοπίζεται στην παρατεταμένη σταθεροποίηση έχει ως αποτέλεσμα το μη αναστρέψιμο σχηματισμό σταυροδεσμών (cross-links) [95] με τα οργανικά συστατικά του οστικού ιστού. Αλλά και στο εσωτερικό των ινιδίων λόγω της δράσης των αλδευδών στα αμινοξέα των αλυσίδων του κολλαγόνου. Έτσι, ο βιολογικός ιστός διατηρείται μέσω των σταυροδεσμών που σχηματίζονται στις πρωτεΐνες που υπάρχουν στο δείγμα. Αφού η φορμαλδεΰδη αποτελεί παράγοντα ο οποίος ενισχύει το σχηματισμό σταυροδεσμών, θα ήταν αναμενόμενη η παρατήρηση τροποποιήσεων στην ωριμότητα του κολλαγόνου, η οποία αντικατοπτρίζει τους σταυροδεσμούς του κολλαγόνου [96]. Επιπλέον, η σταθεροποίηση η οποία βασίζεται στη χρήση αλδευδών εκτός από την ώθηση σχηματισμού σταυροδεσμών προκαλεί απώλεια PGs και την έκπλυση των GAGs από τους ιστούς, όπως αναφέρεται σε εργασία του Takahashi [97].

Διακυμάνσεις στο pH, τη θερμοκρασία και το χρόνο που διαρκεί η σταθεροποίηση οδηγούν σε δείγματα με διαφορετικές διαβαθμίσεις σταυροδεσμών [98]. Αρκετά πιθανό είναι ότι 12 ώρες σταθεροποίησης είναι επαρκείς για να διεισδύσει η φορμαλδεΰδη στο εσωτερικό των ιστών και να αλλάξει τη μοριακή τους δομή μέσω των ασταθών σταυροδεσμών, με αποτέλεσμα όπως παρατηρείται σε προηγούμενες μελέτες [99], να επηρεάζονται οι παράμετροι οι οποίοι σχετίζονται με το κολλαγόνο και να προκαλέσει μείωση του λόγου ($1660/1690\text{ cm}^{-1}$). Στις περισσότερες έρευνες διαφέρουν οι τυπικοί χρόνοι σταθεροποίησης. Μερικές ώρες εφαρμόζονται στην ανοσοϊστοχημεία και την ιστολογία για τη διατήρηση των πρωτεϊνών και της δομής των κυττάρων [100]. Εβδομάδες σταθεροποίησης είναι κατάλληλες για μετρήσεις σε ενδιάμεσα στάδια αποθήκευσης ενώ μήνες ή έτη επιλέγονται για μακροπρόθεσμη συντήρηση.

Αλκοόλες

Τα διαλύματα με βάση τις αλκοόλες παρέχουν το πλεονέκτημα της διατήρησης πολλών ενζύμων, επιτρέποντας την εκτέλεση πολλών ιστοχημικών μελετών. Ορισμένα σταθεροποιητικά, όπως για παράδειγμα η αιθανόλη (C_2H_6O), δρουν με τη πήξη (coagulation), την αλλοίωση των πρωτεϊνών και τη διάλυση των λιπιδίων. Έχουν μικρή ικανότητα διείσδυσης λόγω της πήξης του επιφανειακού στρώματος της πρωτεΐνης. Οι αλκοόλες, όπως η μεθανόλη και η αιθανόλη μπορούν να μετουσιώνουν τις πρωτεΐνες και δεν επιλέγονται συνήθως στους ιστούς καθώς προκαλούν υπερβολική ευθραυστότητα. Παρόλα αυτά, χρησιμοποιούνται για μικρά δείγματα και η αιθανόλη επιλέγεται λόγω της χαμηλής τοξικότητας της.

Με τις αλκοόλες, τα εξωτερικά στρώματα του ιστού σταθεροποιούνται σε σύντομο χρονικό διάστημα (λίγα λεπτά), ενώ χρειάζεται μεγαλύτερη χρονική περίοδος για τα πιο κεντρικά στρώματα λόγω της μειωμένης διεισδυτικότητας. Τα σταθεροποιητικά αυτά, αν χρησιμοποιηθούν σε αυξημένες συγκεντρώσεις τείνουν να συρρικνώνουν τα κύτταρα. Επίσης, όταν τα δείγματα παραμένουν στα σταθεροποιητικά διαλύματα για μεγάλο χρονικό διάστημα, είναι πιθανή η αλλαγή της μορφολογίας τους [88].

Βέβαια η σταθεροποίηση με αιθανόλη όπως προκύπτει από τη βιβλιογραφία έχει ελάχιστο αντίκτυπο στις παραμέτρους που χαρακτηρίζουν την ποιότητα των οστών, σε σύγκριση με τη φορμαλδεΰδη ή τη γλυκερόλη [101,102].

4.2. Κρυοσυντήρηση δειγμάτων – Snap Freezing

Μια τεχνική η οποία επιλέγεται για τη προσωρινή διατήρηση οστικών ιστών είναι η κρυοσυντήρηση και η αποθήκευση των δειγμάτων σε θερμοκρασίες υπό του μηδενός. Πιο συχνά, εφαρμόζεται η αποθήκευση σε θερμοκρασίες μεταξύ του εύρους των -20°C έως -80°C . Διάφορα πειραματικά πρωτόκολλα έχουν εφαρμοσθεί για τη διερεύνηση των μηχανικών ιδιοτήτων αρθρικών χόνδρων, με σκοπό την κατανόηση της επίδρασης της διαδικασίας κατάψυξης και απόψυξης των οστικών δειγμάτων [97,103]. Αποτελέσματα ερευνών με τη χρήση της ιστολογίας και της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας έχουν δείξει ότι η τεχνική αυτή συντήρησης επιφέρει αλλοιώσεις στις μηχανικές λειτουργίες των δειγμάτων και καταστρέφει την εξωκυττάρια μήτρα των οστών (ECM) [103].

Μια τεχνική που εφαρμόζεται με παρόμοια αποτελέσματα είναι η στιγμιαία γρήγορη ψύξη (snap freezing ή flash freezing) κατά την οποία τα δείγματα αποκτούν θερμοκρασίες κάτω από τους -80°C πολύ γρήγορα με τη χρήση ξηρού πάγου ή υγρού αζώτου. Το snap freezing επιτυγχάνει το ίδιο τελικό σημείο (endpoint) με την αργή και ελεγχόμενη κατάψυξη αλλά με πολύ ταχύτερους ρυθμούς. Συγκεκριμένα, τα δείγματα αφήνονται σε υγρό άζωτο για χρονικό διάστημα μικρότερο των δύο δευτερολέπτων και η θερμοκρασία τους μπορεί να αγγίξει τους -196°C . Συνήθως, την διαδικασία της ταχείας ψύξης ακολουθεί συμπληρωματική συντήρηση των δειγμάτων στην κατάψυξη.

Όσον αφορά, την επίδραση της κρυοσυντήρησης στους ιστούς, έχει αναφερθεί σε μελέτες ότι η ψύξη στους -20°C αλλάζει τις μηχανικές ιδιότητες δειγμάτων χόνδρων από χοίρους ενώ ψύξη στους -80°C δεν αλλάζει τις ιδιότητες χόνδρων που έχουν αφαιρεθεί από ανθρώπινο οργανισμό [97]. Η στιγμιαία ψύξη σε συνδυασμό με επακόλουθη διατήρηση στους -80°C μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στις ιδιότητες των χόνδρων, λόγω του γρήγορου σχηματισμού κρυστάλλων πάγου στην μήτρα του κολλαγόνου, οι οποίοι καταστρέφουν τα μακρομόρια της μήτρας και διαλύουν τις κυτταρικές μεμβράνες. Ακόμα, μελέτη δειγμάτων μηριαίου οστού τα οποία είχαν υποβληθεί σε πολλαπλούς κύκλους ψύξης/ απόψυξης με τη χρήση της φασματοσκοπίας Raman έδειξε ότι η δομή του ιστού υποβαθμίζεται, με το φαινόμενο να είναι πιο έντονο στις κορυφές του Αμιδίου I και III [104].

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - ΜΕΡΟΣ (Α)

- [1] <https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%9F%CF%83%CF%84%CF%8C>
- [2] Stuart H. Ralston, "Bone structure and metabolism", *Medicine*, vol. 45, pp. 560-564, 2017
- [3] Gong J.K., Arnold J.S., Cohn S.H., "Composition of trabecular and cortical bone", *The Anatomical Record* , vol. 149, pp. 325-331, 1964
- [4] J. Brinckmann, "Collagens at a glance," *Collagen*, vol. 247, pp. 1-6, 2005
- [5] G. A. Di Lullo, S. M. Sweeney, J. Korkko, L. Ala-Kokko, J. D. San Antonio, "Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type I collagen," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, pp. 4223-4231, Feb 8 2002.
- [6] Rodan G.A., T.J. Martin, "Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption—A hypothesis", *Calcified Tissue International*, vol. 33, pp. 349-351, 1981
- [7] Miyamoto T., Suda T., "Differentiation and function of osteoclasts", *Keio Journal of Medicine*, vol. 52, pp. 1-7, 2003
- [8] B. Brodsky, A. V. Persikov, "Molecular structure of the collagen triple helix," *Fibrous Proteins: Coiled-Coils, Collagen and Elastomers*, vol. 70, pp. 301, 2005.
- [9] Y.A. Lazarev, A. V. Lazareva, V. A. Shibnev, N. G. Esipova, "Infrared-Spectra and Structure of Synthetic Polytripeptides", *Biopolymers*, vol. 17, pp. 1197-1214, May 1978
- [10] J. A. Ramshaw, N. K. Shah, B. Brodsky, "Gly-X-Y tripeptide frequencies in collagen: a context for host-guest triple-helical peptides," *Journal of Structural Biology*, vol. 122, pp. 86-91, 1998.
- [11] E. M. Aarden, P.J. Nijweide, E.H. Burger, "Function of osteocytes in bone". *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 55, pp. 287-99, July 1994
- [12] H. Ozawa, N. Amizuka, "Structure and function of bone cells", *Nihon Rinsho*, vol. 52, pp. 2246-54, 1994
- [13] G.N.Ramachandran, R. Chandrasekharan, "Interchain hydrogen bonds via bound water molecules in the collagen triple helix", *Biopolymers*, vol. 6, pp. 1649- 1658, 1968
- [14] B. Brodsky, J.A.M. Ramshaw, "The collagen triple-helix structure", *Matrix Biology*, vol. 15, pp. 545-554, 1997

- [15] M. D. Shoulders, R. T. Raines, "Collagen Structure and Stability," Annual Review of Biochemistry, vol. 78, pp. 929-958, 2009
- [16] G. B. Fields, "The collagen triple-helix: Correlation of conformation with biological activities," Connective Tissue Research, vol. 31, pp. 235-243, 1995
- [17] J. P. Orgel, T. J. Wess, A. Miller, "The in situ conformation and axial location of the intermolecular cross-linked non-helical telopeptides of type I collagen," Structure with Folding & Design, vol. 8, pp. 137-142, Feb 15 2000
- [18] D. R. Eyre, M. A. Paz, P. M. Gallop, "Cross-Linking in Collagen and Elastin," Annual Review of Biochemistry, vol. 53, pp. 717-748, 1984
- [19] J. P. R. O. Orgel, T. C. Irving, A. Miller, T. J. Wess, "Microfibrillar structure of type I collagen in situ", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 103, pp. 9001-9005, Jun 13 2006
- [20] A.L. Boskey, S. Gadaleta, C. Gundberg, S.B. Doty, P. Ducey, G. Karsenty, "Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of osteocalcindeficient mice provides insight into the function of osteocalcin", Bone, vol. 23, pp. 187-196, 1998
- [21] E. Ruoslahti, "Integrins", The Journal of Clinical Investigation , vol. 87, pp. 1-5, 1991
- [22] W. Zhu, P.G. Robey, A.L. Boskey, "The regulatory role of matrix proteins in mineralization of bone", Osteoporosis, 2007
- [23] R.Z. Legeros, "Apatites in biological-systems", Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials, vol. 4, pp. 1-45, 1981
- [24] N. Kourkouvelis, "Osteoporosis and strontium-substituted hydroxyapatites", Annals of Translational Medicine, vol. 4, Oct 2016
- [25] D. Farlay, G. Panczer, C. Rey, "Mineral maturity and crystallinity index are distinct characteristics of bone mineral", Journal of Bone and Mineral Metabolism, vol. 28, pp. 433-445, 2010
- [26] N. Kourkouvelis, A. Lani, M. Tzaphlidou, "Infrared spectroscopic assessment of the inflammation-mediated osteoporosis (IMO) model applied to rabbit bone" , Journal of Biological Physics, vol. 38, pp. 623–635, Sep 2012
- [27] G. Daculsi, J.M. Bouler, R.Z. LeGeros, "Adaptive crystal formation in normal and pathological calcifications in synthetic calcium phosphate and related biomaterials", International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology, vol. 172, pp. 129-197, 1997
- [28] A. P. Mamede, D. Gonçalves, M. Paula M. Marques, Luís A. E. Batista de Carvalho, "Burned bones tell their own stories: A review of methodological approaches to assess

heat-induced diagenesis", *Journal Applied Spectroscopy Reviews*, vol. 53, pp. 603-635, 28 Dec 2017

[29] C. Rey, B. Collins, T. Goehl, I. R. Dickson, M. J. Glimcher, "The carbonate environment in bone-mineral - A Resolution-Enhanced Fourier-Transform Infrared-Spectroscopy study", *Calcified Tissue International*, vol. 45, pp. 157-164, 1989

[30] S. Cazalbou, C. Combes, D. Eichert, C. Rey, "Adaptative physico-chemistry of bio-related calcium phosphates", *Journal of Materials Chemistry*, vol. 14, pp. 2148, 2004

[31] C. Rey, C. Combes, C. Drouet, H. Sfihi, A. Barroug, "Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: Implications for biominerals and biomaterials", *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems*, vol. 27, pp. 198-205, 2007

[32] D. Eichert, H. Sfihi, C. Combes, C. Rey, "Specific Characteristics of wet nanocrystalline apatites. Consequences on Biomaterials and Bone Tissue", *Key Engineering Materials*, vol. 254-256, pp. 927-930, 2003

[33] D. Eichert, C. Combes, C. Drouet, C. Rey, "Formation and Evolution of Hydrated Surface Layers of Apatites", *Key Engineering Materials*, vol. 284-286, pp. 3-6, 2005

[34] S.V. Dorozhkin, "Nanosized and nanocrystalline calcium orthophosphates", *Acta Biomaterialia*, vol. 6, pp. 715-734, 2010

[35] E.P Paschalis, E. Shane, G. Lyritis, G. Skarantavos, R. Mendelsohn, A. L. Boskey, "Bone Fragility and Collagen Cross-Links", *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 19, pp. 2000-2004, 2004

[36] S. Weiner, W. Traub, "Bone-Structure - From Angstroms to Microns", *Faseb Journal*, vol. 6, pp. 879-885, 1992

[37] W. S. S. Jee, "Structure and function of bone tissue," *Orthopaedics: Principles of Basic and Clinical Science*, 1999.

[38] S. Weiner, H. D. Wagner, "The material bone: Structure mechanical function relations," *Annual Review of Materials Science*, vol. 28, pp. 271-298, 1998

[39] Δ. Ι. Φωτιάδης, "Μηχανική οστών", Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Τμήμα επιστήμης υλικών.

[40] A. Bigi, G. Cojazzi, S. Panzavolta, A. Ripamonti, N. Roveri, M. Romanello, "Chemical and structural characterization of the mineral phase from cortical and trabecular bone", *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol. 68, pp. 45-51, 1997

- [41] H.H. Bayraktar, E.F. Morgan, G.L. Niebur, G.E. Morris, E.K. Wong, T.M. Keaveny, "Comparison of the elastic and yield properties of human femoral trabecular and cortical bone tissue", *Journal of Biomechanics*, vol. 37, pp. 27-35, 2004
- [42] Χ. Παπαγεωργοπούλου, "Ανατομία και ιστολογία του σκελετικού συστήματος του ανθρώπου", 2015
- [43] J. R. Ferraro, K. Nakamoto, "Introductory Raman Spectroscopy", Academic Press, 1994
- [44] J. Clark , "The fingerprint region of an infra – red spectrum", *Chemguide*, 2000
- [45] G. Hammes, "Spectroscopy for the biological sciences", Gordon, 2005
- [46] W. R. Browne, J. J. McGarvey, "The Raman effect and its application to electronic spectroscopies in metal-centered species: Techniques and investigations in ground and excited states", *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 251, pp.454-473, 2007
- [47] Holly J. Butler, Lorna Ashton etc, "Using Raman Spectroscopy to characterize biological materials", *Nature Protocols*, vol. 11, pp. 664-687, 2016.
- [48] D. A. Skoog, F. G. Holler, T. A. Nieman, "Principles of Instrumental Analysis", Saunders College Pub, 1998.
- [49] H. Kim, K. M. Kosuda, R. P. Van Duyne, P. C. Stair, "Resonance Raman and surface – and tip- enhanced Raman spectroscopy methods to study solid catalysts and heterogeneous catalytic reactions", *Chemical Society Reviews*, vol. 39, pp. 4820-4844, 2010
- [50] P. J. Larkin, "Infrared and Raman spectroscopy: principles and spectral interpretation", Elsevier, 2011
- [51] M. Votteler, et al., "Raman spectroscopy for the non-contact and non-destructive monitoring of collagen damage within tissues", *Journal of Biophotonics*, vol. 5, pp. 47-56, 2012
- [52] C. Krafft, G. Steiner, C. Beleites, R. Salzer, "Disease recognition by infrared and Raman spectroscopy", *Journal of Biophotonics*, vol. 2, pp. 13-28, 2009
- [53] R. Petry, M. Schmitt, J. Popp, "Raman Spectroscopy - A prospective tool in the life sciences", *Chemphyschem*, vol. 4, pp. 14-30, 2003
- [54] E. Smith, G Dent, "Modern Raman spectroscopy: a practical approach", vol. 71. United Kingdom: Wiley, 2005
- [55] D.A.Long, "Raman Spectroscopy ", McGraw-Hill, London, 1977
- [56] Ι.Ράπτης, "Συμπληρωματικές σημειώσεις για το εργαστήριο «Φασματοσκοπία Raman» ", Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Τμήμα Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών, Αθήνα 2016

- [57] L.A.Woodward, "Raman Spectroscopy - Theory and Practice", Plenum Press, NY, 1967
- [58] Dirac, "The Quantum Theory of Dispersion", Proceedings of the Royal Society, vol. 114A, pp. 710-728, 1927
- [59] O. Gamulin, et al., "Monitoring the healing process of rat bones using Raman spectroscopy", Journal of Molecular Structure, vol. 1044 pp. 308-313, 2013
- [60] J. Chan, S. Fore, S. Wachsmann-Hogiu, T. Huser, "Laser & Photon Reviews ", 2008
- [61] Δ. Ξενιώτη, "Μελέτη polycarbonate με φασματοσκοπία Raman", Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, Θεσσαλονίκη, 2010
- [62] S. Sasic, "Pharmaceutical applications of Raman spectroscopy", New Jersey : Wiley interscience, 2008
- [63] G. Penel, C. Delfosse, M. Descamps, G. Leroy, "Composition of bone and apatitic biomaterials as revealed by intravital Raman microspectroscopy", Bone, vol. 36, pp. 893–901, 2005
- [64] A.L. Dendramis, J.W. Poser, E.W. Schwinn, "Laser Raman spectroscopy of calf bone Gla protein", Biochimica et Biophysica Acta, vol. 742, pp. 525–529, 1983
- [65] J. Shen, L. Fan, J. Yang, A.G. Shen, J.M Hu, "A longitudinal Raman microspectroscopic study of osteoporosis induced by spinal cord injury", Osteoporos, vol. 21, pp. 81–87, 2010
- [66] B. Wopenka, A. Kent, J.D. Pasteris, Y. Yoon, S. Thomopoulos, "The tendon-to-bone transition of the rotator cuff: a preliminary Raman spectroscopic study documenting the gradual mineralization across the insertion in rat tissue samples", Applied Spectroscopy, vol. 62, pp. 1285–1294, 2008
- [67] D. Morris, G. S. Mandair, "Raman Assessment of Bone Quality", Clinical Orthopaedics and Related Research, vol. 469, pp. 2160-2169, Aug 2011
- [68] K. S. Gamsjager, E. Paschalis, P. Fratzl, Y. K. Min, S. Naito, H. Yamazaki, E. Kohda, H. Hamaguchi, "Medical applications", Raman Spectroscopy for Soft Matter Applications, pp. 225-301, 2009
- [69] H. P. Baechinger, " Structure stability and folding of collagen triple helix", Topics in Current Chemistry: Collagen Primer in Structure, Processing and Assembly, pp. 7-33, 2005
- [70] A. Esmonde-White, F. W. L. Esmonde-White, M. D. Morris, B. J. Roessler, "Fiber-optic Raman spectroscopy of joint tissues", Analyst, vol. 136, pp. 1675-1685, 2011

- [71] G. Penel, G. Leroy, C. Rey, E. Bres, "MicroRaman spectral study of the PO₄ and CO₃ vibrational modes in synthetic and biological apatites", *Calcified Tissue International*, vol. 63, pp. 475-481, Dec 1998
- [72] J. J. Carcamo, A. E. Aliaga, E. Clavijo, M. Branes, M. M. Campos-Vallette, "Raman and surface-enhanced Raman scattering in the study of human rotator cuff tissues after shock wave treatment", *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 43, pp. 248-254, Feb 2012
- [73] A. Awonusi, M. D. Morris, M. M. J. Tecklenburg, "Carbonate assignment and calibration in the raman spectrum of apatite", *Calcified Tissue International*, vol. 81, pp. 46-52, Jul 2007
- [74] A. Dehring, N. J. Crane, A. R. Smukler, J. B. McHugh, B. J. Roessler, M. D. Morris, "Identifying chemical changes in subchondral bone taken from murine knee joints using Raman spectroscopy", *Applied Spectroscopy*, vol. 60, pp. 1134-1141, Oct 2006
- [75] G. Penel, C. Delfosse, M. Descamps, G. Leroy, "Composition of bone and apatitic biomaterials as revealed by intravital Raman microspectroscopy", *Bone*, vol. 36, pp. 893-901, May 2005
- [76] J. J. Carcamo, A. E. Aliaga, E. Clavijo, M. Branes, M. M. Campos-Vallette, "Raman and surface-enhanced Raman scattering in the study of human rotator cuff tissues after shock wave treatment", *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 43, pp. 248-254, Feb 2012
- [77] J. Bandekar, "Amide Modes and Protein Conformation", *Biochimica Et Biophysica Acta*, vol. 1120, pp. 123-143, Apr 8 1992
- [78] K. A. Dehring, N. J. Crane, A. R. Smukler, J. B. McHugh, B. J. Roessler, M. D. Morris, "Identifying chemical changes in subchondral bone taken from murine knee joints using Raman spectroscopy", *Applied Spectroscopy*, vol. 60, pp. 1134-1141, Oct 2006
- [79] E.P. Paschalis, et al., "Spectroscopic characterization of collagen cross-links in bone", *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 16, pp. 1821-1828, 2001
- [80] C. David, "Raman Spectroscopy for proteins", HORIBA Scientific, 2012
- [81] J.C. Fritton, M.B. Schaffler, "Bone Quality", *Osteoporosis*, Elsevier, 2008
- [82] B. R. McCreadie, M. D. Morris, T. C. Chen, D. S. Rao, W. F. Finney, E. Widjaja, et al., "Bone tissue compositional differences in women with and without osteoporotic fracture", *Bone*, vol. 39, pp. 1190-1195, Dec 2006

- [83] O. Akkus, F. Adar, M.B. Schaffler, "Age-related changes in physicochemical properties of mineral crystals are related to impaired mechanical function of cortical bone", *Bone*, vol. 34, pp. 443-453, 2004
- [84] E.P. Paschalis, "Fourier transform infrared analysis and bone", *Osteoporosis International*, vol. 20, pp. 1043-1047, 2009
- [85] E.P. Paschalis, R. Mendelsohn, A.L. Boskey, "Infrared Assessment of Bone Quality: A Review", *Clinical Orthopaedics and Related Research*, vol. 469, pp. 2170-2178, 2011
- [86] D.H. Kohn, N.D. Sahar, J.M. Wallace, K. Golcuk, M.D. Morris, "Exercise alters mineral and matrix composition in the absence of adding new bone", *Cells Tissues Organs*, vol. 189, pp. 33-37, 2008
- [87] T. Topoliński, A. Cichański, A. Mazurkiewicz, K. Nowicki, "Study of the behavior of the trabecular bone under cyclic compression with stepwise increasing amplitude", *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, vol. 4, pp. 1755–1763, 2011
- [88] H. Yuehuei, Kylie L. Martin, "Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage", Humana Press, , New York, 2003
- [89] C.E. Margo, A. Lee, "Fixation of whole eyes: the role of fixative osmolarity in the production of tissue artifact", *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, vol. 233, pp. 366–370, 1995
- [90] I. Eltoum, J. Fredenburgh, R.B. Myers, et al, "Introduction to the theory and practice of fixation of tissues", *Journal of Histotechnology*, vol. 24, pp. 173–190, 2001
- [91] [https://en.wikipedia.org/wiki/Fixation_\(histology\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Fixation_(histology))
- [92] W.E. Grizzle, R.B. Myers, U. Manne, et al., "Immunohistochemical evaluation of biomarkers in prostatic and colorectal neoplasia", *Methods in Molecular Medicine Series—Tumor Marker Protocols*, vol.14, Humana Press, Totowa, NJ, 1998
- [93] M.M. Arnold, S. Srivastava, J. Fredenburgh, et al., "Effects of fixation and tissue processing on immunohistochemical demonstration of specific antigens", *Biotechnic & Histochemistry*, vol. 71, pp. 224–230, 1996
- [94] A. Preece, "A manual for Histologic Technicians", London, Great Britain, pp.31–55, 1972
- [95] H. Puchtler, S. N. Meloan, "On the chemistry of formaldehyde fixation and its effects on immunohistochemical reactions", *Histochemistry*, vol. 82, pp. 201–204, 1985
- [96] G. S. Mandair, M. D. Morris, "Contributions of Raman spectroscopy to the understanding of bone strength", *BoneKEy Rep*, vol. 4, pp. 620, 2015

- [97] Y. Takahashi, T. Shishido, K. Yamamoto, Y. Sawaji, J. Nishida, G. Pezzotti, "Do formalin fixation and freeze-thaw affect near-infrared Raman spectroscopy of cartilaginous tissue? A preliminary ex vivo analysis of native human articular cartilage", *Journal Raman Spectroscopy*, 2015
- [98] S. R. Shi, Y. Shi, C. R. Taylor, "Antigen retrieval immunohistochemistry: review and future prospects in research and diagnosis over two decades", *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, vol. 59, pp. 13–32, 2011
- [99] Imke A.K. Fiedler, M. Casanova, T. Keplinger, B. Busse, R. Müller, "Effect of short-term formaldehyde fixation on Raman spectral parameters of bone quality", *Journal of Biomedical Optics*, vol. 23, 2018
- [100] A. P. Kusumbe, et al., "Sample preparation for high-resolution 3D confocal imaging of mouse skeletal tissue", *Nature Protocols*, vol. 10, pp. 1904–1914, 2015
- [101] Y.N. Yeni, J. Yerramshetty, O. Akkus, C. Pechey, C.M. Les, "Effect of fixation and embedding on Raman spectroscopic analysis of bone tissue", *Calcified Tissue International*, vol. 78, pp. 363–371, 2006
- [102] N. L. Pleshko, A. L. Boskey, R. Mendelsohn, "An FT-IR microscopic investigation of the effects of tissue preservation on bone", *Calcified Tissue International*, vol. 51, pp. 2–77, 1991
- [103] K. Muldrew, K. Novak, H. Yang, R. Zernicke, N. S. Schachar, L. E. McGann, "Cryobiology of articular cartilage: ice morphology and recovery of chondrocytes", *Cryobiology*, vol. 40, pp. 102–109, 2000.
- [104] J.D. P. McElderry, M. R. Kole, M.D. Morris, "Repeated freeze-thawing of bone tissue affects Raman bone quality measurements", *Journal of Biomedical Optics*, vol. 16, July 2011

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ (B)

Κεφάλαιο 5

5.1. Συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων

5.1.1. Συλλογή δειγμάτων

Για τη πραγματοποίηση της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν οστά τα οποία συλλέχθηκαν από δύο διαφορετικά πτηνά (όρνιθες). Συγκεκριμένα, λίγες ώρες μετά τη σφαγή των πτηνών, με τη χρήση χειρουργικού νυστεριού έγινε η αφαίρεση των μαλακών ιστών και μυών που περιέβαλε τα οστά και η απομόνωση αυτών. Η λήψη των πτηνών δεν ήταν δυνατή να επιτευχθεί ακριβώς την ώρα της θανάτωσης, αλλά λίγες ώρες αργότερα. Και στις δύο περιπτώσεις είχε προηγηθεί η φύλαξη τους σε ενισχυμένη συντήρηση, για τη διατήρησή τους, σε νωπή κατάσταση και την αποφυγή της σήψης για διάστημα μικρότερο των 12 ωρών, μέχρι την τελική εξαγωγή των οστών.

Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις κνήμες που ελήφθησαν από τα πτηνά, όπου με χρήση ειδικού τροχού τα οστά τεμαχίστηκαν σε όμοια μέρη μικρότερων διαστάσεων. Αρχικά, με τη χρήση του τροχού αποκόπηκαν τα τμήματα των επιφύσεων του οστού της κνήμης και αφαιρέθηκαν οι χόνδροι, έτσι ώστε τα δείγματα τα οποία θα χρησιμοποιούσαμε να προέρχονται μόνο από τμήματα των αντίστοιχων διαφύσεων. Η τμηματοποίηση έγινε με εγκάρσιες-επιμήκειες τομές και ο τελικός όγκος των δειγμάτων δεν ξεπερνούσε τα $2-3 \text{ mm}^3$. Ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων που συλλέχθηκαν ήταν ίσος με $N=20$ από κάθε κνήμη. Στην Εικόνα 16 απεικονίζονται τέσσερα από τα δείγματα που συλλέχθηκαν.



Εικόνα 16: Οστικά δείγματα πτηνών.

Τα δείγματα πριν την τμηματοποίηση τους υποβλήθηκαν σε διαδικασία καθαρισμού. Τα οστά ως πορώδη υλικά φέρουν μυελό των οστών και λιπίδια τα οποία αν δεν αφαιρεθούν συμμετέχουν στο σήμα Raman. Για την απομάκρυνση των ανεπιθύμητων ουσιών, τα οστά μετά την αφαίρεση των επιφύσεων, βυθίστηκαν σε αποσταγμένο νερό και αναδεύτηκαν για λίγα λεπτά. Στη συνέχεια, οι διαφύσεις των οστών, απομακρύνθηκαν από το νερό, φυγοκεντρήθηκαν για περίπου 2 min ($N_{\text{στροφών}} = 1400$), ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα. Συνολικά τα οστά υποβλήθηκαν σε πέντε κύκλους φυγοκεντρήσεων, διάρκειας 2 λεπτών η καθεμία και κατόπιν σε επιπλέον 2 φυγοκεντρήσεις διάρκειας τεσσάρων και δέκα λεπτών, έτσι ώστε να καθαριστεί ολικά το κάθε οστό και να καθίσταται πιο εύκολη η κοπή του περιόστεου. Σημειώνεται, ότι μεταξύ των φυγοκεντρήσεων έγινε εμβάπτιση των οστών ξανά σε αποσταγμένο, νερό και ακολούθησε ανάδευση.

5.1.2. Προετοιμασία διαλυμάτων

Απαραίτητο βήμα πριν τη συλλογή των δειγμάτων ήταν η προετοιμασία των διαλυμάτων στα οποία θα γινόταν άμεσα η αποθήκευση, συντήρηση και σταθεροποίηση αυτών. Πιο αναλυτικά, τα διαλύματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ήταν διάλυμα: φορμαλίνης, φορμαλδεΰδης (37%), αιθανόλης, φυσιολογικού ορού (0.9% saline solution) και το ρυθμιστικό διάλυμα PBS (phosphate buffered solution).

Για τα διαλύματα φορμαλίνης και αιθανόλης ισχύουν τα εξής :

- Για τη σύνθεση 50 mL διαλύματος 10 % ουδέτερα ρυθμισμένης φορμαλίνης (NBF), 10% v/v, έγινε η ανάμειξη 5 mL φορμαλδεΐδης (37%) με 45 mL αποσταγμένου νερού.
- Για το διάλυμα αιθανόλης (EtOH) δημιουργήθηκαν τρία διαλύματα των 10 mL (20% v/v, 50% v/v, 80% v/v) στα οποία έγινε διαδοχική εμβάπτιση των οστών.

5.1.3. Κατάταξη δειγμάτων σε ομάδες

Το πειραματικό πρωτόκολλο περιελάμβανε τον διαχωρισμό των ομάδων στις οποίες κατατάχθηκαν τα δείγματα, ανάλογα με το είδος της επεξεργασίας – συντήρησης στο οποίο υποβλήθηκαν και στο χρονικό διάστημα στο οποίο διήρκησε η αποθήκευση μέχρι την μέτρηση με τη μέθοδο της φασματοσκοπίας.

Τα δείγματα λήφθηκαν από τις δύο κνήμες των δύο πτηνών. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα σε κάθε ομάδα να υπάρχουν δύο δείγματα από το κάθε πτηνό (σύνολο 4 διαφορετικά), εκ των οποίων ένα προέρχεται από την αριστερή πλευρά και ένα από τη δεξιά. Συνολικά μελετήθηκαν 120 οστικά δείγματα τα οποία διαχωρίστηκαν στις ακόλουθες ομάδες.

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο οι 13 ομάδες που προέκυψαν αναφέρονται ως εξής :

1. Οστά χωρίς επεξεργασία (Fresh- Control)
2. Αποθήκευση σε ατμοσφαιρικό αέρα
3. Σταθεροποίηση με 10% Φορμαλίνη, NBF
4. Σταθεροποίηση με Φορμαλίνη και εμβάπτιση σε PBS
5. Σταθεροποίηση με 37% Φορμαλδεΐδη
6. Σταθεροποίηση με Φορμαλδεΐδη και εμβάπτιση σε PBS
7. Αποθήκευση σε Φυσιολογικό Ορό (0.9 % Saline Solution)
8. Σταθεροποίηση με 100% Αιθανόλη
9. Ψύξη – Απόψυξη (Freeze – thaw)
10. Ψύξη – Απόψυξη και εμβάπτιση σε PBS
11. Πολλαπλοί κύκλοι Ψύξης – Απόψυξης (Multiple Freeze – thaw cycles)
12. Στιγμιαία ψύξη και συμπληρωματική κατάψυξη (Snap Freezing)
13. Στιγμιαία ψύξη και εμβάπτιση σε PBS

Επιπλέον, τα δείγματα, όπως προαναφέρθηκε, διαχωρίστηκαν με κριτήριο το χρονικό διάστημα στο οποίο παρέμειναν αποθηκευμένα μέχρι την ακτινοβόληση τους. Δεν υποβλήθηκαν όλα τα δείγματα στα ίδια χρονικά διαστήματα συντήρησης. Μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν απευθείας μετά τη λήψη των δειγμάτων ($t_0 = t_{0d}$),

στις 24 ώρες (t1d), στη μία εβδομάδα (t1w), στον έναν μήνα (t1m) και στους δύο μισή μήνες (t2.5m).

Με σκοπό την αποφυγή αλλοιώσεων λόγω της ακτινοβολήσης, όπως για παράδειγμα ανάπτυξη θερμικών φαινομένων [1], τα οστά που μελετήθηκαν σε κάθε ομάδα ήταν διαφορετικά, για τα διαφορετικά χρονικά διαστήματα αποθήκευσης. Ειδικότερα, το laser μπορεί να προκαλέσει τοπική αύξηση της θερμοκρασίας στην επιφάνεια του δείγματος, κατά την ακτινοβολήση της ίδιας περιοχής ενδιαφέροντος, και τελικά κάποιες τροποποιήσεις και αλλοιώσεις της φασματοσκοπικής του εικόνας.

Μελετώντας μοντέλα θερμικής μεταφοράς, έχει καταγραφεί ότι το φάσμα Raman μπορεί να σχετίζεται με τη θερμική αγωγιμότητα του υπό εξέταση υλικού. Στο επίπεδο η μεταφορά θερμότητας γίνεται σημαντική όταν το σημείο της θέρμανσης είναι αρκετά μικρό, με αποτέλεσμα την κρίσιμη αύξηση της θερμοκρασίας [1].

Όσον αφορά, τις μετατοπίσεις Raman (Raman shift) και τη θέση των κορυφών, επηρεάζονται από τις αλλαγές της θερμοκρασίας, καθώς υπάρχει γραμμική συσχέτιση μεταξύ των Raman shift των Stokes κορυφών και της θερμοκρασίας του δείγματος [1]. Με την αύξηση της θερμοκρασίας το πλάτος της γραμμής διευρύνεται και η ένταση της κορυφής μειώνεται.

Το μικρό μέγεθος των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη, το οποίο είναι της τάξης των mm, δεν επιτρέπει τον εύκολο προσδιορισμό διαφορετικού σημείου εστίασης της δέσμης, με σκοπό την αποφυγή της υπέρ έκθεσης κάποιου σημείου και έτσι είναι αρκετά πιθανή η επαναλαμβανόμενη ακτινοβολήση της ίδιας περιοχής. Όμως, τα διαφορετικά δείγματα τα οποία τοποθετήθηκαν στην ίδια ομάδα προήλθαν από ίδιες περιοχές των διαφύσεων, με αποτέλεσμα να μην παρουσιάζουν αλλαγές ως προς τη σύνθεση και τη δομή τους. Αυτό σημαίνει ότι η διερεύνηση διαφορετικών δειγμάτων κάθε φορά δεν επηρεάζει άμεσα τη συγκριτική μελέτη.

Παρακάτω καταγράφονται αναλυτικά οι συνθήκες επεξεργασίας - αποθήκευσης και ακτινοβολήσης των δειγμάτων που ανήκουν στις ομάδες που προαναφέρθηκαν.

Οστά χωρίς επεξεργασία (controls)

Τα δείγματα αυτής της ομάδας υποβλήθηκαν σε σκέδαση Raman λίγες ώρες μόνο μετά τη συλλογή τους, χωρίς να έχουν υποστεί κάποια επιπλέον επεξεργασία. Τα δείγματα εκτέθηκαν σε συνθήκες περιβάλλοντος για διάστημα μικρότερο των δύο ωρών. Εξετάστηκαν τέσσερα δείγματα σε χρόνο $t_0 = 0d$. Τα οστά αυτά αποτελούν δείγματα ελέγχου (control) και τα φάσματα τους χαρακτηρίζονται ως φάσματα αναφοράς και χρησιμοποιούνται για τη σύγκριση με τα φάσματα των υπόλοιπων

ομάδων, ώστε να διεξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με τις τροποποιήσεις που υφίστανται αυτά κατά τη διαδικασία συντήρησης.

Αποθήκευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος

Σε αυτή τη περίπτωση τα δείγματα μετά τη συλλογή τους αφέθηκαν σε συνθήκες δωματίου χωρίς να έχουν υποστεί κάποια επεξεργασία, με τη χρήση διαλύτη ή κατάψυξης για αποθήκευση. Τα οστά σκεπάστηκαν σε ένα τρυβλίο και παρέμειναν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος σε σκιερό μέρος. Οι μετρήσεις Raman λήφθηκαν στα χρονικά διαστήματα t0d, t1w, t1 m, t2.5 m.

Σταθεροποίηση με 10% Φορμαλίνη, NBF

Τα δείγματα που ανήκουν σε αυτή την ομάδα υποβλήθηκαν σε σταθεροποίηση με τη χρήση 10% ρυθμιστικά ουδέτερης φορμαλίνης. Μετά τη συλλογή τους, τα οστικά δείγματα κατατάχθηκαν ανάλογα με το χρονικό διάστημα στο οποίο παρέμειναν στη φορμαλίνη μέχρι την στιγμή της φασματοσκοπικής ανάλυσης. Με άλλα λόγια, σε κάθε υποομάδα υπήρχαν τέσσερα δείγματα, τα οποία αποθηκεύτηκαν σε φορμαλίνη για διάστημα 24 ωρών, μίας εβδομάδας, ενός και δυόμισι μηνών. Τα δείγματα κλείστηκαν αεροστεγώς σε κατάλληλη συσκευασία και μετά τη πάροδο του αντίστοιχου χρονικού διαστήματος, αφαιρέθηκαν από το σταθεροποιητικό με τη χρήση ειδικής λαβίδας. Στη συνέχεια, μετά τη προσεκτική αφαίρεση των υπολειμμάτων της φορμαλίνης μέσω της φυγοκέντρωσης (διάρκειας 2 min) και τη παραμονή τους για όσο το δυνατό μικρότερο διάστημα σε συνθήκες περιβάλλοντος και θερμοκρασία δωματίου (RT), εκτέθηκαν στη φασματοσκοπική διάταξη για τη λήψη των αντίστοιχων φασμάτων Raman.

Σταθεροποίηση με Φορμαλίνη και εμβάπτιση σε PBS

Στην ομάδα αυτή ανήκουν τα δείγματα της προηγούμενης ομάδας τα οποία είχαν σταθεροποιηθεί σε διάλυμα φορμαλίνης, με τη διαφορά ότι μετά την ακτινοβολήση των δειγμάτων αυτά βυθίστηκαν για μικρό χρονικό διάστημα σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Η εμβάπτιση στο διάλυμα έγινε λόγω της ρυθμιστικής ικανότητας του και με σκοπό την αποκατάσταση του pH των δειγμάτων και την ενυδάτωση τους, για αποφυγή της διάλυσης του απατίτη [2,3,4]. Η παραμονή των δειγμάτων στο διάλυμα δεν ξεπέρασε τα 10 min. Ακολούθως, αφαιρέθηκαν, φυγοκεντρήθηκαν (t=10min) και επανεξετάστηκαν με φασματοσκοπία Raman.

Σταθεροποίηση με 37% Φορμαλδεΰδη

Τα δείγματα της συγκεκριμένης ομάδας σταθεροποιήθηκαν με παρόμοιο τρόπο με τα δείγματα της ομάδας όπου έγινε χρήση της φορμαλίνης, με τη διαφορά ότι τώρα αποθηκεύτηκαν σε διάλυμα 37% φορμαλδεΰδης. Ακόμα, σε αντίθεση με τη προηγούμενη μελέτη όπου σε κάθε υποομάδα υπήρχαν διαφορετικά δείγματα, εδώ

λόγω έλλειψης δειγμάτων, έγινε η χρήση ενός μόνο οστού από κάθε κατηγορία και όχι διαφορετικά. Με άλλα λόγια, τα δείγματα τοποθετήθηκαν αρχικά σε αεροστεγή συσκευασία γεμάτη με φορμαλδεΰδη, όπου παρέμειναν μέχρι την πρώτη μέτρηση Raman. Στη συνέχεια, αφαιρέθηκαν από το διάλυμα και όμοια με πριν φυγοκεντρήθηκαν και ακτινοβολήθηκαν για τη λήψη των αντίστοιχων φασμάτων. Κατόπιν, έγινε η εμβάπτιση τους σε διάλυμα PBS για έκπλυση και ακολούθησε ξανά η πειραματική διαδικασία της φασματοσκοπίας. Ακολούθως, τα δείγματα φυλλάχθηκαν σε διάλυμα φορμαλδεΰδης μέχρι την επόμενη μέτρηση τους. Καταγραφές φασμάτων Raman έγιναν για τα χρονικά διαστήματα t1w, t1m, t2.5m.

Σταθεροποίηση με Φορμαλδεΰδη και εμβάπτιση σε PBS

Τα δείγματα τα οποία σταθεροποιήθηκαν με τη χρήση φορμαλδεΰδης, ύστερα από την απομάκρυνση τους από το διάλυμα φορμαλδεΰδης και την αρχική ακτινοβολήση στην οποία υποβλήθηκαν εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα PBS για διάστημα περίπου ίσο με t=10 min με σκοπό την ενυδάτωση τους και την απομάκρυνση των υπολειμμάτων φορμαλδεΰδης. Στη συνέχεια, φυγοκεντρήθηκαν για t=10min και επανεξετάστηκαν με φασματοσκοπία Raman. Όπως αναφέρθηκε και προηγούμενα, λόγω της έλλειψης δειγμάτων τα συγκεκριμένα οστά επανατοποθετήθηκαν σε φορμαλδεΰδη μέχρι την επόμενη μέτρηση τους, όπου επαναλήφθηκε η διαδικασία.

Αποθήκευση σε Φυσιολογικό Ορό (0.9 % Saline Solution)

Σε αυτή τη περίπτωση τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε διάλυμα φυσιολογικού ορού για τα χρονικά διαστήματα t0d, t1w, t1m και t2.5m. Τα οστά κλείστηκαν αεροστεγώς και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Κατά την απομάκρυνση των οστών από τον ορό έγινε η φυγοκέντρωση τους για t=2min. Στη συνέχεια, σε σύντομο χρονικό διάστημα υποβλήθηκαν σε ανάλυση.

Σταθεροποίηση με 100% Αιθανόλη (EtOH)

Τα δείγματα αυτής της ομάδας υποβλήθηκαν σε διαδοχικούς κύκλους αλλαγής αιθανόλης, με σκοπό τη σταδιακή και ομαλή αντικατάσταση του νερού από την αιθανόλη. Αυτό επιτεύχθηκε αρχικά με την βύθιση των οστών σε διάλυμα το οποίο περιείχε 20% αιθανόλη και 80% νερό. Στη πορεία, έγινε εναλλαγή των διαλυμάτων και τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε δοχείο το οποίο έφερε 50% αιθανόλη και 50% νερό. Ακολούθησε, βύθιση σε διάλυμα 80% αιθανόλης και 20% νερού. Τελικά, τα οστά απομακρύνθηκαν και αποθηκεύτηκαν αεροστεγώς σε διάλυμα 100% αιθανόλης όπου και παρέμειναν για διάστημα μιας εβδομάδας (t1w), σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά τη πάροδο της εβδομάδας, τα οστά αφαιρέθηκαν από την αιθανόλη, φυγοκεντρήθηκαν για t=2min και τελικά αναλύθηκαν με τη μέθοδο της φασματοσκοπίας. Σημειώνεται ότι τα δείγματα παρέμειναν σε κάθε

διάλυμα για διάστημα 30 λεπτών, μέχρι την τοποθέτηση τους στο επόμενο δοχείο με το αντίστοιχο διάλυμα αιθανόλης. Στη συνέχεια, μετά τη μέτρηση των οστών, αυτά επιστράφηκαν για αποθήκευση σε διάλυμα αιθανόλης, όπου σφραγίστηκαν σε αεροστεγή συσκευασία. Τα δείγματα αφαιρέθηκαν, φυγοκεντρήθηκαν και μετρήθηκαν ξανά για t_{1m} και $t_{2.5m}$.

Ψύξη – Απόψυξη (Freeze – thaw)

Τα δείγματα της ομάδας λίγο μετά την συλλογή τους από τα πτηνά κλείστηκαν αεροστεγώς σε συσκευασίες και αποθηκεύτηκαν σε συνθήκες κατάψυξης στους -20°C . Μετά τη πάροδο ενός μήνα (t_{1m}) τα οστά απομακρύνθηκαν από τη κατάψυξη και αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να έρθουν σε ισορροπία με τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Στη συνέχεια, τα δείγματα μελετήθηκαν με φασματοσκοπία Raman και αποθηκεύτηκαν εκ νέου στους -20°C . Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε μετά από συνολικό χρόνο αποθήκευσης δυόμιση μηνών από τη στιγμή έναρξης του πειράματος. Μετά τις μετρήσεις τα δείγματα καταψύχθηκαν εκ νέου.

Ψύξη – Απόψυξη και εμβάπτιση σε PBS

Η ομάδα αυτή αποτελείται από τα δείγματα της προηγούμενης ομάδας, με τη διαφορά ότι μετά την τελική απομάκρυνση και απόψυξη των οστών στους δυόμιση μήνες, βυθίστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS, για την ενυδάτωση τους, για χρονικό διάστημα $t=10\text{min}$. Κατόπιν, φυγοκεντρήθηκαν για περίπου 2min και υποβλήθηκαν σε ανάλυση.

Πολλαπλοί κύκλοι Ψύξης – Απόψυξης (Multiple Freeze – thaw cycles)

Σε αυτή την ομάδα μελέτης ανήκουν δείγματα τα οποία υποβλήθηκαν σε διαδοχικούς κύκλους ψύξης – απόψυξης. Πιο συγκεκριμένα, τα οστά μετά τη συλλογή τους αποθηκεύτηκαν, αεροστεγώς κλεισμένα, σε κατάψυξη στους -20°C και μετρήθηκαν με τη μέθοδο της φασματοσκοπίας, μετά τη πάροδο χρονικού διαστήματος t_{0d} , t_{1w} , t_{1m} και $t_{2.5m}$. Πριν από κάθε μέτρηση τα δείγματα αφαιρέθηκαν από τη κατάψυξη και αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου προς απόψυξη. Κάθε φορά τα δείγματα που δεν επρόκειτο να καταμετρηθούν την αντίστοιχη μέρα, παρέμεναν για περίπου μισή ώρα εκτός κατάψυξης και στη συνέχεια επανατοποθετούνταν στις συνθήκες τις προηγούμενης αποθήκευσης τους. Ενώ τα δείγματα που αντιστοιχούσαν στην ημέρα της μέτρησης παρέμεναν εκτός ψύξης μέχρι να επέλθει πλήρης ισορροπία με τη θερμοκρασία περιβάλλοντος και τελικά να ακτινοβοληθούν. Εδώ δε έγινε η χρήση ρυθμιστικού διαλύματος PBS.

Στιγμαία ψύξη και συμπληρωματική κατάψυξη (Snap Freezing)

Τα οστά που αποτελούν την ομάδα αρχικά ψύχθηκαν στιγμιαία με τη χρήση υγρού αζώτου σε θερμοκρασία -198°C . Για την πραγματοποίηση της ψύξης τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο υγρό άζωτο για διάστημα μικρότερο των δύο λεπτών. Στη συνέχεια, απομακρύνθηκαν και αποθηκεύτηκαν για συντήρηση σε συνθήκες κατάψυξης στους -20°C . Μετά τη πάροδο ενός μήνα (t_{1m}), τα δείγματα απομακρύνθηκαν από τη κατάψυξη, αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να επέλθει η απόψυξη τους και τέλος ακτινοβολήθηκαν.

Στιγμαία ψύξη και εμβάπτιση σε PBS

Τα δείγματα της ομάδας καθώς απομακρύνθηκαν από τα πτηνά και απευθείας ψύχθηκαν με τη χρήση υγρού αζώτου, με τρόπο παρόμοιο με αυτόν που περιγράφηκε παραπάνω. Στην συνέχεια αμέσως μετά τη στιγμιαία ψύξη τους βυθίστηκαν για λίγα λεπτά σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS, με σκοπό την ενυδάτωση τους. Τέλος, αφαιρέθηκαν από το διάλυμα, φυγοκεντρήθηκαν για $t=2\text{min}$ και εκτέθηκαν στην ακτινοβολία του laser της φασματοσκοπίας για την καταγραφή των αντίστοιχων φασμάτων ($t_0=0\text{d}$).

Στο παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά, οι ομάδες στις οποίες διαχωρίστηκαν τα δείγματα, ο αριθμός των δειγμάτων που ανήκουν στη κάθε ομάδα, οι αντίστοιχοι χρόνοι συντήρησης, καθώς και οι τεχνικές επεξεργασίας τους πριν την φασματοσκοπική ανάλυση.

Πίνακας 2: Ομάδες δειγμάτων και ο τρόπος επεξεργασίας.

ΟΜΑΔΑ	ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ (N)	ΧΡΟΝΙΚΟ ΔΙΑΣΤΗΜΑ (t)
Fresh (control)	Απευθείας μέτρηση Raman	4	0d
Air	Αποθηκεύονται σε RT	16	1d, 1w, 1m, 2.5 m
Formalin Fixation	Σταθεροποίηση με διάλυμα φορμαλίνης	16	1d, 1w, 1m, 2.5 m
Formalin Fixation + PBS	Σταθεροποίηση με φορμαλίνη - Raman - βύθιση σε PBS	16	1d, 1w, 1m, 2.5 m
Formaldehyde Fixation	Σταθεροποίηση σε διάλυμα φορμαλδεύδης	4	1 w, 1m, 2.5 m
Formaldehyde Fixation + PBS	Σταθεροποίηση σε διάλυμα φορμαλδεύδης - Raman - βύθιση σε PBS	4	1 w, 1m, 2.5 m
Saline Soaked Fixation	Αποθήκευση σε διάλυμα φυσιολογικού ορού	16	1d, 1w, 1m, 2.5 m
Ethanol Fixation	Διαδοχικοί κύκλοι αλλαγής αιθανόλης - αποθήκευση σε 100% αιθανόλη	4	1 w, 1m, 2.5 m
Freeze - Thaw	Αποθήκευση στους -20°C	4	1m, 2.5m
Freeze - Thaw + PBS	Αποθήκευση στους -20°C - Raman - βύθιση σε PBS	4	1m, 2.5m
Multiple Freeze - Thaw Cycles	Αποθήκευση στους -20°C - Διαδοχικοί κύκλοι ψύξης- απόψυξης	16	1d, 1w, 1m, 2.5 m
Snap Freezing	Ψύξη με χρήση υγρού αζώτου - Αποθήκευση στους -20°C	4	1m
Snap Freezing + PBS	Ψύξη με χρήση υγρού αζώτου - βύθιση σε PBS	4	0d

5.2.Συλλογή φασμάτων Raman

Για τη καταγραφή των φασμάτων χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπική διάταξη Raman του εργαστηρίου Ιατρικής Φυσικής του Π. Ι (Εικόνα 17).



Εικόνα 17: Φασματοσκοπική διάταξη, i - Raman plus.

Το laser εκπομπής είναι laser διόδου το οποίο εκπέμπει στη περιοχή του ορατού (785 nm). Η χρήση του συγκεκριμένου μήκους κύματος laser επιτυγχάνει καλή ισορροπία ανάμεσα στην εμφάνιση φθορισμού σε βιολογικά δείγματα (σημαντικό μειονέκτημα σε μικρότερα μήκη κύματος), στην εξασθένηση του σήματος και στην απόδοση του ανιχνευτή CCD (η οποία μειώνεται σημαντικά για μεγαλύτερα μήκη κύματος laser). Συγκεκριμένα, τα NIR laser (με εύρος συχνοτήτων διέγερσης από ορατά έως σχεδόν υπέρυθρα μήκη κύματος), δημιουργούν χαμηλότερες εντάσεις αυτόματου φθορισμού σε σύγκριση με τη διέγερση με ορατό φως, αλλά ταυτόχρονα χαμηλότερη ένταση σκέδασης, με αποτέλεσμα χαμηλότερη ευαισθησία και συνεπώς χαμηλότερη αναλογία σήματος προς θόρυβο. Οι πηγές laser στα 785 nm προτιμώνται για κλινικές εφαρμογές Raman καθώς η λειτουργία σε αυτά τα μήκη κύματος συνδυάζει μειωμένο αυτόματο φθορισμό, επαρκές βάθος διείσδυσης ιστού και ικανοποιητικούς χρόνους απόκτησης φασμάτων [5].

Για τη λήψη των φασμάτων, το κάθε δείγμα τοποθετείται κάθετα ως προς τη προσπίπτουσα ακτινοβολία, στην ειδική τράπεζα της διάταξης. Η τράπεζα παρέχει τη δυνατότητα μετακίνησης του δείγματος, με τη χρήση ειδικού βερνιέρου, ώστε να επιτυγχάνεται η επιθυμητή περιοχή ακτινοβολήσης. Σημαντικός παράγοντας για την απόκτηση και επίτευξη καλού σήματος αποτελεί η βέλτιστη εστίαση του ίχνους της προσπίπτουσας ακτινοβολίας στο δείγμα.

Μετά την επιλογή του βέλτιστου σημείου εστίασης την προσπίπτουσας ακτινοβολίας, έγινε η καταγραφή των αντίστοιχων φασμάτων Raman. Η ένταση της ακτινοβολίας επιλέχθηκε και παρέμεινε σταθερή για όλα τα δείγματα στο 60 % της μέγιστης έντασης του laser και η διάρκεια της ακτινοβολήσης ισούται με 6 sec σε κάθε σάρωση, με spot size ακτίνας ίσο με 200 μm . Συνολικά λήφθηκαν 5 φάσματα από κάθε δείγμα, με το σημείο εστίασης της δέσμης στο οστό να τροποποιείται στις περισσότερες μετρήσεις, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται στατιστική μεταβλητότητα. Σημειώνεται, ότι από τα 5 φάσματα που καταγράφηκαν για κάθε δείγμα, υπολογίστηκε ο μέσος όρος (average) αυτών, με σκοπό τη περαιτέρω ανάλυση του τελικού φάσματος που προκύπτει.

Η καταγραφή των φασμάτων γίνεται γραμμικά ως προς τη συχνότητα της ακτινοβολίας. Στη δονητική φασματοσκοπία τα φάσματα συνήθως παραλαμβάνονται σε μονάδες κυματάριθμων (wave-numbers), που ορίζονται ως $\omega \text{ (cm}^{-1}\text{)} = \frac{1}{\lambda}, \lambda \text{ (cm)}$.

Συμπληρωματικά με τις μετρήσεις των οστών έγινε και η καταγραφή των φασμάτων των αντίστοιχων διαλυμάτων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την σταθεροποίηση-αποθήκευση των οστών. Τα διαλύματα της φορμαλίνης, φορμαλδεΐδης, αιθανόλης, φυσιολογικού ορού, ρυθμιστικού PBS, διαδοχικά τοποθετήθηκαν σε ειδική κυψελίδα οξειδίου του πυριτίου (SiO_2). Κατά την εναλλαγή των διαλυμάτων, πραγματοποιείται έκπλυση της κυψελίδας με καθαρό διαλύτη πριν από κάθε μέτρηση. Η ένταση της ακτινοβολίας ορίστηκε στο 40% της μέγιστης έντασης του laser και η διάρκεια της σάρωσης ισούται με 6 sec.

5.3. Επεξεργασία φασμάτων

5.3.1. Κώδικας επεξεργασίας φασμάτων

Για τη λήψη αποτελεσμάτων και τη διεξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την επίδραση των μέσων αποθήκευσης και της σταθεροποίησης στην ανόργανη και οργανική φάση των οστών απαραίτητο βήμα είναι η επεξεργασία των φασμάτων

που καταγράφονται. Η προεπεξεργασία (pre-processing) των φασμάτων έγινε με τη χρήση κώδικα Python, που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο της Ιατρικής Φυσικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, από τον υποψήφιο Διδάκτορα του τμήματος, Ελευθέριο Παύλου.

Ο κώδικας αυτός επιτρέπει την ταυτόχρονη επεξεργασία διαφορετικών φασμάτων, από διαφορετικά δείγματα με την αλλαγή συγκεκριμένων συντελεστών και εντολών. Σε πρώτη φάση κατά την εκτέλεση του, το πρόγραμμα παρέχει τη δυνατότητα της αναγνώρισης των αρχείων που αντιστοιχούν στα δεδομένα των φασμάτων που έχουμε λάβει κατά την φασματοσκοπία και την μετατροπή και αποθήκευση αυτών σε καινούριο αρχείο, το οποίο αναγνωρίζεται από τις βιβλιοθήκες οι οποίες χρησιμοποιούνται στο προγραμματισμό της γλώσσας Python. Στη συνέχεια, ακολουθεί μαθηματική παρεμβολή (interpolation) όπου τροποποιούνται όλες οι τιμές x σε μια συνάρτηση $y=f(x)$ σε νέα x_{new} και υπολογίζονται ξανά οι τιμές $y_{new} = f(x_{new})$ [6].

Στη πορεία, αποκόβεται (crop) από το φάσμα η γραμμή που αντιστοιχεί στην σκέδαση Rayleigh. Η γραμμή Rayleigh συνυπάρχει στα φάσματα Raman και εντοπίζεται στα 0 cm^{-1} και δεν προσφέρει κάποια χρήσιμη πληροφορία για τη χημική σύνθεση του οστού και για αυτό αποκόβεται. Ακόμα, αποκόβεται και η απότομη περιοχή που εκτείνεται περίπου έως τα 150 cm^{-1} (Σχήμα 1). Η αποκοπή αυτών των τμημάτων ευνοεί την καλύτερη εκτέλεση της εντολής SNIP, για την οποία θα γίνει λόγος παρακάτω.

Κατόπιν, εκτελείται η εντολή η οποία εξομαλύνει τις τιμές των δεδομένων του φάσματος (smoothing). Αυτό επιτυγχάνεται κάνοντας χρήση του φίλτρου Savitzky – Golay. Με τον όρο εξομάλυνση των δεδομένων εννοούμε την αύξηση της ακρίβειας των δεδομένων χωρίς να παραμορφώνεται η τάση του σήματος. Αυτό επιτυγχάνεται, με μια διαδικασία γνωστή ως συνέλιξη, προσαρμόζοντας διαδοχικά υποσύνολα γειτονικών σημείων των δεδομένων, με ένα πολυώνυμο χαμηλού βαθμού με τη μέθοδο των ελάχιστων τετραγώνων. Όταν τα δεδομένα είναι ισότιμα χωρισμένα, μπορεί να βρεθεί μια αναλυτική λύση στις εξισώσεις των ελαχίστων τετραγώνων, με τη μορφή ενός μόνο συνόλου “συντελεστών συνέλιξης” που μπορεί να εφαρμοστεί σε όλα τα υποσύνολα των δεδομένων, για να δώσει εκτιμήσεις για το εξομαλυσμένο σήμα (ή παράγωγα του εξομαλυσμένου σήματος), στο κεντρικό σημείο κάθε υποσυνόλου[7].

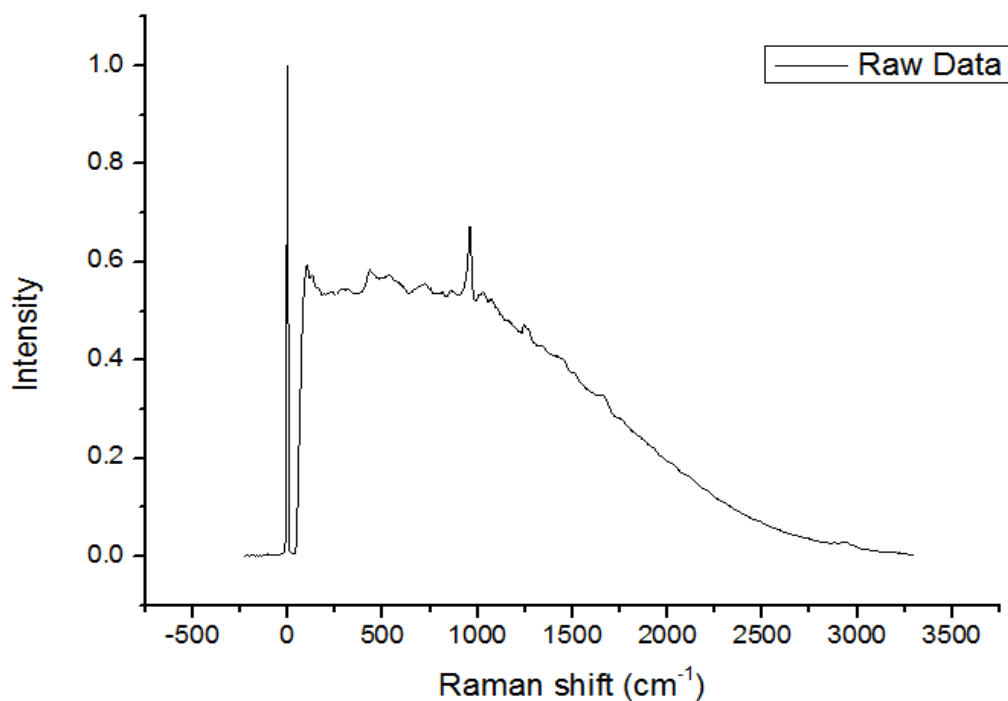
Ο χρήστης του κώδικα έχει τη δυνατότητα να τροποποιεί τις παραμέτρους της εντολής και να επιλέγει εκείνες που προσφέρουν, σύμφωνα με τη προσωπική του κρίση, τη καλύτερη εξομάλυνση. Η επιλογή των παραμέτρων θα πρέπει να γίνεται με ιδιαίτερη προσοχή ώστε να μην χάνονται κορυφές στο φάσμα οι οποίες μπορεί να αντιστοιχούν σε δονήσεις σημαντικών δεσμών της σύστασης των οστών. Τέτοιες παράμετροι είναι ο αριθμός των σημείων που χρησιμοποιεί το φίλτρο Savitzky –

Golay (window length), ο οποίος θα πρέπει να είναι περιττός, καθώς και ο αριθμός του πολυωνύμου που διέρχεται από αυτά τα σημεία (polynomial order). Στη παρούσα μελέτη, επιλέχθηκε ως ο πιο κατάλληλος συνδυασμός, ώστε να μην αλλοιώνονται πολύ τα φάσματα και χάνονται σημαντικές πληροφορίες, η τιμή 9 για το window length και το πολυώνυμο 2^{ov} βαθμού. Η διαδικασία εξομάλυνσης είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη μείωση του θορύβου και η επιλογή του 2^{ov} βαθμού πολυωνύμου προσαρμόζεται καλύτερα στο υπόβαθρο που προσδίδει ο φθορισμός (fluorescence).

Ακολουθεί ο υπολογισμός του υποβάθρου του φάσματος με την εφαρμογή του αλγορίθμου SNIP [8]. Στόχος της συγκεκριμένης συνάρτησης είναι ο βέλτιστος προσδιορισμός του υποβάθρου, το οποίο αποτελεί θόρυβο στην εικόνα του φάσματος και δεν επιτρέπει τον ευκρινή προσδιορισμό των κορυφών που το αποτελούν. Στο κώδικα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο δίνεται η δυνατότητα στο χρήστη να τροποποιεί παραμέτρους και να επιτυγχάνει τον βέλτιστο υπολογισμό του υποβάθρου, μέσω της μεταβλητής iterations (επαναλήψεις). Όσο μικρότερος είναι ο αριθμός ο οποίος αντιστοιχεί στα iterations, τόσο πιο κοντά στα δεδομένα είναι ο υπολογισμός του υποβάθρου. Στη παρούσα εργασία ο αριθμός αυτός καθορίστηκε ίσος με 25.

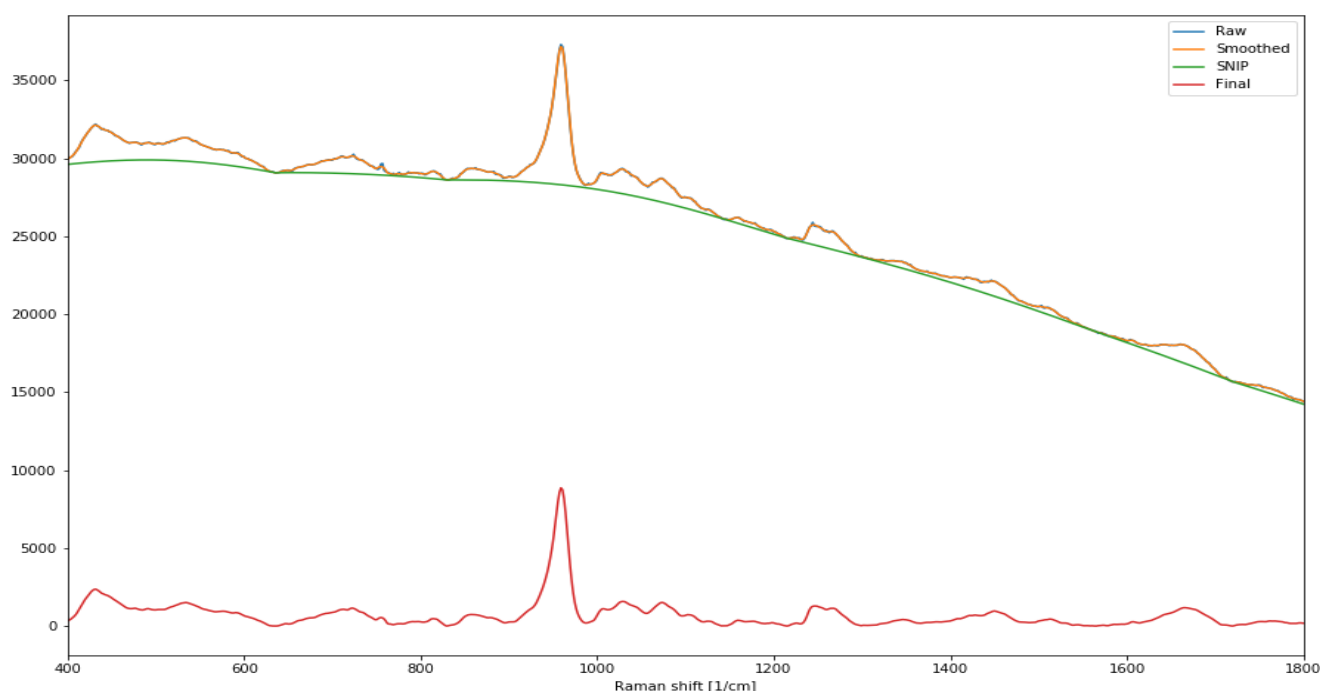
Μόλις υπολογιστεί και το SNIP υπόβαθρο του φάσματος γίνεται η αφαίρεση του από το φάσμα που έχει προκύψει κατά τη διαδικασία της εξομάλυνσης. Τέλος, παρέχεται η δυνατότητα περικοπής του τελικού φάσματος, με σκοπό τη μελέτη συγκεκριμένης περιοχής ενδιαφέροντος. Συγκεκριμένα, επιλέγεται ο περιορισμός και η ανάλυση της περιοχής $400-1800\text{ cm}^{-1}$, η οποία αποτελεί το δακτυλικό αποτύπωμα του οστικού φάσματος.

Στο Σχήμα 2, παρουσιάζεται το φάσμα που προκύπτει από τα δεδομένα που αποκτούνται άμεσα από το φασματοόμετρο μετά την ακτινοβολήση ενός δείγματος, χωρίς να έχουν υποστεί κάποια επεξεργασία. Εύκολα διακρίνεται η γραμμή που αντιστοιχεί στη σκέδαση Rayleigh στα 0 cm^{-1} .



Σχήμα 2: Μη επεξεργασμένο φάσμα οστού

Στο παρακάτω σχήμα, παρουσιάζεται ένα φάσμα που προκύπτει από ένα δείγμα οστού, λίγο μετά την απομάκρυνση του από το πτηνό. Στην εικόνα, εμφανίζεται το φάσμα σε όλα τα στάδια της επεξεργασίας που αναλύθηκαν παραπάνω, με μπλε γραμμή παρουσιάζεται το φάσμα που προκύπτει κατά την φασματοσκοπία (Raw data), με κίτρινη αυτό που προκύπτει μετά την εξομάλυνση (smoothing), με πράσινη απεικονίζεται ο υπολογισμός του υποβάθρου μέσω του αλγορίθμου SNIP και τέλος με κόκκινο χρώμα το προς μελέτη τελικό φάσμα.



Σχήμα 3: Επεξεργασία οστικού φάσματος.

5.3.2. Λογισμικό αποσυνέλιξης κορυφών

Για την επεξεργασία των φασμάτων που καταγράφηκαν κατά την ακτινοβολήση των δειγμάτων κρίνεται απαραίτητος ο διαχωρισμός των επιμέρους κορυφών που αλληλεπικαλύπτονται κάτω από τις ευρείες μπάντες στις διαφορετικές περιοχές στις οποίες διακρίνεται το οστικό φάσμα. Η αποσυνέλιξη (deconvolution) των κορυφών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού OriginPro 8.6 (32 bit version, OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA, 2011). Το συγκεκριμένο λογισμικό παρέχει τη δυνατότητα εισαγωγής των δεδομένων του φάσματος, περιορισμού της περιοχής ενδιαφέροντος και εντοπισμού των κορυφών που επικαλύπτονται κάτω από το εύρος της αντίστοιχης περιοχής. Οι κορυφές αυτές παρουσιάζουν μικρότερες εντάσεις και η εμφάνισή τους γίνεται με την ενίσχυση τους.

Έτσι, αρχικά γίνεται επιλογή της περιοχής ενδιαφέροντος, δηλαδή των επιμέρους περιοχών που αποτελούν ένα οστικό φάσμα, που όπως έχει αναφερθεί στο θεωρητικό μέρος της εργασίας είναι:

- η περιοχή των προλινών – υδροξυπρολινών ($830\text{--}900\text{ cm}^{-1}$)
- η περιοχή του βιοαπατίτη – φωσφορικών ($900\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$)
- η περιοχή των ανθρακικών ($1020\text{--}1120\text{ cm}^{-1}$)
- η περιοχή του αμιδίου I ($1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$)

Η επιλογή της κάθε περιοχής γίνεται με την οριοθέτηση του φάσματος στους κυματάριθμους που αποτελούν τα όρια της αντίστοιχης περιοχής και με την αποκοπή από το υπόλοιπο φάσμα. Μετά την απομόνωση του επιθυμητού εύρους επεξεργασίας γίνεται ο διαχωρισμός των κορυφών με την επιλογή των κυματάριθμων στους οποίους αναμένεται η ύπαρξη κορυφής σύμφωνα με τη βιβλιογραφία. Με τη μέθοδο της δεύτερης παραγώγου (second derivative method) έχει γίνει και η επαλήθευση της ύπαρξης και του διαχωρισμού των αντίστοιχων κορυφών. Η ανάγκη χρήσης της δεύτερης παραγώγου έγκειται στο γεγονός ότι τα φάσματα των βιολογικών υλικών συνήθως είναι πολύπλοκα, με πιο ευρείες μπάντες, οι οποίες συνήθως περιέχουν περισσότερες από μια δονήσεις δεσμών. Επομένως είναι πιο δύσκολο να εντοπιστεί επακριβώς η θέση των κορυφών και η ταυτοποίηση των αντίστοιχων χημικών ειδών. Εργαλεία όπως η πρώτη και η δεύτερη παράγωγος του φάσματος Raman μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την απλοποίηση της ανάγνωσης των δεδομένων, μέσω του διαχωρισμού των κορυφών που αλληλεπικαλύπτονται. Έτσι, όταν το φάσμα αλλάζει ακόμα και αργά από μια θετική κορυφή σε μια αρνητική (εξαιτίας της παρουσίας ενός ώμου στην ευρεία μπάντα για παράδειγμα), τα χαρακτηριστικά γίνονται πιο έντονα στο φάσμα που προκύπτει από τη παραγωγή. Η πρώτη παράγωγος περνάει από το μηδέν στον ίδιο κυματάριθμο με τη μέγιστη ένταση της μπάντας Raman (κλίση της εφαπτομένης στο σήμα σε κάθε σημείο), και η δεύτερη παράγωγος είναι μια αρνητική μπάντα με το ελάχιστο στο ίδιο σημείο όπως το μέγιστο στο φάσμα με μηδενική παραγωγή (μέτρο καμπυλότητας του σήματος, δηλαδή ο ρυθμός μεταβολής της κλίσης του σήματος). Κατά την εφαρμογή της παραγωγής είναι χρήσιμο να προηγηθεί η διαδικασία της εξομάλυνσης για να αποφευχθεί η ενίσχυση του θορύβου του φάσματος.

Σε ορισμένες περιπτώσεις όπου ύστερα από τη μέθοδο της δευτέρας παραγώγου δεν προκύπτει διαχωρισμός κορυφών, αυτές δεν λαμβάνονται υπόψη και δεν συμπεριλαμβάνονται στην αποσυνέλιξη. Η αδυναμία στον εντοπισμό και διαχωρισμό όλων των αναμενόμενων κορυφών οφείλεται κυρίως στη διακριτική ικανότητα του οργάνου, η οποία δεν ξεπερνά τα $4\text{--}5\text{ cm}^{-1}$ και δεν καθιστά δυνατό τον εντοπισμό και τη καταγραφή δονήσεων, των δεσμών οι οποίοι παρουσιάζονται σε πολύ κοντινούς κυματάριθμους.

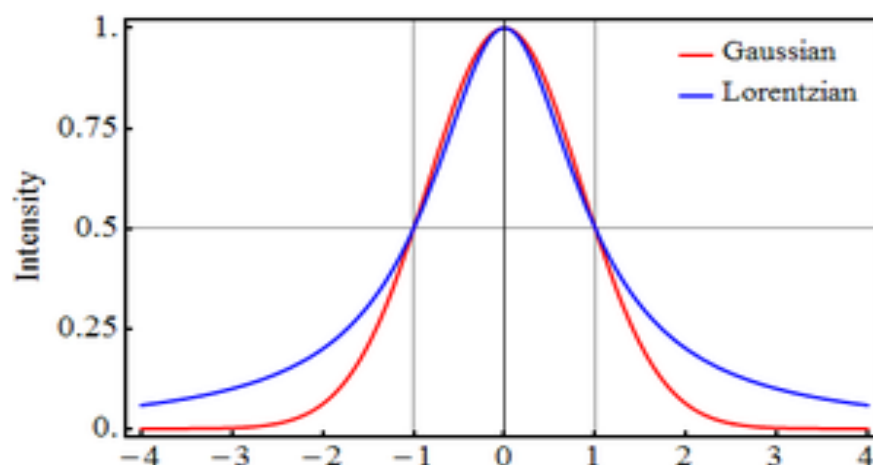
Ακολουθώντας, για την προσαρμογή των κορυφών που ορίστηκαν ως συνιστώσες της βασικής μπάντας της περιοχής γίνεται η επιλογή της Λορετζιανής κατανομής (Lorentzian function). Οι κορυφές οι οποίες προσαρμόζονται φέρουν τη μορφή της κατανομής του Σχήματος 4. Η επιλογή του συγκεκριμένου μοντέλου οφείλεται στο γεγονός ότι η κατανομή Lorentz προσεγγίζει σε μεγαλύτερο βαθμό τη φυσική διαδικασία κατά τον σχηματισμό των κορυφών σε ένα φάσμα Raman και παρέχει χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με την ένταση των κορυφών, το εμβαδό που περικλείεται κάτω από το εύρος τους αλλά και τη τιμή FWHM (full width at half

maximum). Όσον αφορά, την επιλογή της Λορεντζιανής προσαρμογής οφείλεται στο γεγονός ότι οι λύσεις της διαφορικής της εξίσωσης, περιγράφουν την λειτουργία ενός αποσβενόμενου αρμονικού ταλαντωτή. Η κατανομή Lorentz δίνεται από:

$$y = y_0 + \frac{2A}{\pi} \frac{W}{(x - x_c)^2 + w^2}$$

όπου y_0 = offset, W = FWHM, A = area.

Σύμφωνα με το μοντέλο, το άτομο θεωρείται σύστημα ελατηρίου – μάζας όπου εκτελεί αρμονική ταλάντωση. Με τον ίδιο μηχανισμό μπορεί να περιγραφεί και ένας μηχανισμός εκπομπής και απορρόφησης φωτός, όπως είναι και αυτός της φασματοσκοπίας Raman. Σημειώνεται ότι η επιλογή ενός συνδυασμού Γκαουσιανής-Λορεντζιανής κατανομής θα αποτελούσε την ιδανική ίσως προσαρμογή (fit), όμως η χρήση του συγκεκριμένου λογισμικού δεν παρέχει αυτή τη δυνατότητα.



Σχήμα 4: Σύγκριση Γκαουσιανής και Λορεντζιανής κατανομής.

Ακόμα, κατά την εκτέλεση της αποσυνέλιξης θα πρέπει να ελέγχονται ορισμένοι παράμετροι οι οποίοι επιβεβαιώνουν εάν η προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων των φασμάτων στην καμπύλη προσομοίωσης επιτυγχάνεται στο βέλτιστο βαθμό. Πιο αναλυτικά, ελέγχεται η τιμή της παραμέτρου R^2 , η οποία υποδηλώνει κατά πόσο τα πειραματικά δεδομένα ταιριάζουν στην καμπύλη προσομοίωσης. Η βέλτιστη τιμή της είναι η μονάδα και σε όλες τις προσομοιώσεις που πραγματοποιήθηκαν, αποδεκτές έγιναν μόνο εκείνες για τις οποίες ίσχυε $R^2 > 0.9$. Επιπλέον, προσοχή δίνεται και στο σχετικό σφάλμα που συνοδεύει τη

διαδικασία Standard Error (SE), όπου η τιμή του ιδανικά θα πρέπει να πλησιάζει το μηδέν και υποδεικνύει την απόκλιση των πειραματικών δεδομένων από τη καμπύλη που προκύπτει κατά την προσαρμογή.

Μετά την επιλογή της καλύτερης προσαρμογής των δεδομένων γίνεται καταγραφή των φασματοσκοπικών παραμέτρων των κορυφών που προκύπτουν από την αποσυνέλιξη και παρέχονται από το λογισμικό. Οι τιμές αυτές αφορούν τις εντάσεις των κορυφών, που ισούνται με το ύψος αυτών, το εμβαδόν που περικλείεται κάτω από κάθε κορυφή αλλά και τη τιμή FWHM. Η τιμή FWHM αντιστοιχεί στη τιμή του πλάτους της καμπύλης ενός φάσματος, μεταξύ δύο σημείων του άξονα γ και αποτελεί το μισό του μέγιστου πλάτους. Οι τιμές αυτές είναι απαραίτητες για τον υπολογισμό των λόγων που χρησιμοποιούνται για τον χαρακτηρισμό της ποιότητας των οστών.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

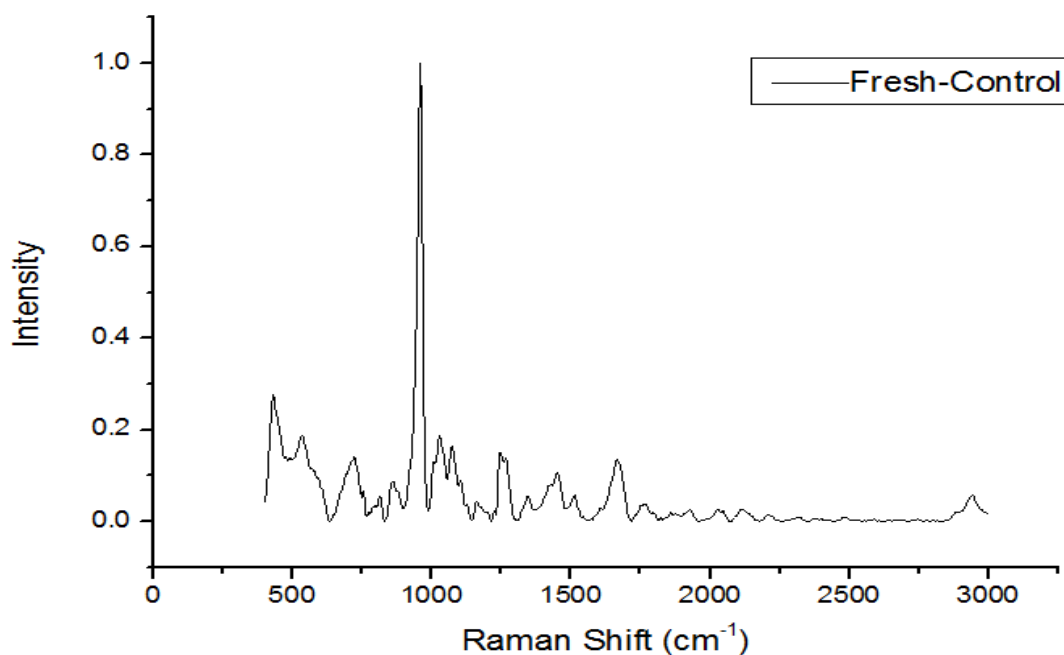
Κεφάλαιο 6

Ακολουθεί η συγκριτική μελέτη των φασμάτων Raman από τα δείγματα της κάθε υπό μελέτης ομάδας, με σκοπό την καταγραφή των διαφοροποιήσεων τους. Οι διαφορές που καταγράφονται στη φασματοσκοπική εικόνα αποδίδονται στον τρόπο σταθεροποίησης και αποθήκευσης των οστών και υποδηλώνουν σημαντικές αλλοιώσεις στη σύσταση αυτών. Αρχικά, έγινε ποιοτική μελέτη και σύγκριση των φασμάτων, μελετώντας το συνολικό φάσμα και αναλύοντας τις κορυφές των δονήσεων των μορίων που συνυπάρχουν στον ιστό και αντιστοιχούν στα ανόργανα και οργανικά συστατικά της σύνθεσης του οστού.

Η κάθε ομάδα συγκρίνεται με το φάσμα ελέγχου (control), το οποίο προέρχεται από τα δείγματα εκείνα τα οποία εξετάστηκαν αμέσως μετά την συλλογή τους από τις όρνιθες, και δεν έχουν υποστεί κάποια επεξεργασία με τη χρήση διαλύτη ή ψύξης. Το φάσμα αυτό χαρακτηρίζεται ως φάσμα αναφοράς. Για την ανάλυση των φασμάτων ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία και σύγκριση για όλα τα μεμονωμένα φάσματα που λαμβάνονται από τα τέσσερα διαφορετικά δείγματα που ανήκουν σε κάθε ομάδα. Για λόγους αξιοπιστίας (στατιστική κ.α) στη παρούσα εργασία παρουσιάζεται το μέσο φάσμα εκ των τεσσάρων που είχαν καταγραφεί για τα διαφορετικά δείγματα. Κατά την ανάλυση έγινε κανονικοποίηση (normalize) των φασμάτων αυτών ως προς την βασική και πιο έντονη κορυφή που εμφανίζεται περίπου στα 960 cm^{-1} , η οποία αντιστοιχεί στην δόνηση των φωσφορικών $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ και αποτελεί σημείο αναφοράς για τα οστικά φάσματα. Η κορυφή αυτή μπορεί να υφίσταται μια μικρή μετατόπιση ανάλογα το βαθμό ανθρακικής υποκατάστασης. Ακόμα, οι σχετικές εντάσεις των κορυφών μεταξύ των κανονικοποιημένων φασμάτων μπορεί να οδηγήσει σε ποσοτικές εκτιμήσεις σχετικά με τα συστατικά των οστών.

6.1.Ανάλυση δείγματος ελέγχου (control)

Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται το οστικό φάσμα που προέρχεται από τα δείγματα τα οποία θεωρούνται δείγματα ελέγχου και έχουν ληφθεί για τη χρονική στιγμή $t_0=0\text{d}$. Το φάσμα αυτό αποτελεί φάσμα αναφοράς για τα οστικά δείγματα, καθώς δε φέρει κάποια αλλοίωση η οποία μπορεί να αποδοθεί σε κάποια διαδικασία αποθήκευσης όπως συμβαίνει με τις άλλες ομάδες μελέτης.



Σχήμα 5: Αντιπροσωπευτικό οστικό φάσμα δείγματος ελέγχου.

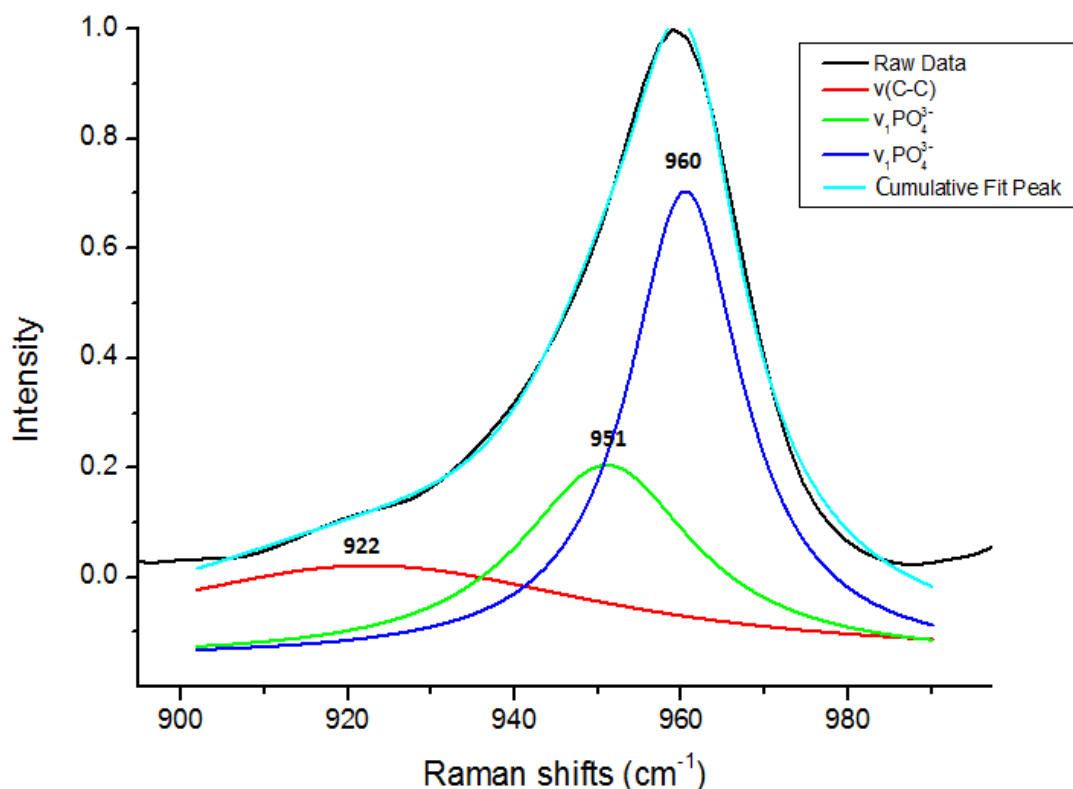
Το φάσμα αυτό βρίσκεται σε πολύ καλή συμφωνία με φάσματα που καταγράφονται στη βιβλιογραφία [9] και μπορούμε να διακρίνουμε τις χαρακτηριστικές κορυφές που αντιστοιχούν σε δονήσεις δεσμών του βιοαπατίτη και του κολλαγόνου Τύπου Ι. Εμφανής είναι η παρουσία της χαρακτηριστικής οξείας κορυφής που αποδίδεται σε δονήσεις των φωσφορικών ($\nu_1 PO_4^{3-}$) του βιοαπατίτη και η οποία εντοπίζεται περίπου στα $959 - 960 \text{ cm}^{-1}$. Η κορυφή αυτή είναι χαρακτηριστική των ασβεστοποιημένων ιστών, όπως είναι ο οστικός.

Στη συνέχεια, παρουσιάζεται ο διαχωρισμός του φάσματος στις περιοχές ενδιαφέροντος με σκοπό να διακρίνουμε μέσω της διαδικασίας της αποσυνέλιξης τις κορυφές οι οποίες βρίσκονται κάτω από τις ευρείες κορυφές και παρέχουν τις απαραίτητες πληροφορίες σχετικά με τη δομή του οστού. Οι περιοχές αυτές έχουν αναφερθεί και σχολιαστεί εκτενώς στο θεωρητικό μέρος της εργασίας (Κεφάλαιο 3), όμως σε αυτή τη φάση δίνεται ιδιαίτερη προσοχή μόνο στις τρεις από αυτές και ειδικά στις κορυφές που αντιστοιχούν σε δονήσεις φωσφορικών και ανθρακικών ιόντων αλλά και στη κορυφή του Αμιδίου Ι.

6.1.1. Περιοχή φωσφορικών βιοαπατίτη ($900-1000\text{ cm}^{-1}$)

Στο διάγραμμα που ακολουθεί, παρουσιάζονται όλες οι κορυφές που εντοπίζονται κάτω από την ευρεία κορυφή των φωσφορικών του βιοαπατίτη. Όπως παρατηρούμε, κατά την αποσυνέλιξη προκύπτουν οι κορυφές που εμφανίζονται στους κυματάριθμους: 922 cm^{-1} , 951 cm^{-1} και 960 cm^{-1} , όπου με βάση τη βιβλιογραφία έγινε και η ταυτοποίηση των δονήσεων των αντίστοιχων δεσμών.

Όσον αφορά τη κορυφή στα 922 cm^{-1} αποδίδεται σε δόνηση έκτασης $\nu(\text{C-C})$ του δακτυλίου της προλίνης του κολλαγόνου τύπου I. Η κορυφή στα 951 cm^{-1} αντιστοιχεί σε δονήσεις $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ φωσφορικών (transient bone mineral (P-O) phase, όπου εντοπίζεται σε μη ώριμους οστικούς ιστούς) [10]. Τέλος, η κορυφή με τη μεγαλύτερη σχετική ένταση στα 960 cm^{-1} , αποδίδεται στη συμμετρική δόνηση έκτασης ν_1 των φωσφορικών του βιοαπατίτη [10].



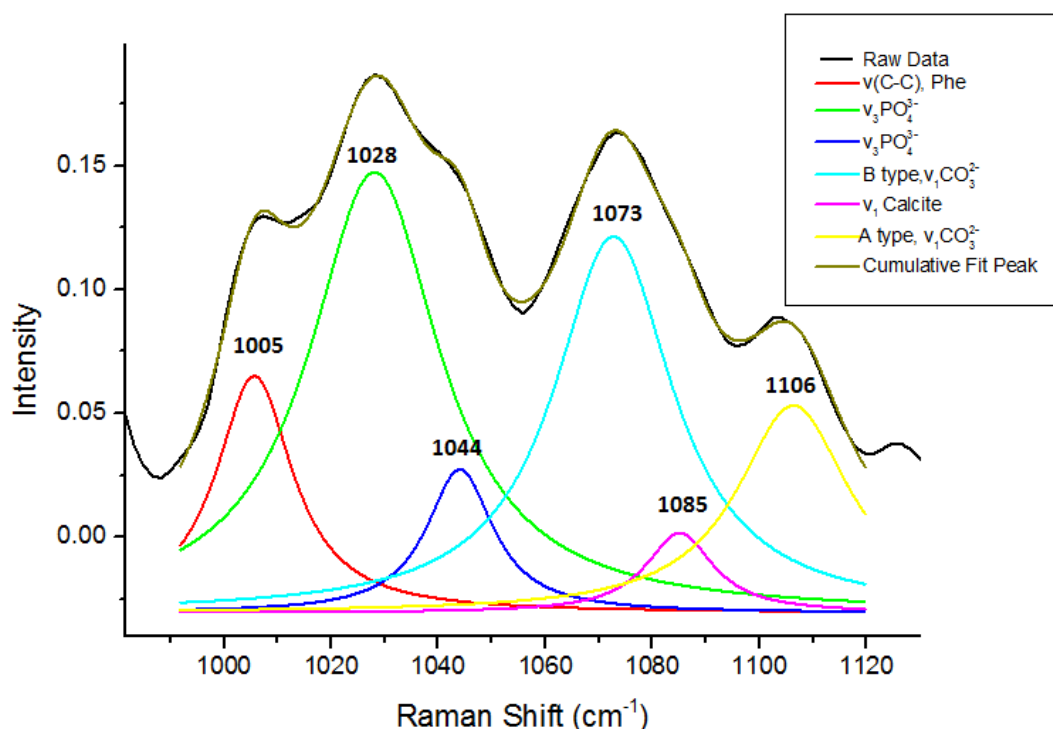
Σχήμα 6: Ανάλυση επιμέρους κορυφών στη περιοχή των φωσφορικών για το φάσμα αναφοράς.

6.1.2. Περιοχή ανθρακικών (1020 – 1120 cm^{-1})

Όμοια με πριν γίνεται ο διαχωρισμός των κορυφών που αποτελούν τη περιοχή των ανθρακικών του βιοαπατίτη. Η περιοχή αυτή χρήζει ιδιαίτερης προσοχής καθώς χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό των ανόργανων συστατικών που υπάρχουν στο οστό. Οι κορυφές οι οποίες προκύπτουν κατά την αποσυνέλιξη εντοπίζονται στους κυματάριθμους: 1005 cm^{-1} , 1028 cm^{-1} , 1044 cm^{-1} , 1073 cm^{-1} , 1085 cm^{-1} , 1106 cm^{-1} .

Πιο αναλυτικά, η κορυφή στα 1005 cm^{-1} αποδίδεται στη δόνηση του δεσμού έκτασης ν(C-C) της φαινυλαλανίνης (οργανικό συστατικό), η κορυφή στα 1028 cm^{-1} και εκείνη στα 1044 cm^{-1} αποδίδονται σε δονήσεις ν_3 των φωσφορικών υποκαταστατών ($\nu_3 PO_4^{3-}$), η κορυφή 1073 cm^{-1} αντιστοιχεί σε δονήσεις ν_1 των ανθρακικών υποκαταστατών ($\nu_1 CO_3^{2-}$) [11], η 1085 cm^{-1} αποδίδεται σε δονήσεις ν_1 του ασβεστίτη ($CaCO_3$) και τέλος η 1106 cm^{-1} οφείλεται σε δονήσεις των ανθρακικών υποκαταστατών ($\nu_1 CO_3^{2-}$) τύπου A [12].

Θα πρέπει αναφερθεί σχετικά με τη κορυφή της περιοχής που εντοπίζεται στο κυματάριθμο 1073 cm^{-1} και η οποία δίνει πληροφορίες σχετικά με το βαθμό των ανθρακικών υποκαταστάσεων τύπου B στο πλέγμα του απατίτη, ότι μπορεί να επικαλύπτεται από συνεισφορές μια κορυφής που υπάρχει στη βιβλιογραφία και η οποία εμφανίζεται περίπου στα 1076 cm^{-1} και αντιστοιχεί σε δονήσεις φωσφορικών υποκαταστατών ($\nu_3 PO_4^{3-}$) [10]. Η συμμετρική κορυφή των ανθρακικών μπορεί να συναντάται ακόμα με μία μικρή μετατόπιση κυματάριθμων, εντός του εύρους 1070-1074 cm^{-1} , ανάλογα με το βαθμό ανθρακικής υποκατάστασης, με τη σχετική της ένταση να αναλογεί στο βαθμό αυτό.

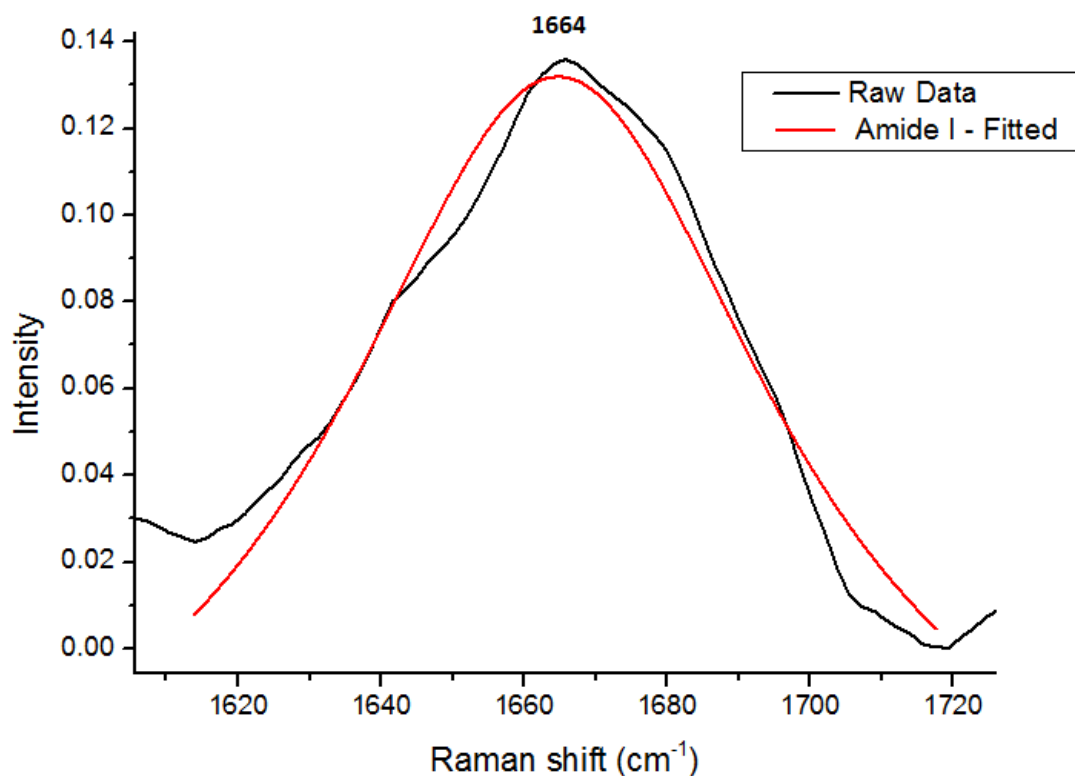


Σχήμα 7: Ανάλυση επιμέρους κορυφών στη περιοχή των ανθρακικών για το φάσμα αναφοράς.

6.1.3. Περιοχή Αμιδίου I ($1600 - 1700 \text{ cm}^{-1}$)

Όσον αφορά την ευρεία κορυφή του Αμιδίου I, μας ενδιέφερε η ένταση της κύριας κορυφής η οποία εμφανίζεται γύρω στα 1664 cm^{-1} και έτσι πραγματοποιήθηκε η προσαρμογή της κορυφής, χωρίς την αποσυνέλιξη της σε επιμέρους συνιστώσες. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία στη μπάντα του Αμιδίου I συνεισφέρουν δονήσεις μορίων που παρουσιάζουν κορυφές στα 1609 cm^{-1} [$\delta(\text{C}=\text{C})$, φαινυλαλανίνη, τυροσίνη], στα 1640 cm^{-1} [$\nu(\text{C}=\text{C})$, εμφανίζεται ως ώμος τη κύριας κορυφής στα 1660 cm^{-1}] και στα 1690 cm^{-1} [Amide I, σχετίζεται με τους σταυροδεσμούς των πρωτεϊνών και τη δευτεροταγή δομή αυτών (β - sheet)] [10].

Η περιοχή του Αμιδίου I είναι χαρακτηριστική της δομής του κολλαγόνου τύπου I και σημειώνεται ότι η κορυφή που αντιστοιχεί στη δόνηση έκτασης του αμιδικού δεσμού I [$\nu(\text{C}=\text{O})$] μπορεί να εντοπιστεί σε ένα εύρος κυματαρίθμων ($1650\text{-}1680 \text{ cm}^{-1}$) [13].



Σχήμα 8: Προσαρμογή καμπύλης στη περιοχή του Αμιδίου I για το φάσμα αναφοράς.

Στα παραπάνω διαγράμματα αναφέρεται ως Cumulative Fit Peak η συνισταμένη κορυφή που υπολογίζεται από το πρόγραμμα για την προσομοίωση.

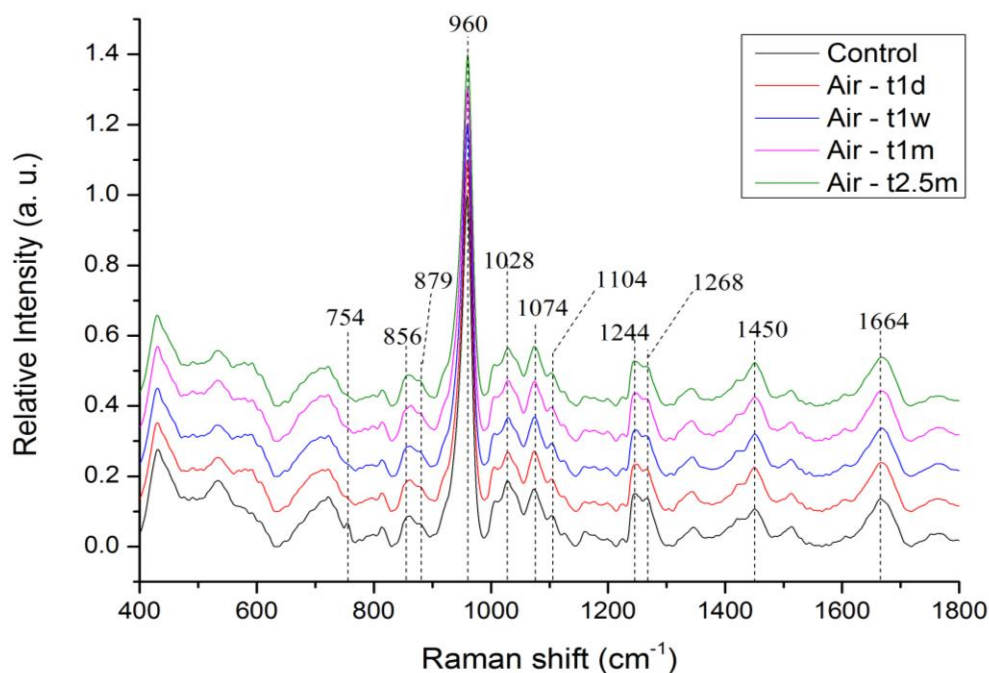
6.2. Συγκριτική παρατήρηση φασμάτων

Ακολουθεί η σύγκριση των φασμάτων που προκύπτουν κατά τη φασματοσκοπία Raman των δειγμάτων από τις διαφορετικές ομάδες. Τα φάσματα συγκρίνονται τόσο μεταξύ τους για τα διαφορετικά χρονικά διαστήματα για τα οποία έγιναν οι μετρήσεις αλλά όσο και με το φάσμα αναφοράς (control) για τον εντοπισμό σημαντικών διαφορών στις επιμέρους περιοχές ενδιαφέροντος.

6.2.1. Φάσματα αποθήκευσης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος

Στο Σχήμα 9 παρουσιάζονται τα φάσματα που προκύπτουν από τα οστά τα οποία είχαν αποθηκευτεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, χωρίς τη χρήση κάποιου διαλύτη. Τα φάσματα παρουσιάζονται με τη χρονολογική σειρά όπου έγινε η

φασματοσκοπία (από κάτω προς τα πάνω) και σε αυτά συμπεριλαμβάνεται και το δείγμα ελέγχου.

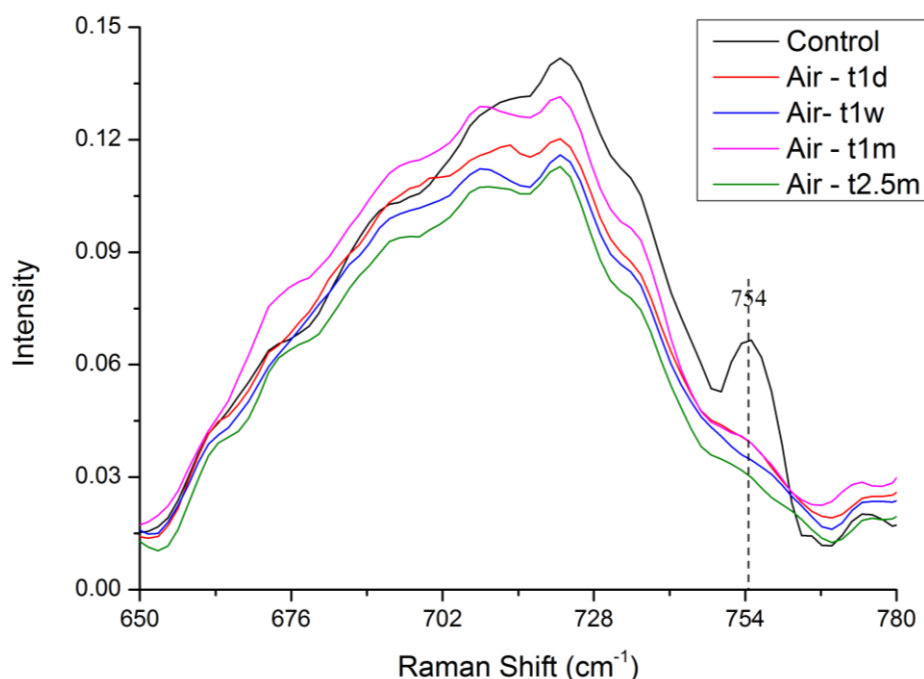


Σχήμα 9: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για διαφορετικά χρονικά διαστήματα.

Τα φάσματα δεν παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές τόσο μεταξύ τους όσο και σε σχέση με το φάσμα αναφοράς και εντοπίζονται όλες οι βασικές κορυφές οι οποίες αναφέρθηκαν και στη προηγούμενη παράγραφο. Οι επιμέρους κορυφές φαίνονται να ταυτίζονται ως προς τον κυματάριθμο στον οποίο εντοπίζεται η μέγιστη σχετική ένταση της καθεμιάς, ενώ στη περίπτωση που καταγράφεται κάποια μετατόπιση μεταξύ των κορυφών των διαφορετικών φασμάτων, αυτή δε ξεπερνά τα $2-3\text{ cm}^{-1}$. Σημειώνεται ότι οι μετατοπίσεις κορυφών μπορεί να οφείλονται σε δομικούς παράγοντες (microstructural factors), να σχετίζονται με το μήκος των χημικών δεσμών και τη συμμετρία των μορίων (μικρό μήκος δεσμού προκαλεί μετατόπιση μεγαλύτερου κυματάριθμου). Ακόμα, μετατοπίσεις μπορεί να σχετίζονται με το μέγεθος των κρυστάλλων ή με το περιβάλλον στο οποίο εκτίθενται τα δείγματα που εξετάζονται. Εσωτερικές ή εξωτερικές επιδράσεις μπορούν να επηρεάσουν το μήκος των χημικών δεσμών με αποτέλεσμα να προκληθεί μετατόπιση του κυματάριθμου στον οποίο εμφανίζεται η κορυφή ενδιαφέροντος. Μικρές μετατοπίσεις κορυφών μπορεί να υποδηλώνουν ότι προέρχονται από δεσμούς που παραμορφώνονται ελαφρώς.

Μελετώντας διεξοδικά τα φάσματα, παρατηρούμε την ύπαρξη μιας κορυφής η οποία εμφανίζεται στο δείγμα ελέγχου περίπου στα 754 cm^{-1} και η οποία φαίνεται να απουσιάζει εντελώς από τα δείγματα που υπόκεινται σε φασματοσκοπία σε

επόμενες χρονικές περιόδους (Σχήμα 10). Η σχετικά αδύναμη αυτή κορυφή αποδίδεται σε δονήσεις ν_4 των ανθρακικών του ασβεστίτη [11].

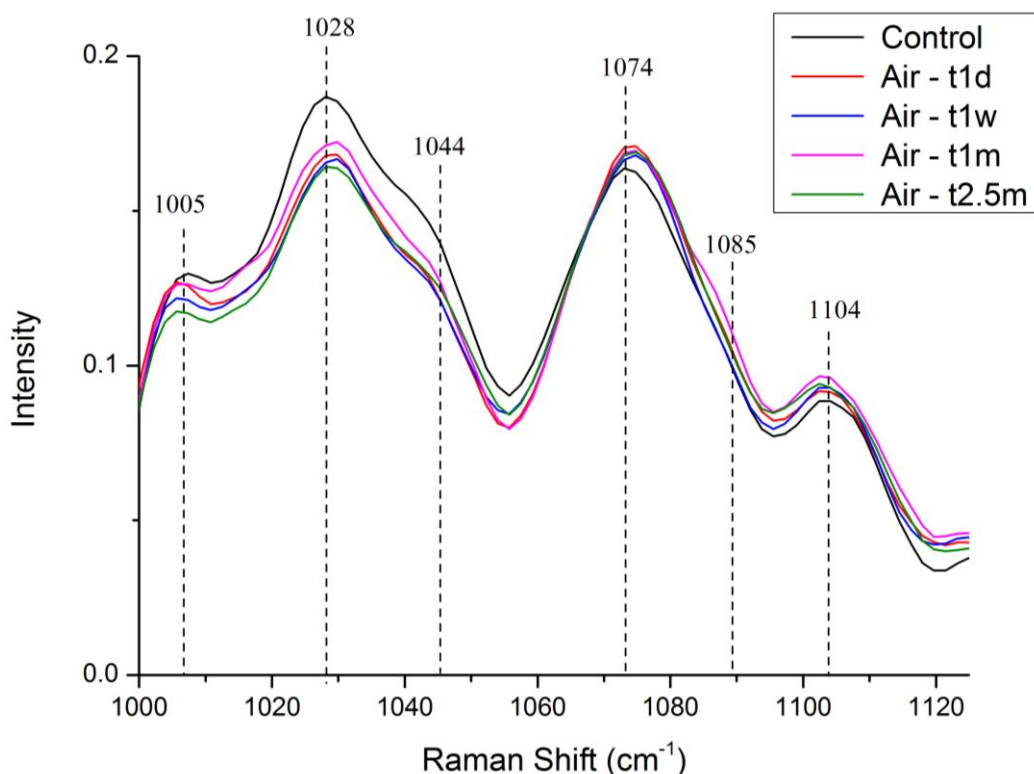


Σχήμα 10: Εντοπισμός κορυφής στα 754 cm^{-1} φασμάτων οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Στο Σχήμα 9 διακρίνονται ακόμα κάποιες επιπλέον κορυφές οι οποίες σχετίζονται άμεσα με τη σύσταση των οστών. Χαρακτηριστικές είναι αυτές που εμφανίζονται στα 856 cm^{-1} και 879 cm^{-1} στη περιοχή του οστικού φάσματος που ορίζεται ως περιοχή προλινών και υδροξυπρολινών του κολλαγόνου ($830\text{-}900\text{ cm}^{-1}$). Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι οι κορυφές στα 853 cm^{-1} και 872 cm^{-1} σχετίζονται με δονήσεις έκτασης $\nu(\text{C-C})$ ή και κάμψης $\delta(\text{C-C-H})$ των αμινοξέων [10]. Πιο συγκεκριμένα, η κορυφή στα 853 cm^{-1} αποδίδεται σε δονήσεις της προλίνης (Pro) του κολλαγόνου, (με τη παρουσία ίσως και συνεισφορών της τυροσίνης), ενώ εκείνη στα 872 cm^{-1} αποδίδεται σε δονήσεις της υδροξυπρολίνης (Hyr). Η ευρεία μπάντα της προλίνης φαίνεται να παρουσιάζει σχετική ένταση μεγαλύτερη από αυτή της υδροξυπρολίνης. Τα αμινοξέα αυτά αποτελούν δύο από τα πιο βασικά της τριπλής έλικας του κολλαγόνου των οστών και έχουν ιδιαίτερη σημασία για τη σταθερότητα του [12].

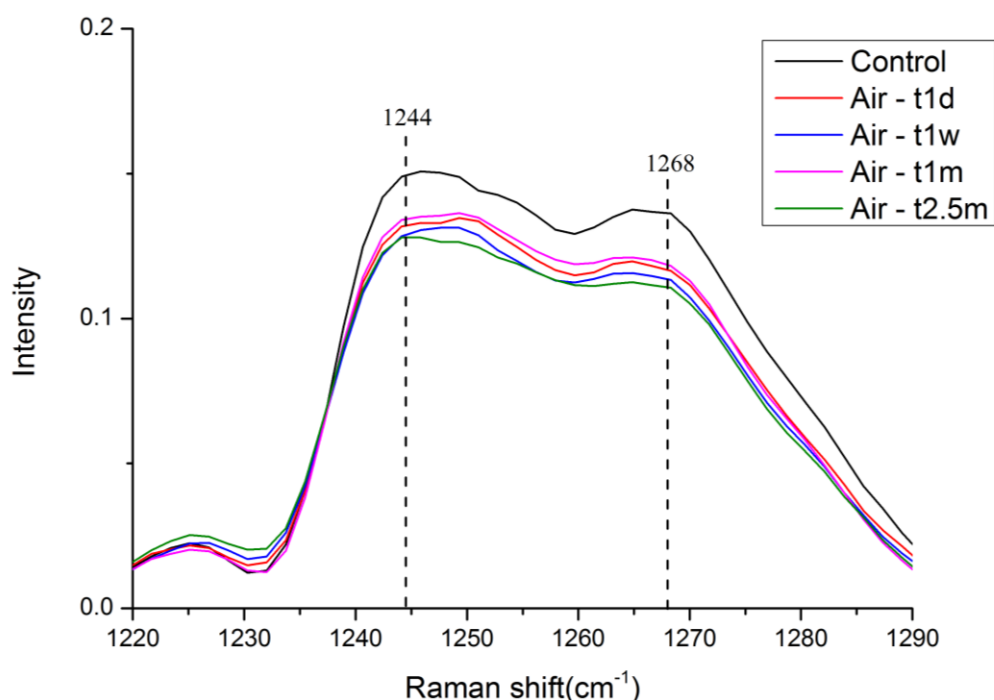
Σχετικά με τη περιοχή των ανθρακικών, δεν εντοπίζεται διαφορά μεταξύ των φασμάτων ως προς την εμφάνιση των κορυφών που την αποτελούν (Σχήμα 11). Καταγράφεται μια μικρή διαφοροποίηση σε σχέση με την ένταση και τη θέση της κορυφής που αποδίδεται στη δόνηση των ανθρακικών υποκαταστατών ($\nu_1\text{CO}_3^{2-}$), στα 1074 cm^{-1} . Επίσης, η κορυφή στα 1028 cm^{-1} φαίνεται να μειώνεται σε ένταση,

ενώ η κορυφή στα 1085 cm^{-1} που σχετίζεται με δονήσεις του μορίου του ασβεστίτη δεν παρατηρείται να σχηματίζεται εμφανώς σε καμία από τις περιπτώσεις.



Σχήμα 11: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για τη περιοχή των ανθρακικών.

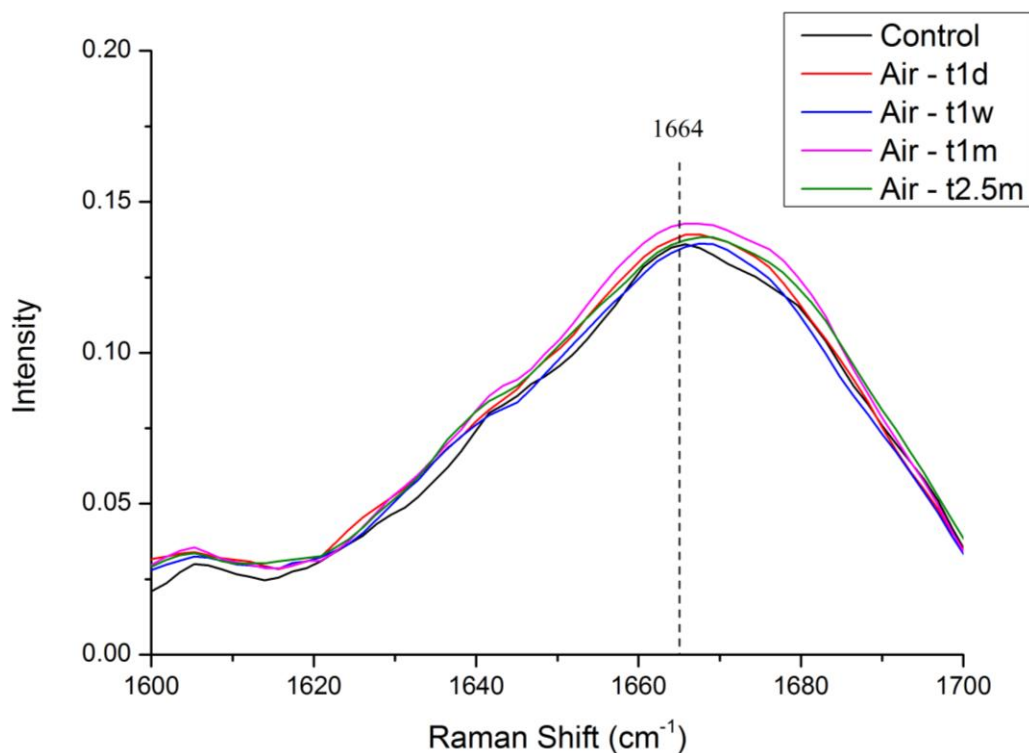
Στα φάσματα εντοπίζονται ακόμα δύο κορυφές οι οποίες αποδίδονται σε ένα σύνολο δονήσεων του Αμιδίου III και είναι χαρακτηριστικές της μη οργανικής και οργανικής δευτεροταγούς δομής του κολλαγόνου. Αυτές βρίσκονται στα 1244 cm^{-1} και 1268 cm^{-1} , με τη πρώτη να παρουσιάζει πιο υψηλή σχετική ένταση (Σχήμα 12). Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι η κορυφή στα 1240 cm^{-1} αντιπροσωπεύει την δευτεροταγή πρωτεϊνική δομή (β-φύλλο) ενώ η 1270 cm^{-1} είναι ενδεικτική του περιεχομένου της δομής σε α- έλικα [9]. Στην περίπτωση αποθήκευσης των οστών σε θερμοκρασία περιβάλλοντος παρατηρούμε ότι προκύπτει μείωση των αντίστοιχων εντάσεων αυτών των κορυφών.



Σχήμα 12: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για τη περιοχή του Αμιδίου III.

Ακολουθώς, εντοπίζεται η κορυφή στα 1450 cm^{-1} , η οποία αποδίδεται στη παλλόμενη (wagging) δόνηση κάμψης του δεσμού $\delta(\text{CH}_2)$. Στη σύγκριση των εντάσεων της κορυφής αυτής μεταξύ των φασμάτων που υποβλήθηκαν σε μέτρηση σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα, παρατηρήθηκε μια σχετική αύξηση της τιμής σε σχέση με το φάσμα ελέγχου. Σημειώνεται ότι η περιοχή που καταλαμβάνει αυτή η μπάντα μπορεί να περιέχει επικαλύψεις και από δονήσεις δεσμών CH_2 των λιπιδίων και έτσι δεν αποδίδεται αποκλειστικά σε μόρια κολλαγόνου.

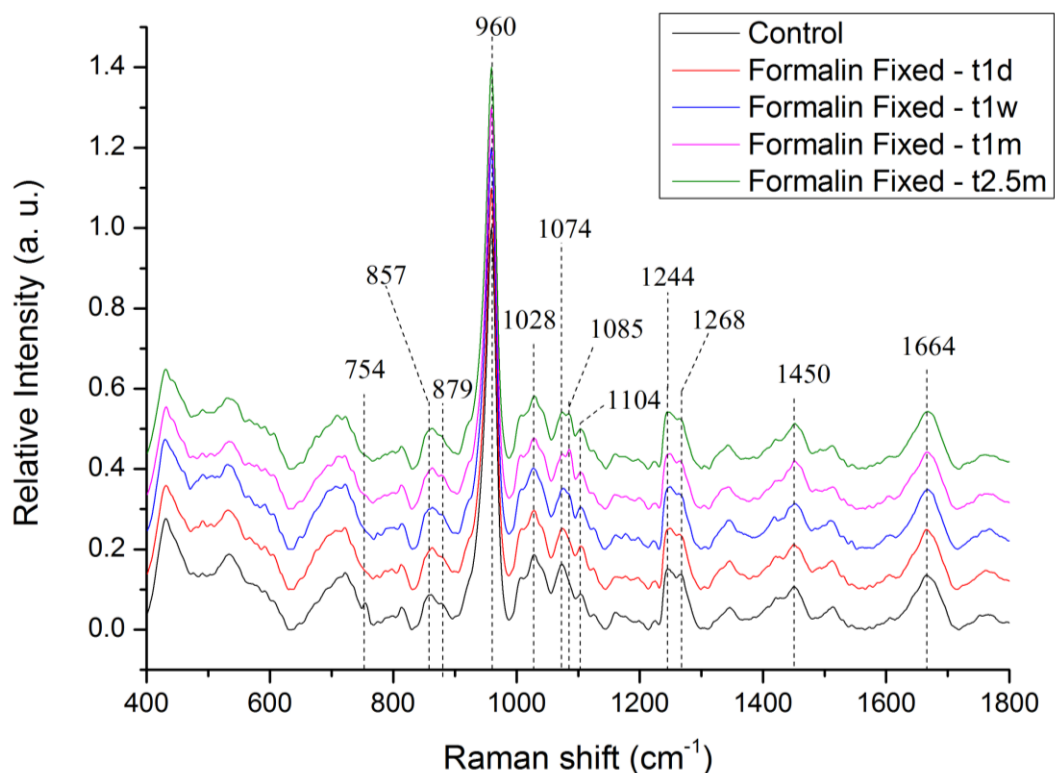
Τέλος, σχετικά με τη περιοχή του Αμιδίου I, όπως παρουσιάζεται και στο Σχήμα 13, δεν σημειώνεται κάποια σημαντική διαφορά, παρά μόνο μια μικρή αύξηση της έντασης στις επόμενες από την t_0 στιγμή. Σε όλες τις περιπτώσεις οι διαφορές οι οποίες εντοπίζονται, σε επόμενη φάση θα ελεγχθούν ποσοτικά και στατιστικά ως προς τη σημαντικότητα τους (Παράγραφος 6.3).



Σχήμα 13: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για τη περιοχή του Αμιδίου I.

6.2.2. Φάσματα σταθεροποίησης σε διάλυμα φορμαλίνης

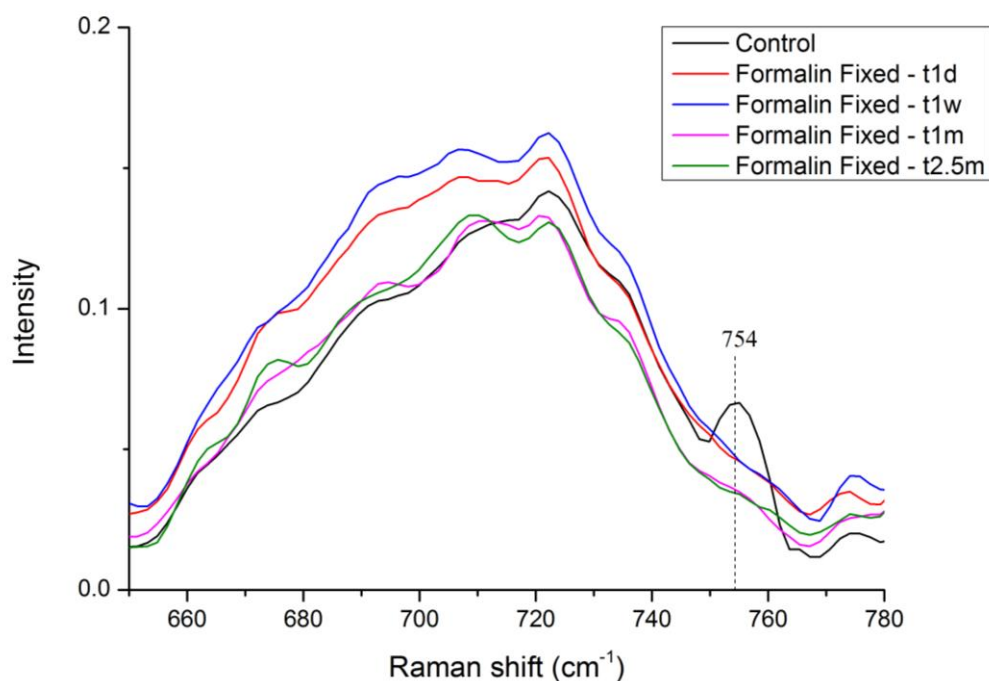
Στη συνέχεια, ακολούθησε η σύγκριση των φασμάτων που προκύπτουν από τη σταθεροποίηση των δειγμάτων σε διάλυμα 10% ρυθμιστικά ουδέτερης φορμαλίνης. Στο σχήμα 14 παρουσιάζονται τα φάσματα όπως λήφθηκαν με χρονική ακολουθία και σημειώνονται οι αντίστοιχες κορυφές που εμφανίζονται. Σε αυτό περιλαμβάνεται και το φάσμα του δείγματος ελέγχου.



Σχήμα 14: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε διάλυμα φορμαλίνης για διαφορετικά χρονικά διαστήματα.

Τα φάσματα που προέρχονται από τα οστικά δείγματα τα οποία έχουν αποθηκευτεί σε διάλυμα φορμαλίνης δεν παρουσιάζουν έντονες διαφορές ως προς την παρουσία και τη θέση των κορυφών που καταγράφονται στο αντίστοιχο φάσμα αναφοράς. Οι μετατοπίσεις που μπορεί να υφίστανται οι κυματάρια στους οποίους εντοπίζονται οι κορυφές βρίσκονται μέσα στα αποδεκτά όρια.

Η κορυφή η οποία εμφανίζεται περίπου στα 754 cm^{-1} και αποδίδεται σε δονήσεις ν_4 των ανθρακικών του ασβεστίτη, απουσιάζει από τα φάσματα των σταθεροποιημένων δειγμάτων (Σχήμα 15). Ενώ στο φάσμα του δείγματος ελέγχου είναι εμφανής.

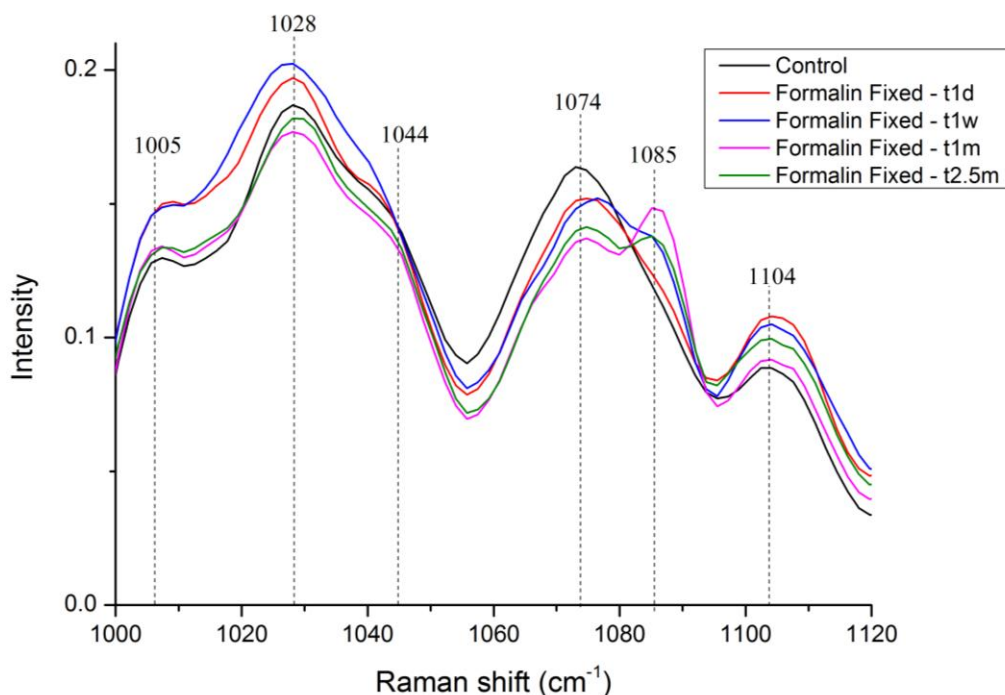


Σχήμα 15: Εντοπισμός κορυφής στα 754 cm^{-1} φασμάτων οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε διάλυμα φορμαλίνης.

Στη συνέχεια, όσον αφορά τις κορυφές οι οποίες εντοπίζονται στη περιοχή των προλινών και υδροξυπρολινών του κολλαγόνου στα 856 cm^{-1} και στα 879 cm^{-1} , εμφανίζονται με υψηλότερη ένταση στα δείγματα τα οποία έχουν υποστεί τη διεργασία της σταθεροποίησης σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η περιοχή των ανθρακικών ($1020\text{--}1120\text{ cm}^{-1}$), όπου ύστερα από την επίδραση της φορμαλίνης, στα αντίστοιχα φάσματα παρατηρούμε τον έντονο σχηματισμό της κορυφής στα 1085 cm^{-1} , η οποία αντιστοιχεί σε δονήσεις ν_1 του ασβεστίτη (CaCO_3). Στη περίπτωση της μέτρησης για t1d, η κορυφή αυτή πλησιάζει την ένταση του φάσματος αναφοράς και δεν είναι εμφανώς σχηματισμένη, αλλά σε μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα σταθεροποίησης του δείγματος στο διάλυμα της φορμαλίνης το φαινόμενο γίνεται πιο ξεκάθαρο. Η ένταση της κορυφής για τα επόμενα χρονικά διαστήματα δεν παρουσιάζει γραμμική σχέση με το χρόνο σταθεροποίησης (Σχήμα 16).

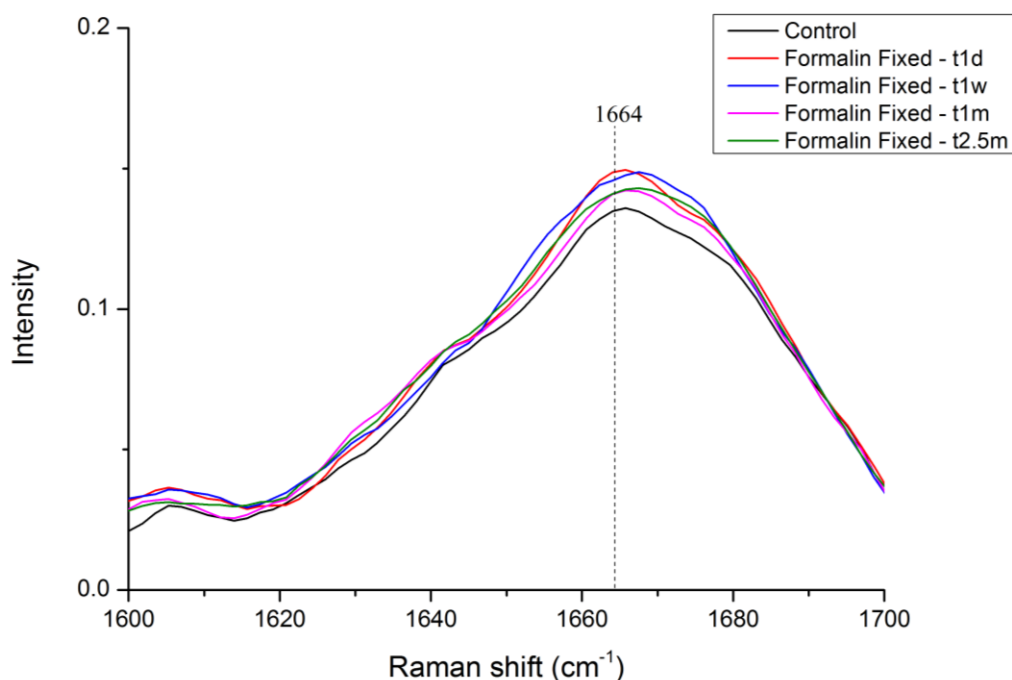
Όσον αφορά τις υπόλοιπες κορυφές της περιοχής δεν καταγράφεται σημαντική διαφοροποίηση ως προς τη θέση τους. Όμως, σημειώνεται ότι οι εντάσεις των κορυφών επηρεάζονται από τη παρουσία της φορμαλίνης. Συγκεκριμένα η κορυφή η οποία είναι χαρακτηριστική των ανθρακικών υποκαταστατών τύπου B, στα 1074 cm^{-1} υφίσταται μείωση της μέγιστης έντασης της και εκείνη στα 1104 cm^{-1} η οποία οφείλεται σε δονήσεις των ανθρακικών υποκαταστατών ($\nu_1\text{CO}_3^{2-}$) τύπου A φαίνεται να καταγράφει πιο υψηλές εντάσεις.



Σχήμα 16: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε διάλυμα φορμαλίνης για τη περιοχή των ανθρακικών.

Ακολουθώς, η κορυφή στα 1450 cm^{-1} , η οποία αποδίδεται στη παλλόμενη (wagging) δόνηση κάμψης του δεσμού $\delta(\text{CH}_2)$, εμφανίζει μια μικρή αύξηση στην τιμή της έντασης της, η οποία όμως δε θεωρείται ιδιαίτερα σημαντική ώστε να διερευνηθεί περισσότερο.

Τέλος, σχετικά με τη περιοχή του Αμιδίου Ι, η οποία παρουσιάζεται στο Σχήμα 17, δεν εμφανίζει κάποια ιδιαίτερη ιδιομορφία ως προς το σχηματισμό της μπάντας και τη εμφάνιση της θέσης του σχετικού μεγίστου. Η μόνη παράμετρος η οποία καταγράφεται ως αυξημένη για τα δείγματα που υπόκεινται σε σταθεροποίηση είναι η τιμή της έντασης της κορυφής.

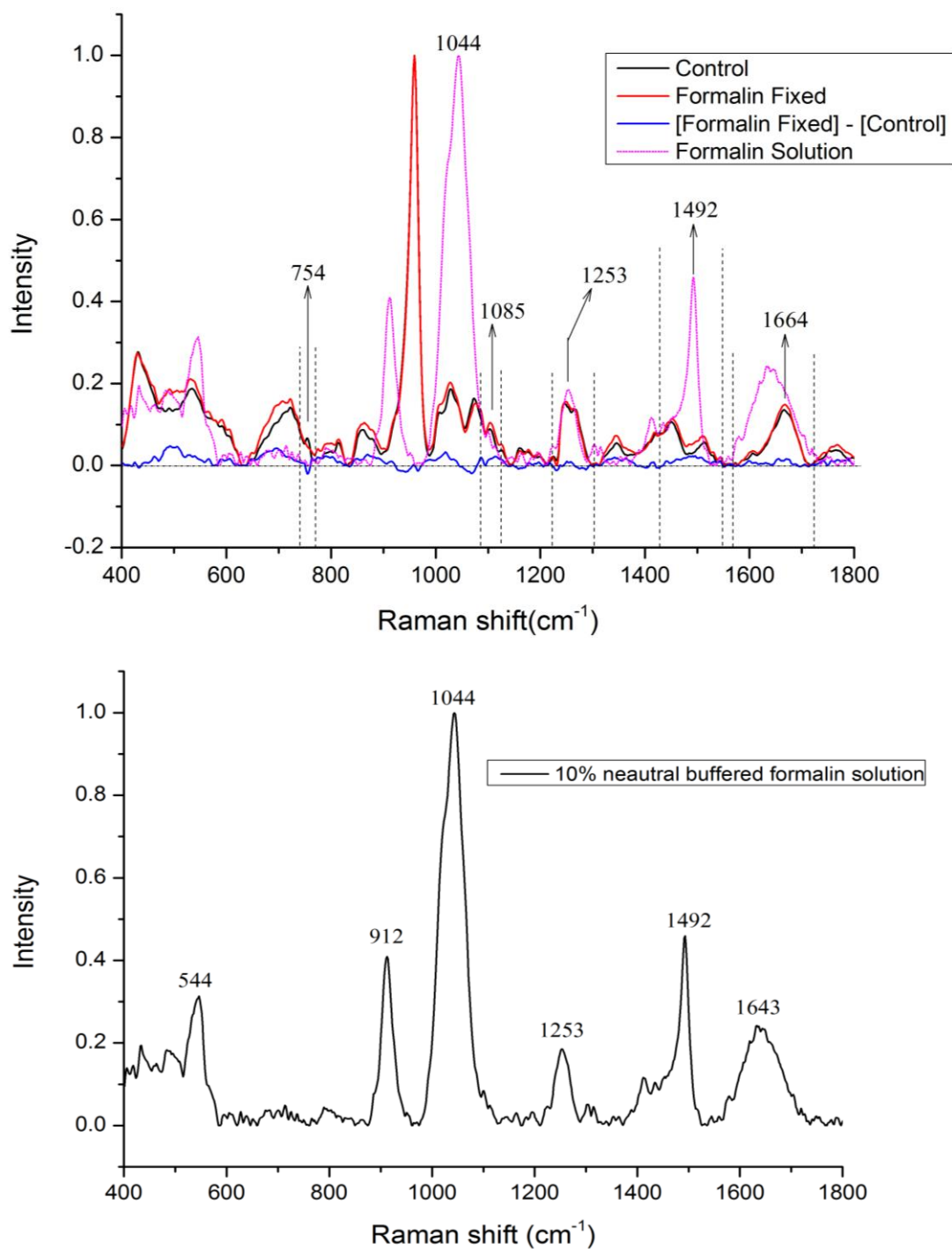


Σχήμα 17: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε διάλυμα φορμαλίνης για τη περιοχή του Αμιδίου I.

Επιπλέον, στα παρακάτω διαγράμματα (Σχήμα 18) παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι διαφορές ανάμεσα σε ένα φάσμα ελέγχου και ένα φάσμα οστικού δείγματος μετά την σταθεροποίηση του σε διάλυμα φορμαλίνης. Με μαύρη γραμμή αντιπροσωπεύεται το φάσμα του δείγματος αναφοράς (control), με κόκκινη το φάσμα του δείγματος που έχει σταθεροποιηθεί για κάποιο χρονικό διάστημα (Formalin Fixed) και με μπλε η διαφορά που προκύπτει κατά την αφαίρεση του πρώτου από το δεύτερο. Ακόμα, με τη ροζ γραμμή παρουσιάζεται το φάσμα του διαλύματος της φορμαλίνης, με σκοπό τον εντοπισμό των περιοχών του οστικού φάσματος που αλληλεπικαλύπτονται από τη παρουσία του διαλύτη. Οι περιοχές που εμφανίζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον σημειώνονται με διακεκομμένες γραμμές.

Δεν εντοπίζονται έντονες αλλοιώσεις στο οστικό φάσμα μετά τη σταθεροποίηση του δείγματος στο διάλυμα. Το διάλυμα θα μπορούσε να οδηγήσει σε παρεμβολή κορυφών, οι οποίες δεν θα οφείλονταν σε δονήσεις μορίων της οργανικής και ανόργανης φάσης του οστού. Σε κάποιες περιπτώσεις όπου ταυτίζονται οι περιοχές εμφάνισης των κορυφών του διαλύματος με εκείνες της σύστασης του οστού παρατηρούμε μια αύξηση των αντίστοιχων μεγίστων της έντασης της κορυφής. Τέτοια περιοχή είναι εκείνη που εμφανίζονται οι κορυφές που αντιστοιχούν σε δονήσεις του β-φύλλου και α-έλικας του Αμιδίου III. Η φορμαλίνη παρουσιάζει μια οξεία μπάντα στο κυματάρημο 1253 cm^{-1} , το εύρος της οποίας είναι τέτοιο που θα μπορούσε να οφείλεται για τη μικρή αύξηση των εντάσεων, των κορυφών 1244 cm^{-1} και 1268 cm^{-1} , για τα δείγματα που έχουν σταθεροποιηθεί. Ακόμα, παρόμοια

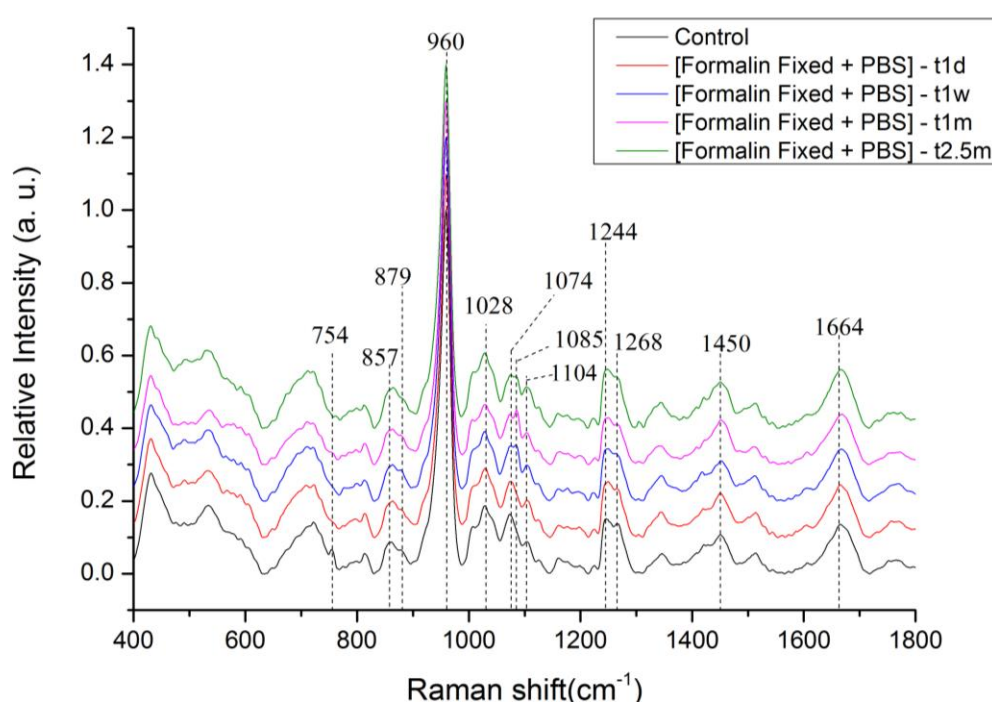
αύξηση εμφανίζεται και στη περιοχή του κυματαρίθμου 1492 cm^{-1} , όπου εκεί προκύπτει ακόμα μια χαρακτηριστική κορυφή του διαλύματος.



Σχήμα 18: α) Σύγκριση φάσματος δείγματος ελέγχου με φάσμα δείγματος σταθεροποιημένο σε διάλυμα φορμαλίνης. β) Φάσμα διαλύματος 10% ρυθμιστικά ουδέτερης φορμαλίνης.

6.2.3. Φάσματα σταθεροποίησης σε διάλυμα φορμαλίνης και χρήση PBS

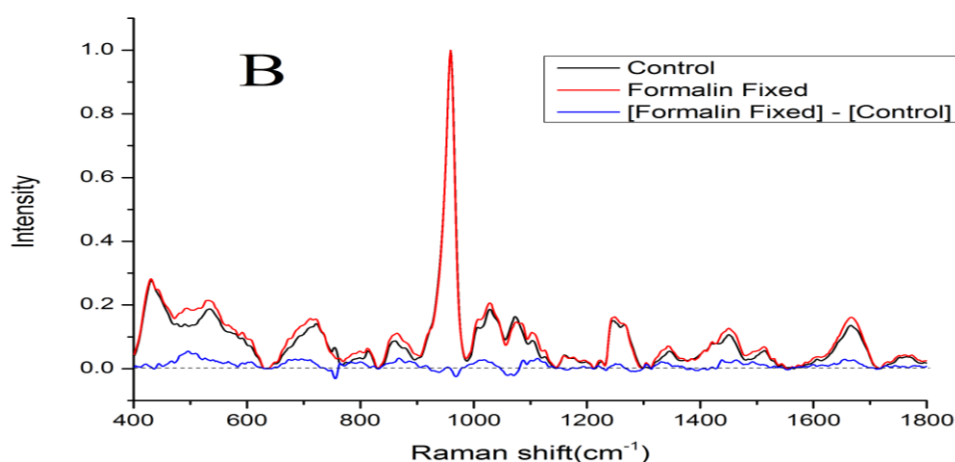
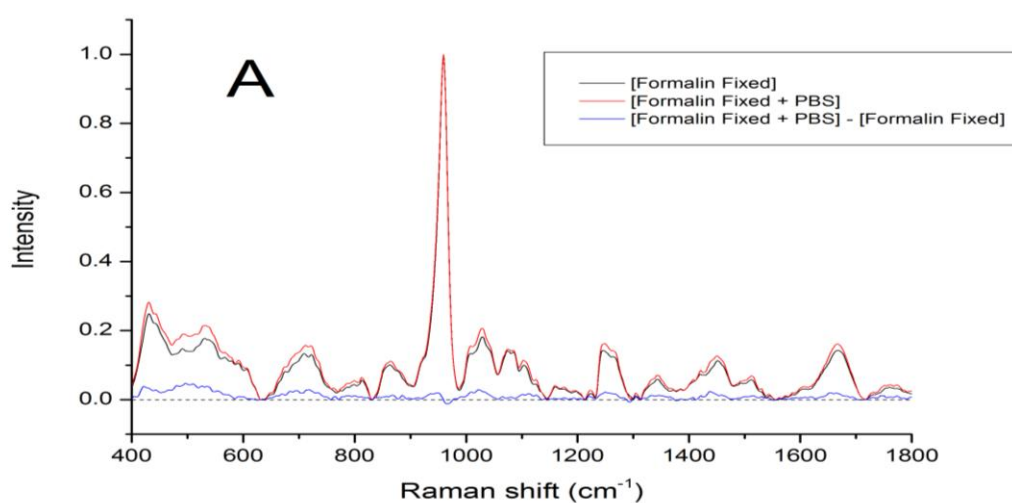
Όπως έχει αναφερθεί στο Κεφάλαιο 5, τα δείγματα τα οποία υπόκεινται σε διαδικασία σταθεροποίησης με τη χρήση διαλύματος φορμαλίνης για διαφορετικά χρονικά διαστήματα, μετά την μέτρηση τους με φασματοσκοπία Raman, εμβαπτίζονται σε διάλυμα PBS με σκοπό την ενυδάτωσή τους και την πλήρη απομάκρυνση του διαλύματος φορμαλίνης που έχει απορροφηθεί από τους οστικούς ιστούς. Παρακάτω παραθέτονται τα φάσματα τα οποία λήφθηκαν στα αντίστοιχα χρονικά σημεία, σε σχέση με το φάσμα αναφοράς του δείγματος ελέγχου (Σχήμα 19).

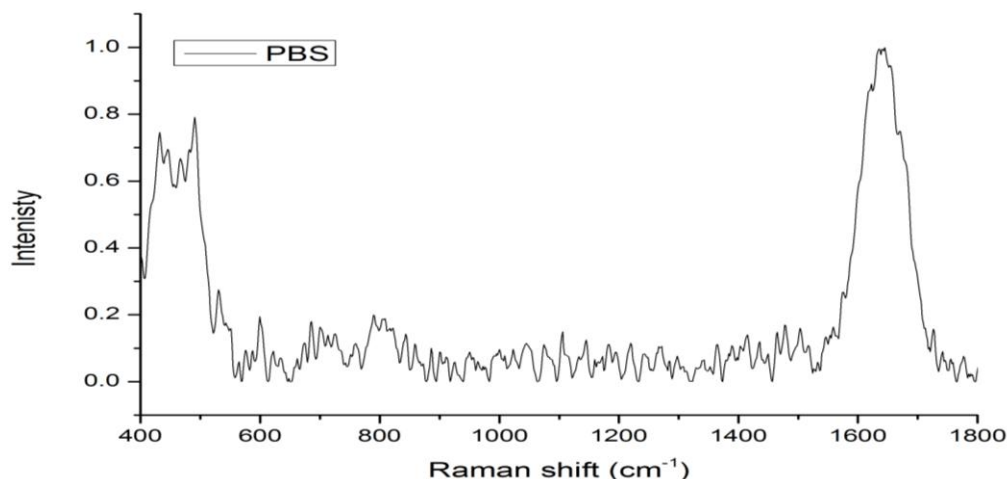


Σχήμα 19: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε διάλυμα φορμαλίνης για διαφορετικά χρονικά διαστήματα και κατόπιν βύθιση σε PBS.

Τα φάσματα και μετά τη βύθιση τους στο διάλυμα PBS παρουσιάζουν όλες τις αναμενόμενες χαρακτηριστικές κορυφές ενός οστικού φάσματος. Όμως, για την καλύτερη σύγκριση και διεξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την επίδραση του ρυθμιστικού διαλύματος PBS, στο Σχήμα 20 καταγράφονται τα φάσματα που προκύπτουν κατά την αφαίρεση Α) του φάσματος Raman ενός δείγματος που έχει σταθεροποιηθεί σε φορμαλίνη και κατόπιν έχει βυθιστεί σε PBS μείον το φάσμα του ίδιου δείγματος πριν την εμβάπτιση του στο ρυθμιστικό διάλυμα, Β) του φάσματος Raman ενός δείγματος που έχει σταθεροποιηθεί σε φορμαλίνη και κατόπιν έχει βυθιστεί σε PBS μείον του φάσματος αναφοράς που προκύπτει από δείγμα ελέγχου. Ακόμα, καταγράφεται και το φάσμα του διαλύματος PBS.

Από τη σύγκριση και την αφαίρεση των αντίστοιχων φασμάτων προκύπτει ότι το φάσμα του δείγματος μετά την σταθεροποίηση του με φορμαλίνη και τη βύθιση του σε διάλυμα PBS παρουσιάζει σχετικά τις ίδιες διαφορές με τα φάσματα που καταγράφηκαν και πριν τη χρήση του PBS. Δεν εμφανίζεται κάποια αλλοίωση ως προς τη μορφή και τη θέση των κορυφών η οποία μπορεί να αποδοθεί στο ρυθμιστικό διάλυμα των φωσφορικών. Η βασική διαφορά στο φάσμα μετά τη χρήση του PBS είναι ότι προκαλεί αύξηση των εντάσεων σε σχεδόν όλες τις κορυφές και αυτό γιατί όπως παρατηρούμε από το φάσμα του PBS, παρουσιάζει κορυφές σχετικά χαμηλής έντασης σε όλο το εύρος ενδιαφέροντος. Αυτό φαίνεται και στη περιοχή $400-600\text{ cm}^{-1}$ του φάσματος όπου παρατηρείται μεγαλύτερη αύξηση, λόγω της συνεισφοράς της αντίστοιχης κορυφής του PBS.

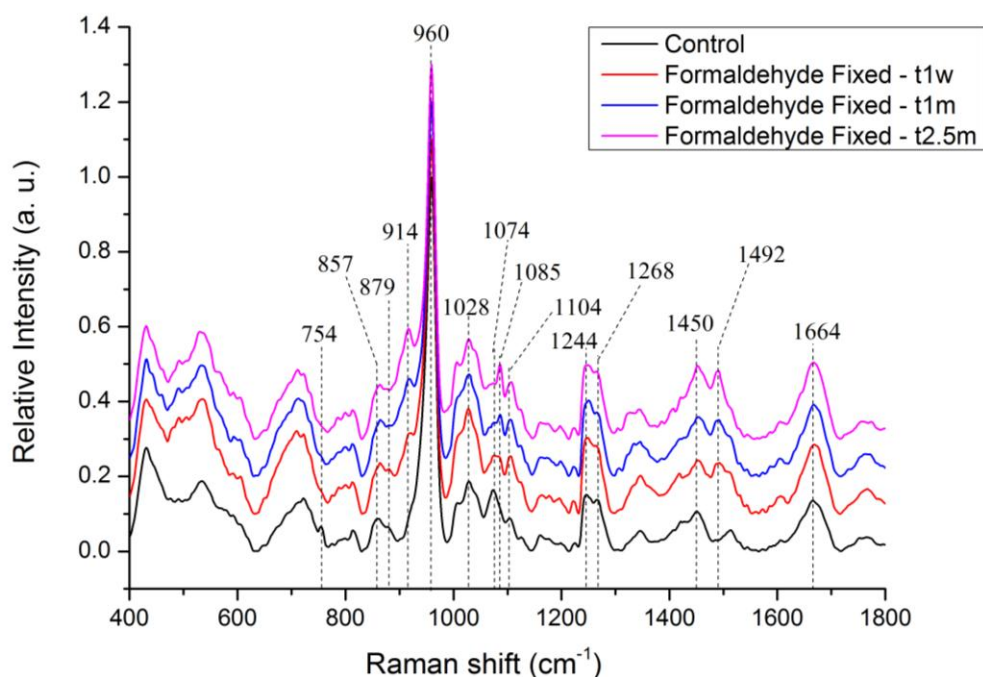




Σχήμα 20: Α) Σύγκριση φάσματος δείγματος σταθεροποιημένο σε διάλυμα φορμαλίνης και χρήση PBS με φάσμα δείγματος σταθεροποιημένο σε διάλυμα φορμαλίνης Β) Σύγκριση φάσματος δείγματος ελέγχου με φάσμα δείγματος σταθεροποιημένο σε διάλυμα φορμαλίνης και χρήση PBS. Γ) Φάσμα διαλύματος PBS.

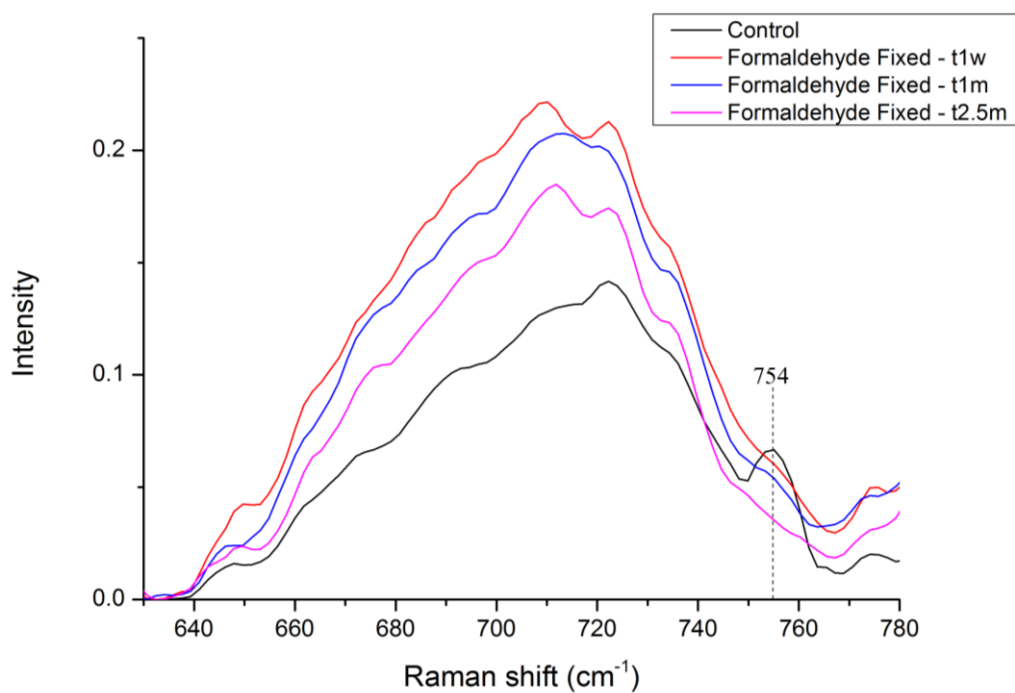
6.2.4. Φάσματα σταθεροποίησης σε διάλυμα φορμαλδεΰδης

Παρακάτω παρουσιάζονται τα φάσματα τα οποία καταγράφηκαν για διαφορετικά χρονικά διαστήματα σε σχέση με το φάσμα αναφοράς του δείγματος ελέγχου. Όπως παρατηρούμε, η φορμαλδεΰδη επηρεάζει το οστικό φάσμα σε μεγαλύτερο βαθμό από το διάλυμα φορμαλίνης που μελετήθηκε προηγούμενα και οι επιδράσεις στο φάσμα είναι πιο έντονες. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνεται με τον εντοπισμό των κορυφών που απεικονίζονται στο φάσμα, όπου εκτός από τις χαρακτηριστικές κορυφές που αναμένονται σε ένα φάσμα οστού, καταγράφονται με μεγαλύτερη ένταση και μπάντες που οφείλονται στο διάλυμα και οι οποίες επικαλύπτουν περιοχές του φάσματος. Τέτοιες κορυφές εντοπίζονται στα 914 cm^{-1} και 1492 cm^{-1} . Συγκεκριμένα, οι κορυφές αυτές δεν εντοπίζονται στο αρχικό φάσμα του δείγματος το οποίο μελετήθηκε απευθείας μετά τη συλλογή του και η σχετική τους ένταση για τα δείγματα που επεξεργάστηκαν εμφανίζει αναλογία με το χρόνο παραμονής του δείγματος στο διάλυμα. Σε γενικές γραμμές το διάλυμα φαίνεται να αυξάνει τις εντάσεις των περισσότερων κορυφών.



Σχήμα 21: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε διάλυμα φορμαλδεΐδης για διαφορετικά χρονικά διαστήματα.

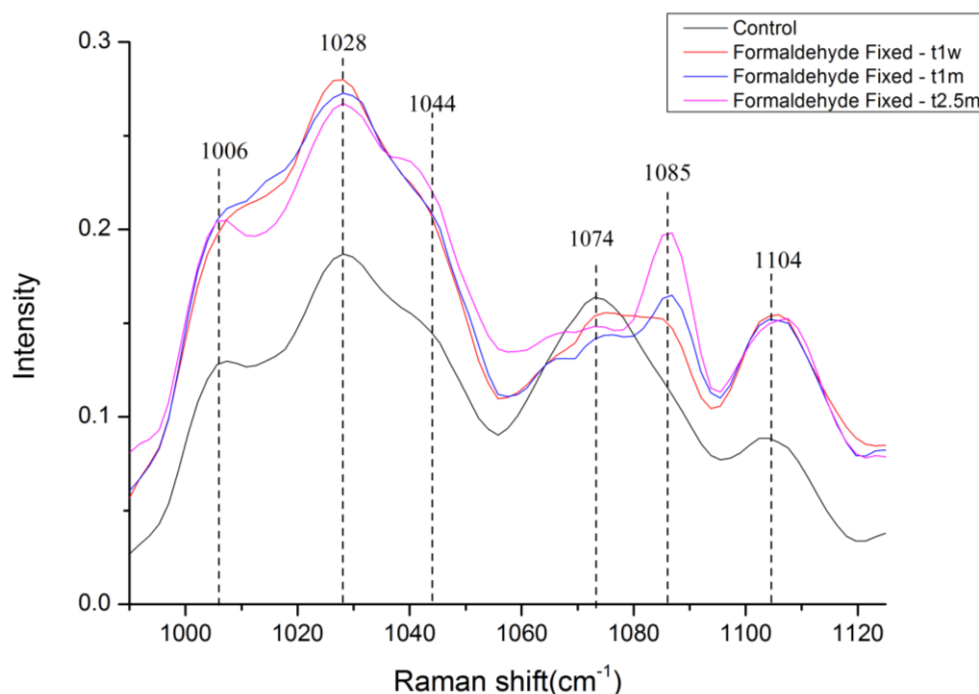
Αναλύοντας μεμονωμένα τις περιοχές ενδιαφέροντος του φάσματος παρατηρούμε πάλι την ανωμαλία των φασμάτων στον κυματάρημο 754 cm^{-1} , και την απουσία της κορυφής αυτής από τα επεξεργασμένα δείγματα.



Σχήμα 22: Εντοπισμός κορυφής στα 754 cm^{-1} φασμάτων οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε διάλυμα φορμαλδεΐδης.

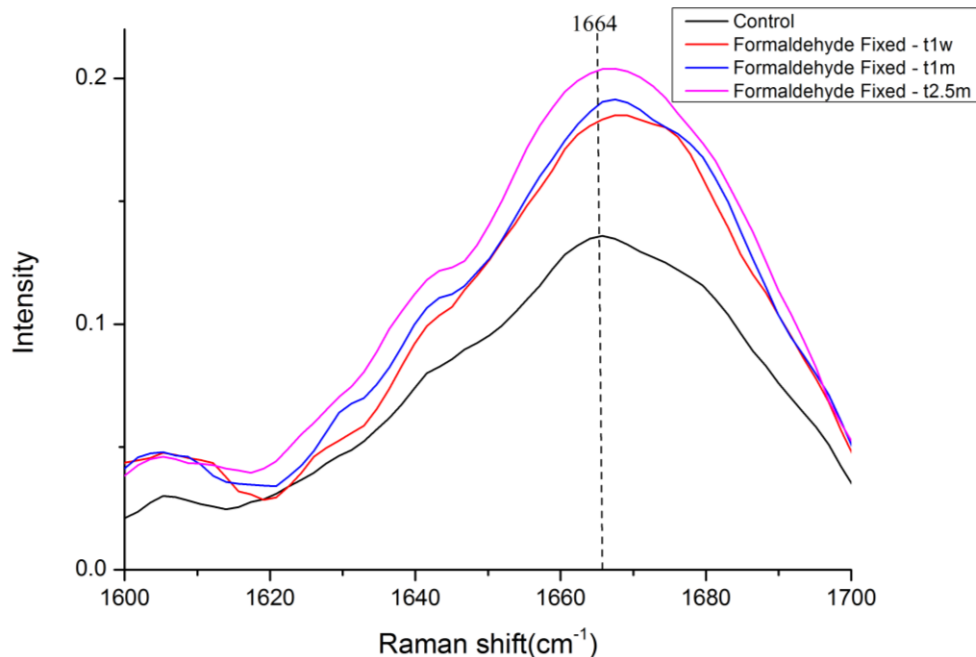
Ακολουθώντας, όσον αφορά την περιοχή των προλινών – υδροξυπρολινών, φαίνεται να επηρεάζεται ως προς το σχηματισμό της από το διάλυμα, με τη γενικά χαμηλής έντασης κορυφή στα 879 cm^{-1} , που αντιστοιχεί στη δόνηση των υδροξυπρολινών να εξαφανίζεται.

Στη συνέχεια απομονώνοντας τη περιοχή των ανθρακικών παρατηρούμε την έντονη επίδραση της φορμαλδεΐδης στη περιοχή και τη διαφοροποίηση ως προς την ένταση των κορυφών. Συγκεκριμένα η ευρεία κορυφή στα 1074 cm^{-1} αλλιώνεται σημαντικά ως προς το σχηματισμό της, μετά την επίδραση του διαλύματος της φορμαλδεΐδης. Επιπλέον, σημειώνεται ο έντονος σχηματισμός της κορυφής στα 1085 cm^{-1} , που αντιστοιχεί σε δονήσεις των ανθρακικών του ασβεστίτη, με την ένταση της κορυφής να καταγράφει αναλογική, με το χρόνο σταθεροποίησης, αύξηση. Οι υπόλοιπες κορυφές καταγράφουν αύξηση των εντάσεων τους.



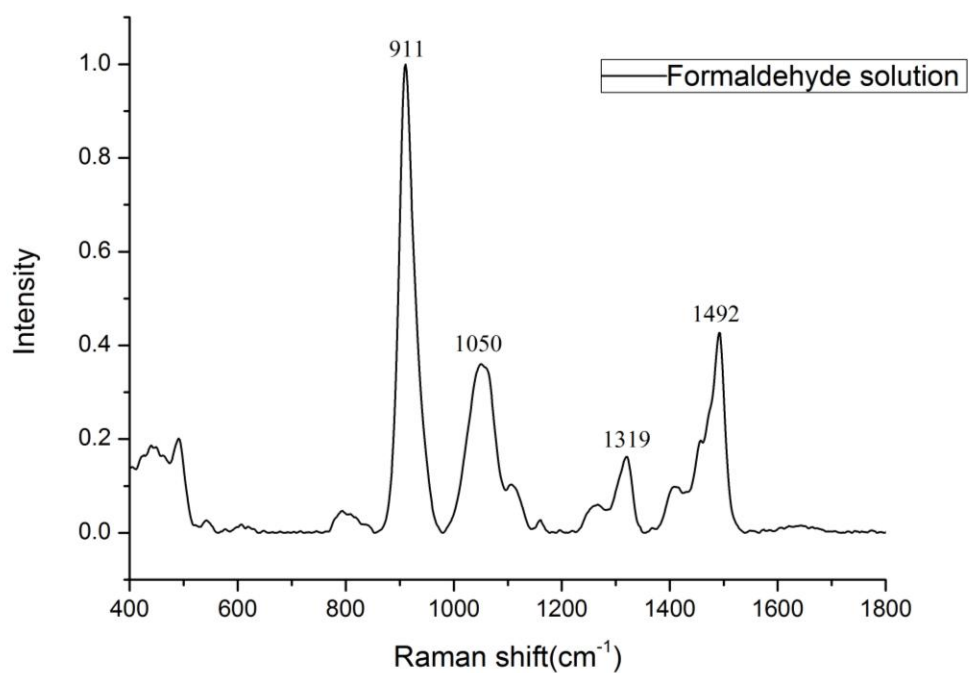
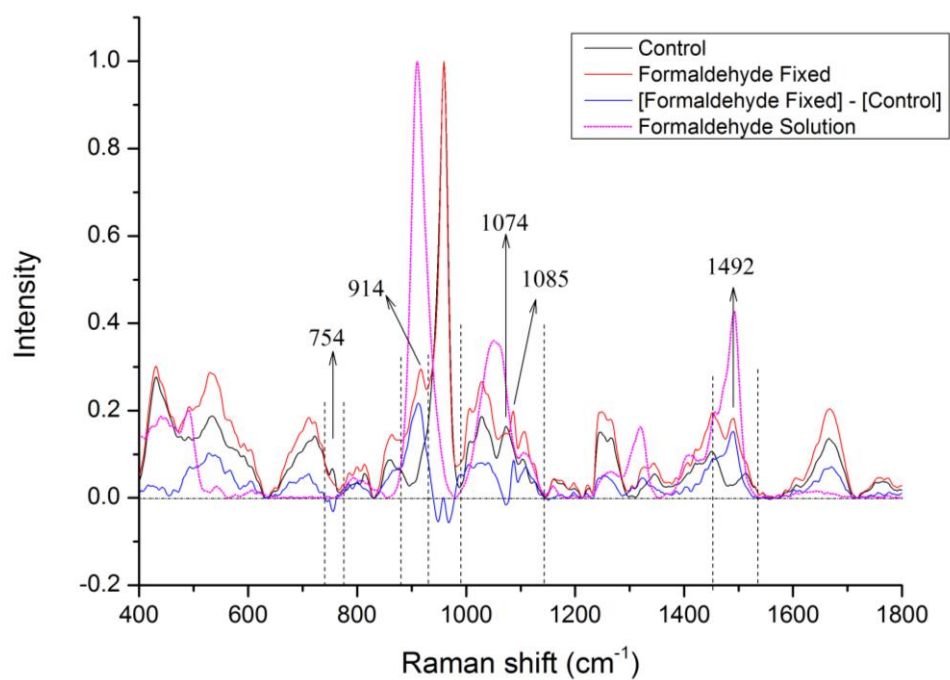
Σχήμα 23: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε διάλυμα φορμαλδεΐδης για τη περιοχή των ανθρακικών.

Επιπλέον, παρόμοια αύξηση έντασης κορυφών εντοπίζεται και στη περιοχή των Αμιδίων I και III. Πάλι οι τιμές των εντάσεων αυξάνονται αναλογικά με το χρόνο διάρκειας της αποθήκευσης του δείγματος στο διάλυμα.



Σχήμα 24: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman φασμάτων οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε διάλυμα φορμαλδεΐδης για τη περιοχή του Αμιδίου I.

Οι διαφορές που αναλύθηκαν παραπάνω μπορούν να γίνουν πιο κατανοητές με τη παρατήρηση του σχήματος που ακολουθεί και στο οποίο απεικονίζονται το φάσμα ελέγχου (μαύρη γραμμή), το φάσμα του δείγματος που έχει αποθηκευτεί στη φορμαλδεΐδη (κόκκινη γραμμή), η μεταξύ τους διαφορά (μπλε γραμμή) και τέλος το φάσμα του διαλύματος της φορμαλδεΐδης με σκοπό τον εντοπισμό των περιοχών όπου γίνεται η επικάλυψη των κορυφών με κορυφές υψηλότερης έντασης που προκύπτουν από δονήσεις μορίων του διαλύματος και οι οποίες επηρεάζουν τη μορφή του φάσματος. Χαρακτηριστικές είναι οι κορυφές της φορμαλδεΐδης (στα 914 cm^{-1} , 1319 cm^{-1} και 1492 cm^{-1}), οι οποίες εμφανίζονται στα φάσματα των δειγμάτων που έχουν υποστεί την επεξεργασία. Η κορυφή στα 1050 cm^{-1} του διαλύματος της φορμαλδεΐδης μπορεί να ευθύνεται και για τη αύξηση της κορυφής στα 1044 cm^{-1} που παρατηρείται στη περιοχή των ανθρακικών.

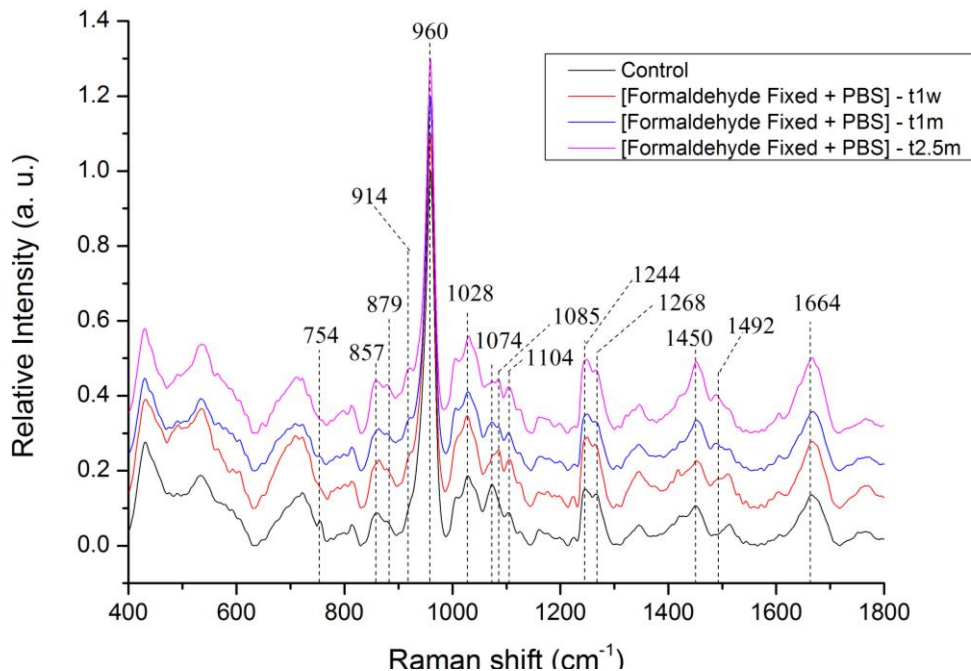


Σχήμα 25: α) Σύγκριση φάσματος δείγματος ελέγχου με φάσμα δείγματος σταθεροποιημένο σε διάλυμα φορμαλδεΰδης. β) Φάσμα διαλύματος φορμαλδεΰδης.

6.2.5. Φάσματα σταθεροποίησης σε διάλυμα φορμαλδεΐδης και χρήση PBS

Στη συνέχεια ακολουθεί η σύγκριση των φασμάτων που προέρχονται από τα δείγματα τα οποία είχαν αποθηκευτεί σε διάλυμα φορμαλδεΐδης και στη συνέχεια έγινε η έκπλυση τους σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS (Σχήμα 26). Όπως και προηγούμενα παρατηρούμε την ύπαρξη όλων των κορυφών που παρουσιάζονται στο φάσμα των δειγμάτων που έχουν σταθεροποιηθεί σε φορμαλδεΐδη, καθώς και των χαρακτηριστικών κορυφών που αποδίδονται σε δονήσεις μορίων του διαλύματος, στα 914 cm^{-1} και 1492 cm^{-1} .

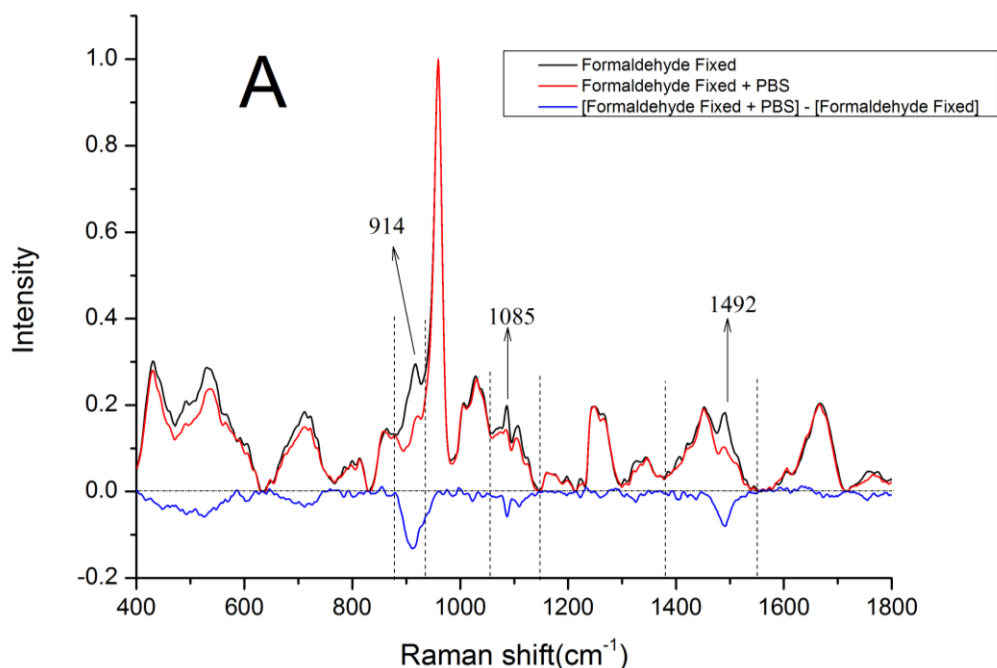
Σημειώνεται πως μετά τη χρήση του PBS και την έκπλυση των οστικών δειγμάτων οι εντάσεις των κορυφών μεταβάλλονται, γεγονός που είναι αναμενόμενο. Είναι γνωστό πως η χρήση του PBS γίνεται για την απομάκρυνση του διαλύτη από τα δείγματα και έτσι αναμένεται οι εντάσεις των κορυφών να πλησιάζουν εκείνες του μη – επεξεργασμένου δείγματος. Στη περίπτωση των χαρακτηριστικών κορυφών της φορμαλδεΐδης παρατηρούμε ότι μετά τη χρήση του PBS και την έκπλυση των δειγμάτων οι αντίστοιχες εντάσεις μειώνονται, αλλά συνεχίζουν να συνυπάρχουν στο φάσμα. Το ίδιο συμβαίνει και με τις κορυφές των ανθρακικών οι οποίες όπως προαναφέρθηκε επηρεάζονται από τη σταθεροποίηση.

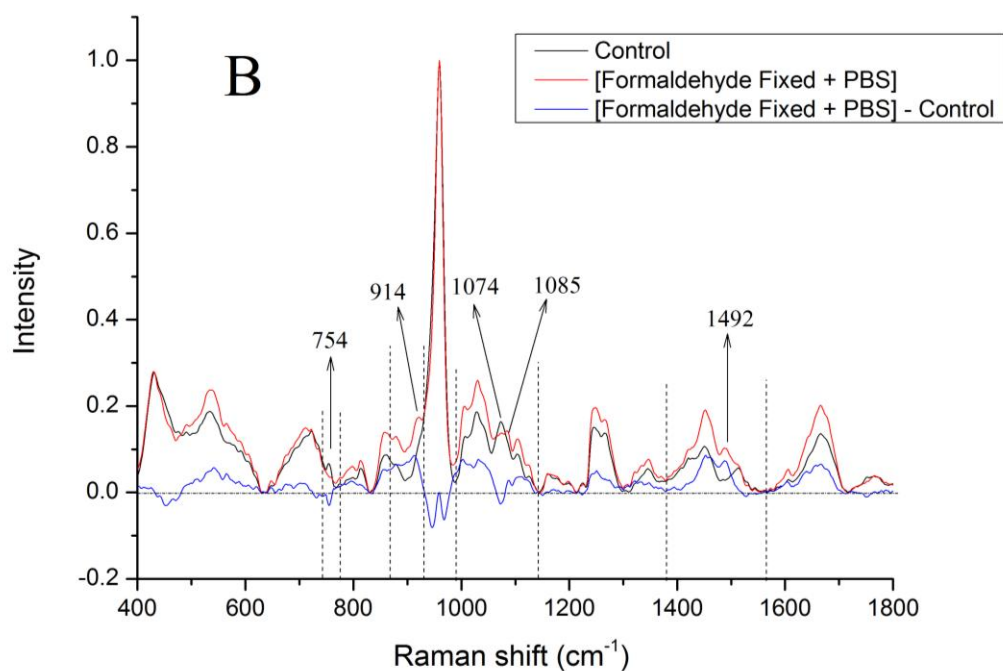


Σχήμα 26: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε διάλυμα φορμαλδεΐδης για διαφορετικά χρονικά διαστήματα και κατόπιν βύθιση σε PBS.

Οι διαφορές γίνονται πιο ξεκάθαρες με τη παρατήρηση του σχήματος 27, όπου γίνεται η σύγκριση των φασμάτων τόσο μεταξύ των δειγμάτων πριν και μετά τη χρήση του PBS όσο και μεταξύ του φάσματος ελέγχου με εκείνου που προκύπτει μετά τη σταθεροποίηση και τη βύθιση στο PBS. Και στις δύο περιπτώσεις παρουσιάζεται και η αντίστοιχη αφαίρεση των φασμάτων.

Στη πρώτη περίπτωση παρατηρούμε ότι το ρυθμιστικό διάλυμα μειώνει τις αντίστοιχες εντάσεις των κορυφών σε σχέση με το φάσμα που προκύπτει από τη μέτρηση απευθείας μετά την αφαίρεση των δειγμάτων από το διάλυμα της φορμαλδεΐδης. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το PBS δεν αφαιρεί όλα τα υπολείμματα της φορμαλδεΐδης και για αυτό το λόγο εξακολουθούν να υπάρχουν οι κορυφές του διαλύτη. Ακόμα, από τη σύγκριση με το δείγμα ελέγχου παρατηρούμε ότι οι εντάσεις των κορυφών είναι υψηλότερες από εκείνες του μη επεξεργασμένου δείγματος και αυτό αποδίδεται στην μη ολοκληρωτική απομάκρυνση της φορμαλδεΐδης από τα οστικά δείγματα μετά τη χρήση του PBS.

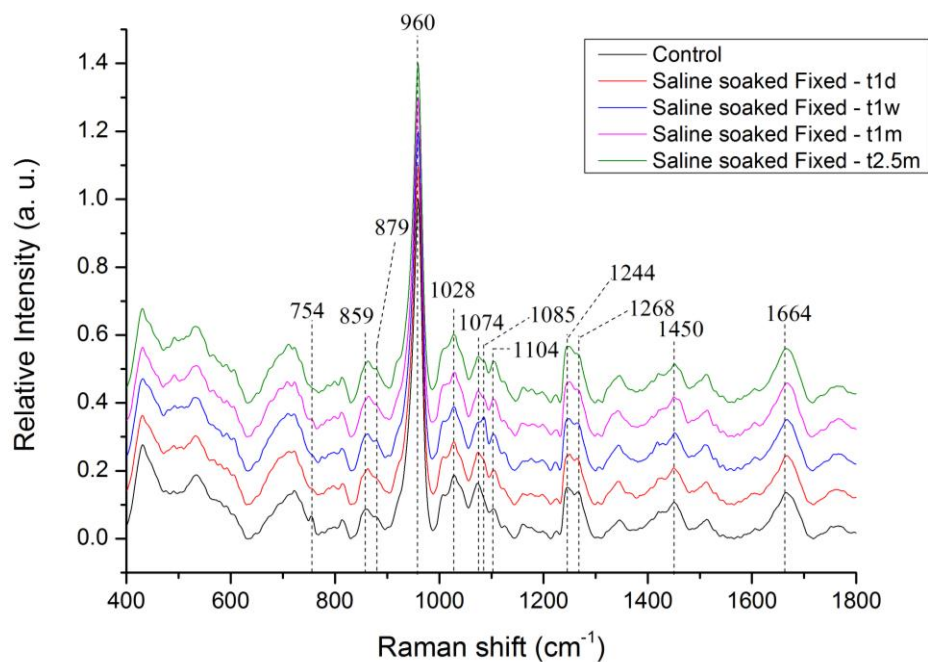




Σχήμα 27: Α) Σύγκριση φάσματος δείγματος σταθεροποιημένο σε διάλυμα φορμαλδεΐδης και χρήση PBS με φάσμα δείγματος σταθεροποιημένο σε διάλυμα φορμαλδεΐδης Β) Σύγκριση φάσματος δείγματος ελέγχου με φάσμα δείγματος σταθεροποιημένο σε διάλυμα φορμαλδεΐδης και χρήση PBS.

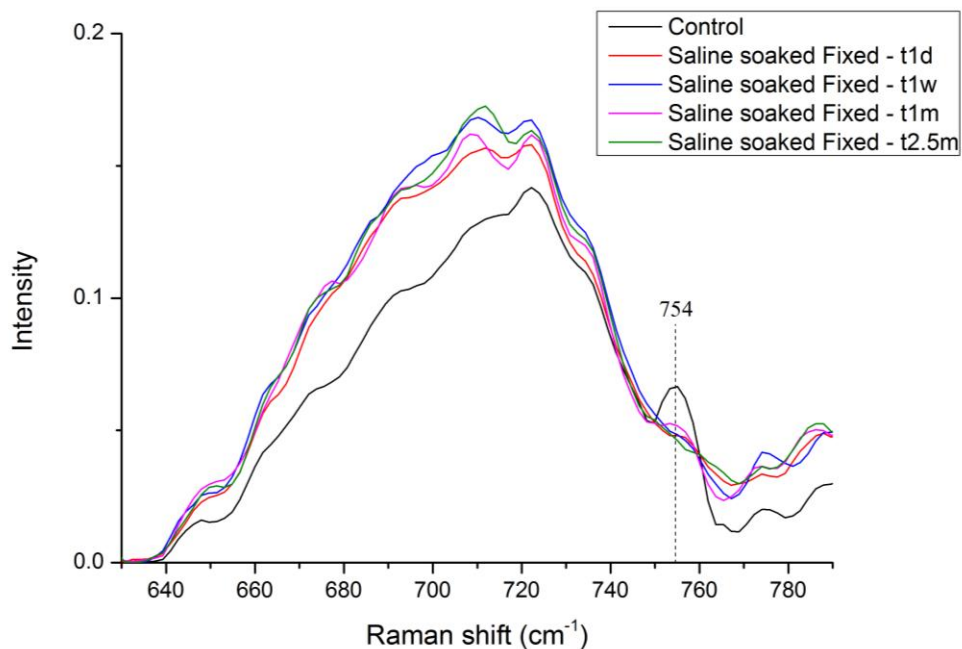
6.2.6. Φάσματα αποθήκευσης σε φυσιολογικό ορό

Παρακάτω παρουσιάζονται τα φάσματα των δειγμάτων τα οποία έχουν αποθηκευτεί για διαφορετικά χρονικά διαστήματα σε διάλυμα φυσιολογικού ορού. Όπως φαίνεται εμφανίζονται όλες οι κορυφές που χαρακτηρίζουν τα οστικά φάσματα, χωρίς να εντοπίζεται κάποια έντονη αλλαγή που να οφείλεται στη χρήση του διαλύτη.



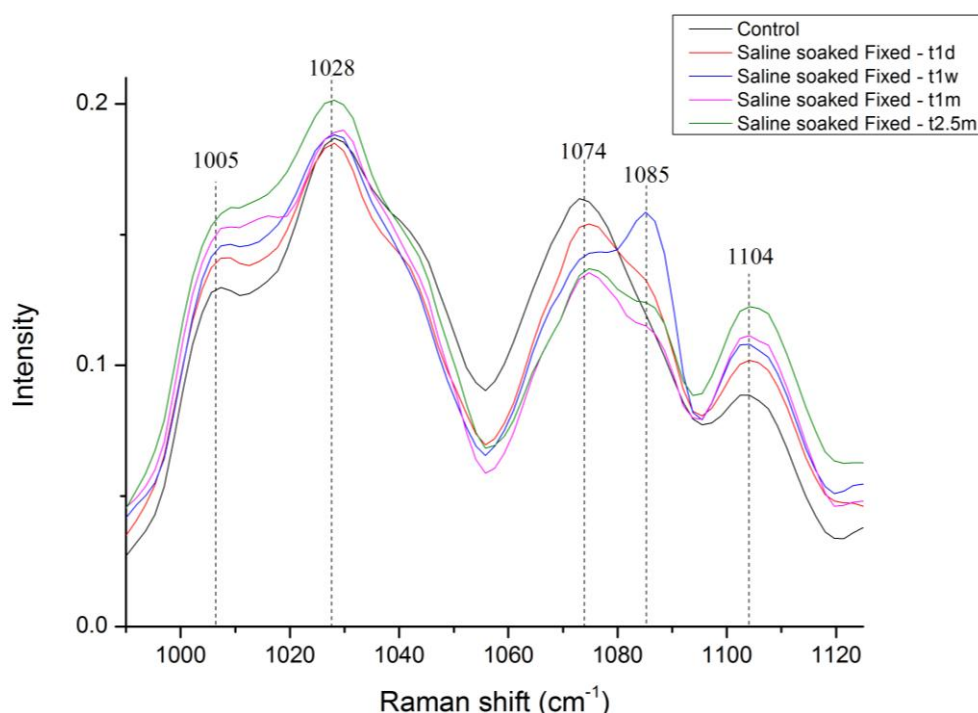
Σχήμα 28: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε φυσιολογικό ορό για διαφορετικά χρονικά διαστήματα.

Αρχικά, μελετώντας τις περιοχές των φασμάτων εντοπίζεται και αυτή τη φορά, η απουσία της κορυφής στα 754 cm^{-1} , όπως έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μεθόδους αποθήκευσης.



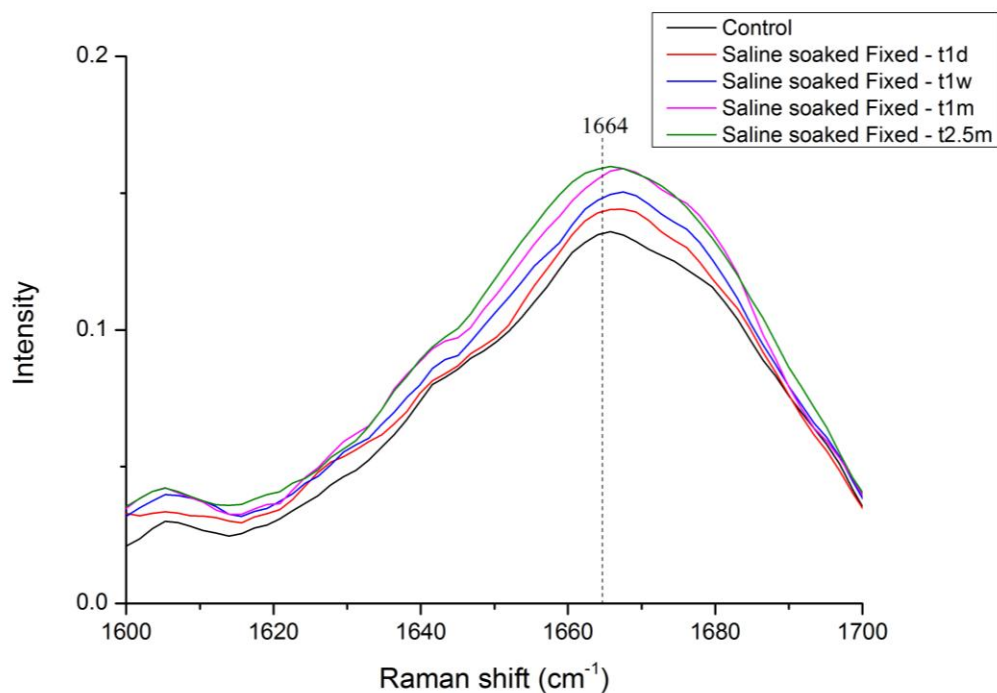
Σχήμα 29: Εντοπισμός κορυφής στα 754 cm^{-1} φασμάτων οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε φυσιολογικό ορό.

Στη συνέχεια εστιάζοντας στη περιοχή των ανθρακικών βλέπουμε ότι επηρεάζονται άμεσα οι εντάσεις των αντίστοιχων κορυφών, όπου για τις κορυφές στα 1005 cm^{-1} , 1028 cm^{-1} και 1104 cm^{-1} σημειώνεται αύξηση των τιμών, ενώ για τη κορυφή των ανθρακικών στα 1074 cm^{-1} καταγράφεται μείωση. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο σχηματισμός της κορυφής στα 1085 cm^{-1} , όπου η ένταση της δεν υποδεικνύει κάποια σχέση ανάλογη του χρονικού διαστήματος αποθήκευσης του οστού στο διάλυμα του φυσιολογικού ορού. Η κορυφή αυτή εμφανίζεται πιο έντονη κατά τη πρώτη εβδομάδα της μέτρησης. Ενώ στα υπόλοιπα διαστήματα παρατηρείται ως ώμος αλλά όχι με ένταση και μορφή όπως στο φάσμα της μιας εβδομάδας.



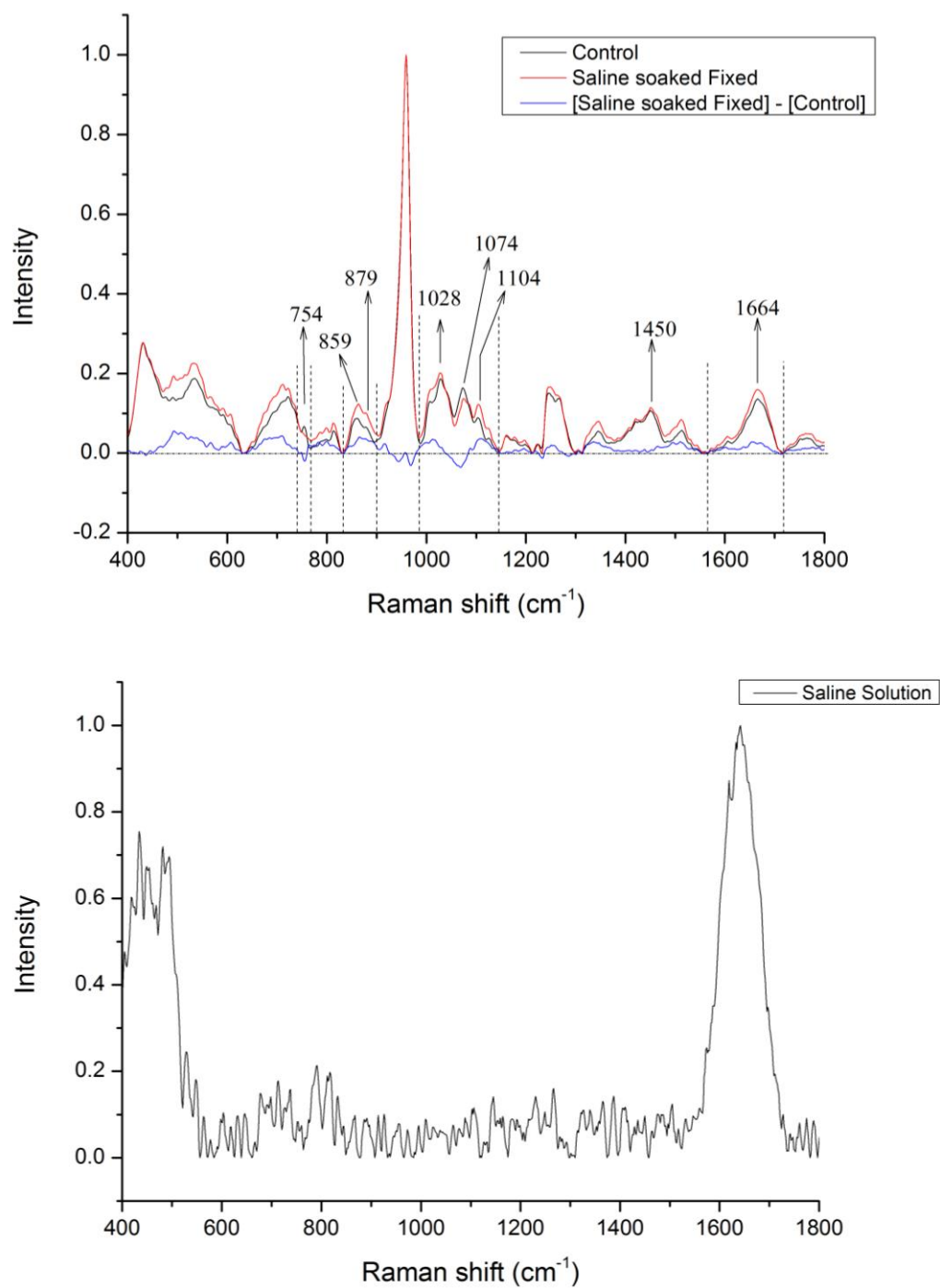
Σχήμα 30: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε φυσιολογικό ορό για τη περιοχή των ανθρακικών.

Ακολουθώντας απομονώνοντας την περιοχή του Αμιδίου Ι παρατηρούμε την αύξηση της τιμής των εντάσεων των κορυφών, η οποία προκύπτει ανάλογη του χρόνου σταθεροποίησης του δείγματος στο διάλυμα. Ακόμα, το τοπικό μέγιστο εμφανίζει μια μικρή μετατόπιση ως προς τον κυματάρημο που εντοπίζεται. Σημειώνεται ότι η περιοχή του Αμιδίου Ι επικαλύπτεται από μια έντονη κορυφή που οφείλεται σε δονήσεις μορίων του φυσιολογικού ορού. Το φάσμα του φυσιολογικού ορού δίνει κορυφές χαμηλής σχετικά έντασης σε όλο το εύρος ενδιαφέροντος του οστικού φάσματος (Σχήμα 32).



Σχήμα 31: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman για οστικά δείγματα αποθηκευμένα σε φυσιολογικό ορό για τη περιοχή του Αμιδίου I.

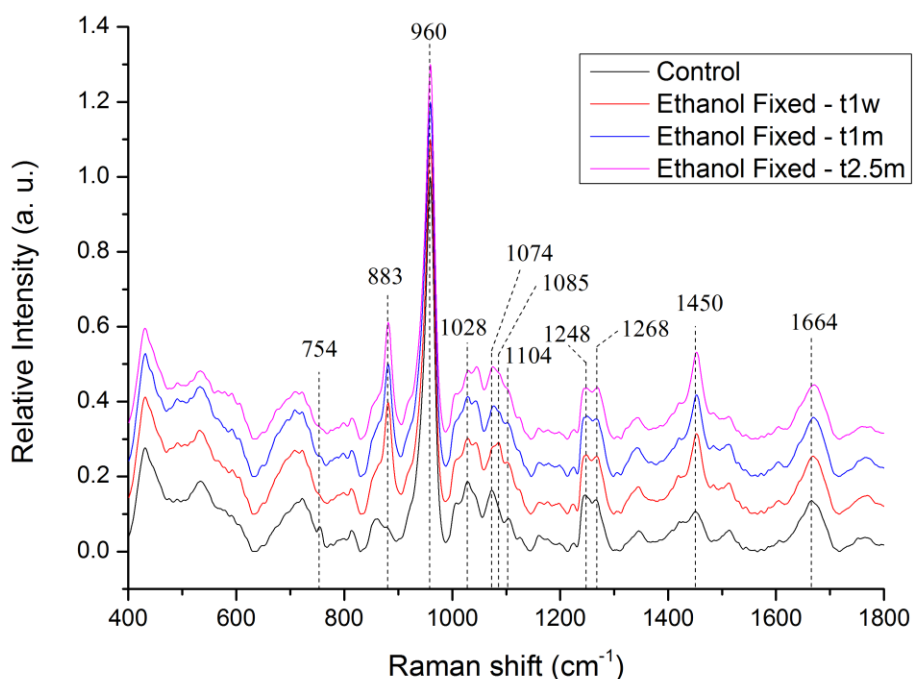
Επιπλέον διαφορές μεταξύ των φασμάτων ελέγχου και των φασμάτων ύστερα από την επεξεργασία μπορούν να εντοπιστούν με την αφαίρεση των δύο φασμάτων. Μετά την αφαίρεση των φασμάτων καταγράφεται η διαφορά ως προς τις εντάσεις των κορυφών. Πέρα από τις διαφορές των περιοχών που αναλύθηκαν παραπάνω, διαφοροποίηση ως προς την ένταση σημειώνεται και στη περιοχή του Αμιδίου III.



Σχήμα 32: α) Σύγκριση φάσματος δείγματος ελέγχου με φάσμα δείγματος σταθεροποιημένο σε φυσιολογικό ορό. β) Φάσμα φυσιολογικού ορού.

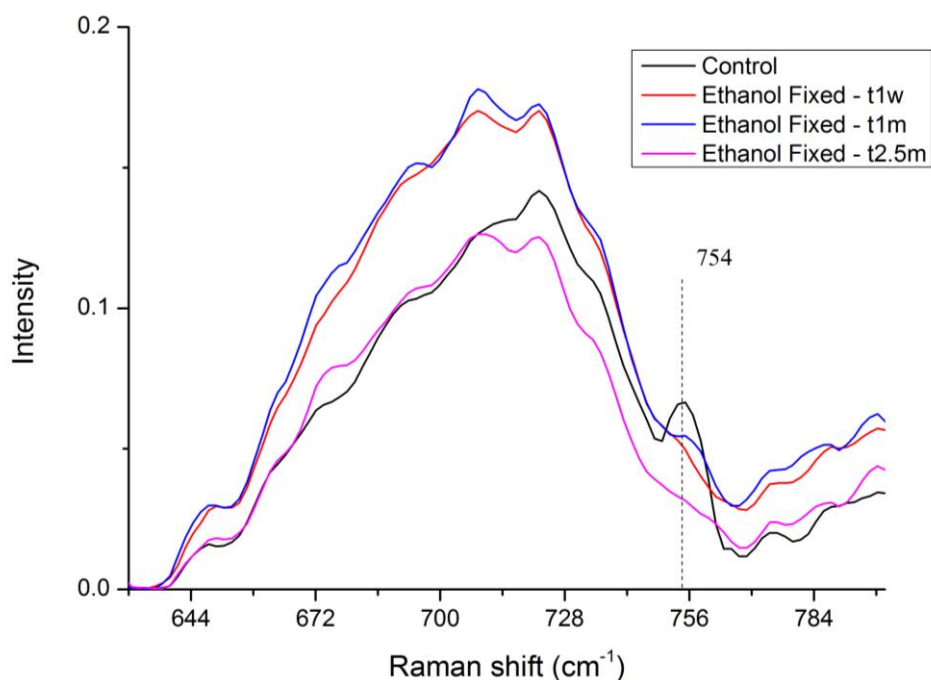
6.2.7. Φάσματα σταθεροποίησης σε διάλυμα 100 % αιθανόλης

Σε αυτή τη περίπτωση πραγματοποιήθηκε η σταθεροποίηση των οστικών δειγμάτων σε διάλυμα 100 % αιθανόλης. Τα φάσματα που συλλέχθηκαν για τα διαφορετικά χρονικά διαστήματα παρουσιάζονται παρακάτω.



Σχήμα 33: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε διάλυμα αιθανόλης για διαφορετικά χρονικά διαστήματα.

Στο σχήμα εμφανίζονται οι κύριες κορυφές των οστικών φασμάτων, οι οποίες καταγράφονται σε όλες τις περιπτώσεις των μεθόδων αποθήκευσης. Όμως, εάν παρατηρήσουμε μεμονωμένα τις περιοχές παρατηρούμε πάλι την απουσία της κορυφής στα 754 cm^{-1} , σε όλα τα φάσματα των δειγμάτων που έχουν αποθηκευτεί σε αιθανόλη για διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Ειδικά το φάσμα που αντιστοιχεί στο μεγαλύτερο διάστημα αποθήκευσης παρουσιάζει τη χαμηλότερη ένταση σε αυτή τη περιοχή.

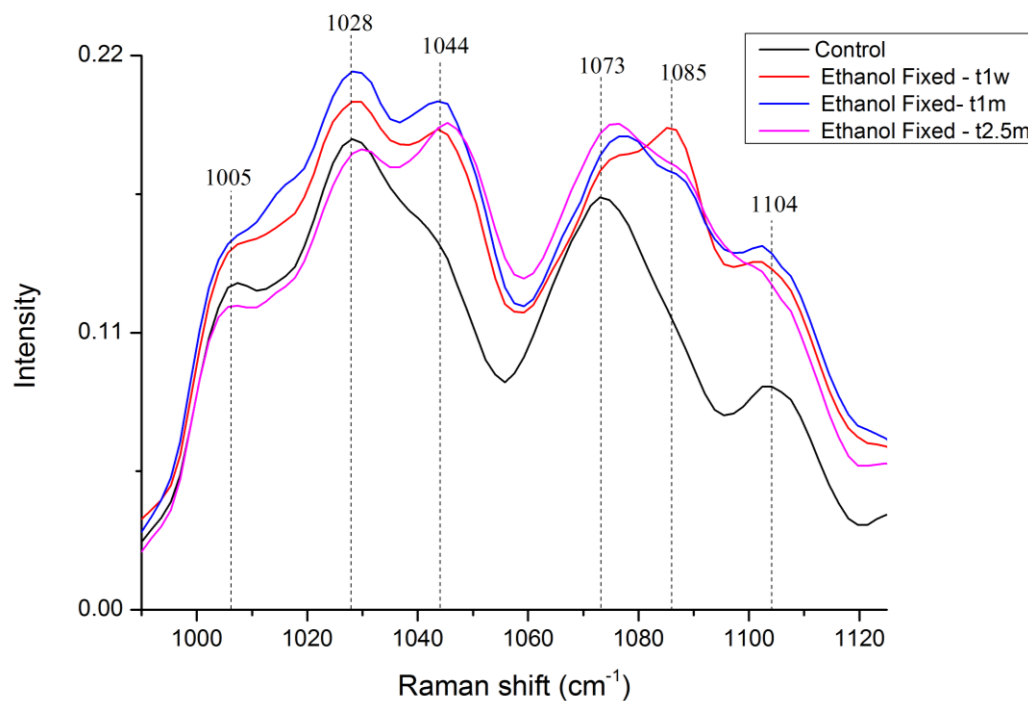


Σχήμα 34: Εντοπισμός κορυφής στα 754 cm^{-1} φασμάτων οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε διάλυμα αιθανόλης.

Κατόπιν, μια σημαντική παρατήρηση είναι ότι η περιοχή που αντιστοιχεί στις προλίνες – υδροξυπρολίνες επικαλύπτεται από μια μπάντα η οποία παρουσιάζει μέγιστο περίπου στα 883 cm^{-1} και η οποία αντιστοιχεί σε δονήσεις μορίων του διαλύματος της αιθανόλης. Πιο συγκεκριμένα, η ευρύς περιοχή των προλινών – υδροξυπρολινών, η οποία χαρακτηρίζεται στα φάσματα ελέγχου ως χαμηλής έντασης, μετά την επικάλυψη από το διάλυμα της αιθανόλης μετατρέπεται σε οξεία, πιο έντονη και στενή κορυφή. Παρόμοια επικάλυψη εντοπίζεται στη κορυφή στα 1453 cm^{-1} , όπου στα φάσματα των δειγμάτων που έχουν υποστεί επεξεργασία η κορυφή αυτή φέρει πιο υψηλή ένταση από τα φάσματα των δειγμάτων ελέγχου λόγω της συνεισφοράς και της μπάντας του διαλύματος στον αντίστοιχο κυματάριθμο (Σχήμα 37).

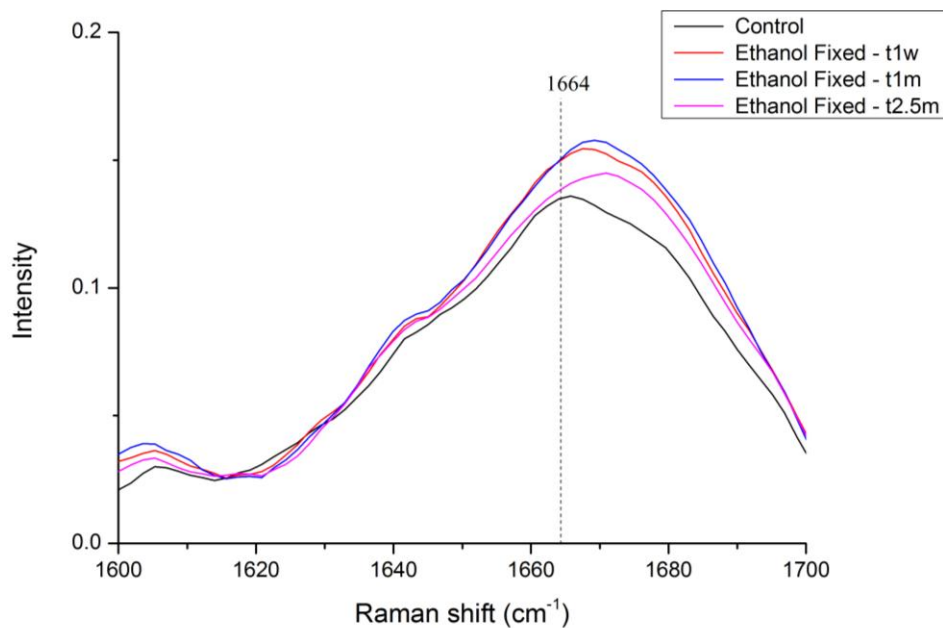
Ακόμα, μια περιοχή η οποία φαίνεται να επηρεάζεται από τη μέθοδο συντήρησης, είναι η περιοχή των ανθρακικών. Συγκεκριμένα, παρατηρούμε αύξηση των εντάσεων των κορυφών, η οποία μπορεί να οφείλεται και σε συνεισφορές του διαλύματος, καθώς το διάλυμα της αιθανόλης εμφανίζει σε αυτή τη περιοχή δύο κορυφές στα 1052 cm^{-1} και 1097 cm^{-1} . Ίσως αυτός είναι και ο λόγος όπου στα φάσματα των επεξεργασμένων δειγμάτων παρατηρείται ο πιο έντονος σχηματισμός της κορυφής στα 1044 cm^{-1} μετά την αποθήκευση. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι πάλι μετά τη χρήση διαλύτη γίνεται εμφανής ο σχηματισμός της κορυφής στα 1085 cm^{-1} , αλλά και η αλλαγή στη μορφή της κορυφής στα 1104 cm^{-1} , η οποία διαφοροποιείται σε μικρό βαθμό ως προς το σχηματισμό της. Τέλος, η βασική κορυφή ενδιαφέροντος που αντιστοιχεί σε δονήσεις ανθρακικών υποκαταστατών

($\nu_1 CO_3^{2-}$), όπου στα φάσματα ελέγχου εμφανίζεται στα 1074 cm^{-1} , παρουσιάζει όπως φαίνεται μια μετατόπιση ως προς τον κυματάριθμο στον οποίο εμφανίζει το μέγιστο της κορυφής.



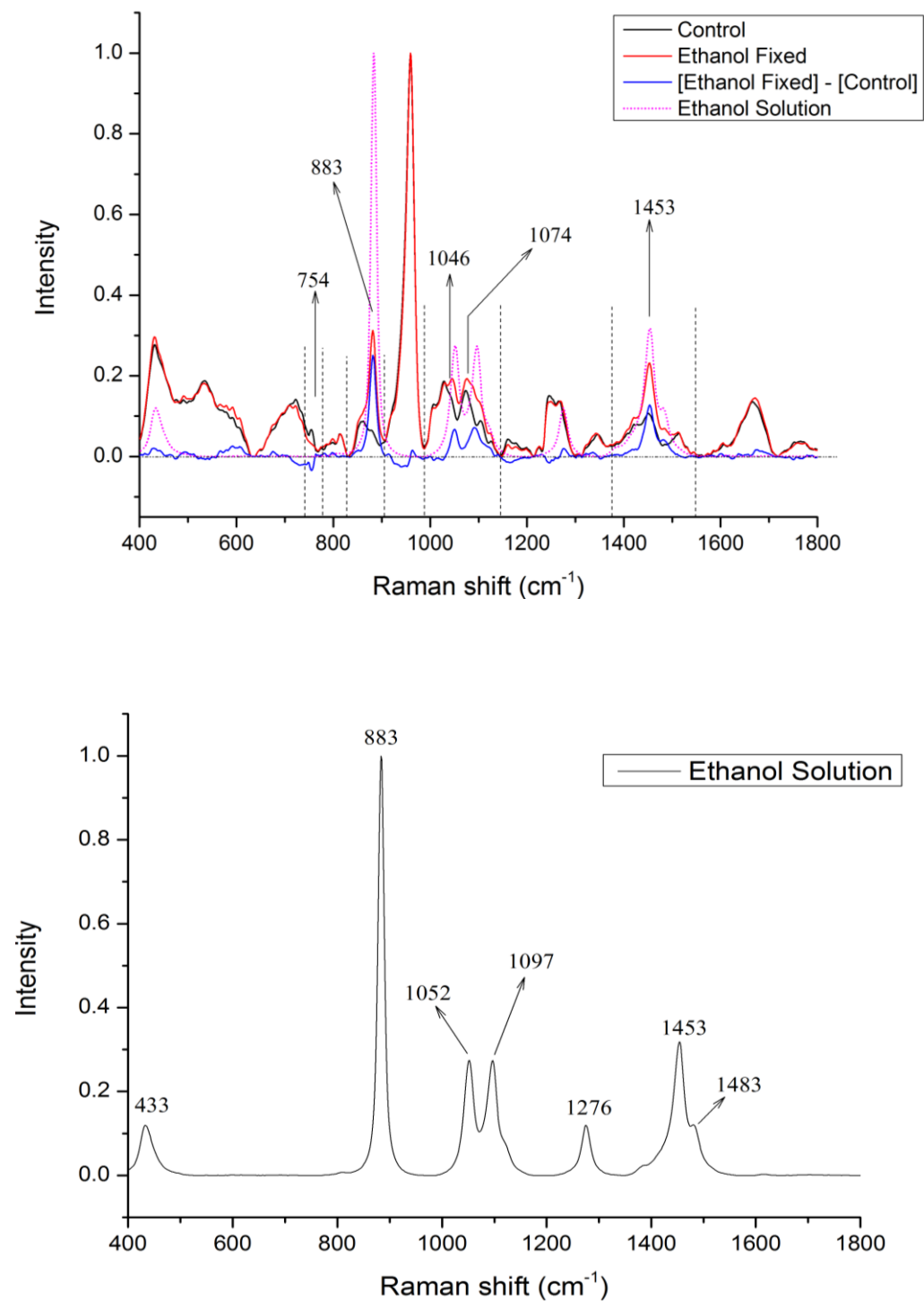
Σχήμα 35: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε διάλυμα αιθανόλης για τη περιοχή των ανθρακικών.

Σχετικά με τη περιοχή του Αμιδίου Ι, με τη χρήση του διαλύματος της αιθανόλης παρατηρείται αύξηση της έντασης της κορυφής και μετατόπιση ως προς τη θέση εμφάνισης του σχετικού μεγίστου, σε μεγαλύτερη τιμή κυματαρίθμου.



Σχήμα 36: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε διάλυμα αιθανόλης για τη περιοχή του Αμιδίου I.

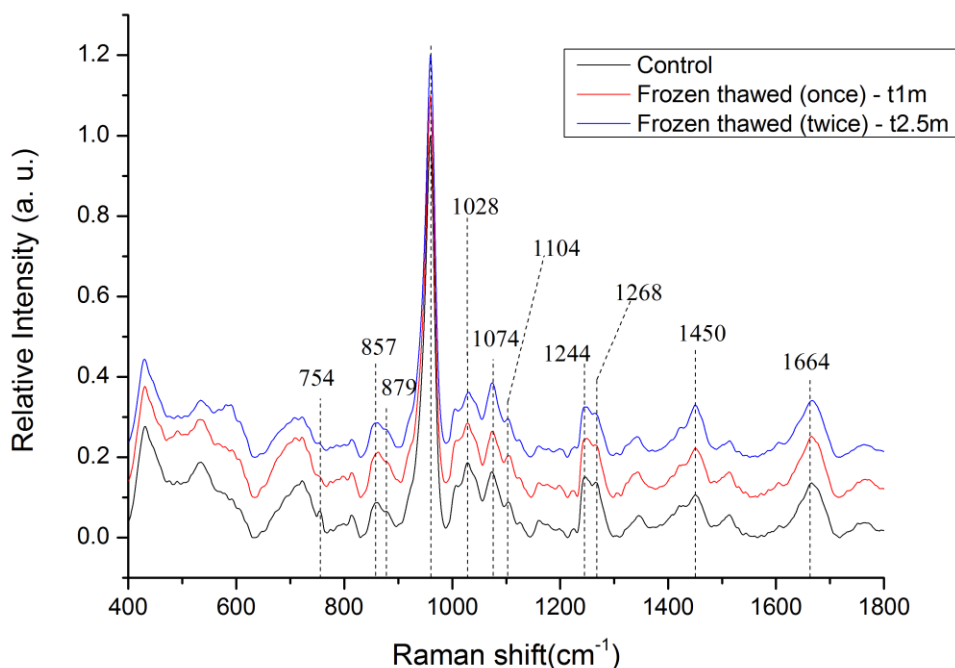
Για τη πιο εύκολη παρατήρηση των διαφορών που προαναφέρθηκαν παρακάτω παρουσιάζεται ένα διάγραμμα στο οποίο καταγράφονται τα φάσματα του δείγματος ελέγχου (μαύρη γραμμή), του δείγματος που έχει σταθεροποιηθεί σε διάλυμα αιθανόλης (κόκκινη γραμμή), η διαφορά των δύο φασμάτων (μπλε γραμμή), αλλά και το φάσμα του διαλύματος της αιθανόλης (ροζ γραμμή). Από το σχήμα είναι εύκολη η παρατήρηση των περιοχών του οστικού φάσματος όπου υπάρχει αλληλοεπικάλυψη των κορυφών από το φάσμα της αιθανόλης. Επίσης παραθέτεται το φάσμα του διαλύματος της αιθανόλης, το οποίο εμφανίζει χαρακτηριστικές κορυφές στα 433 cm^{-1} , 883 cm^{-1} , 1052 cm^{-1} , 1097 cm^{-1} , 1276 cm^{-1} , 1453 cm^{-1} , 1483 cm^{-1} .



Σχήμα 37: α) Σύγκριση φάσματος δείγματος ελέγχου με φάσμα δείγματος σταθεροποιημένο σε διάλυμα αιθανόλης. β) Φάσμα διαλύματος αιθανόλης.

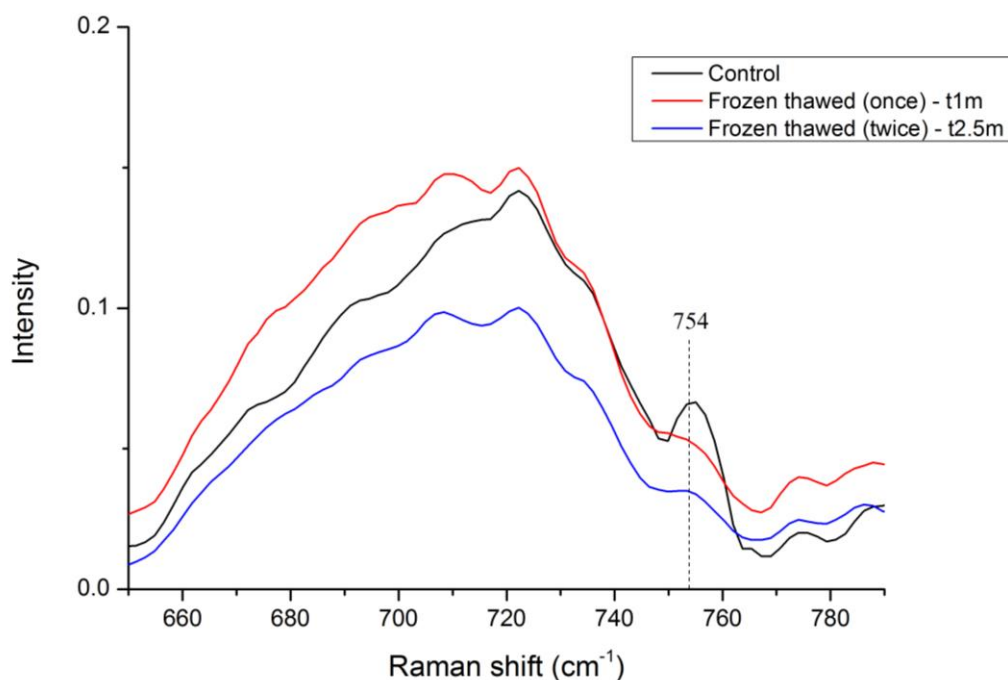
6.2.8. Φάσματα ψύξης - απόψυξης

Στη συνέχεια παραθέτονται τα φάσματα τα οποία προκύπτουν από τα δείγματα τα οποία μετά τη συλλογή τους ψύχθηκαν σε συνθήκες $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ και στη συνέχεια αποψύχθηκαν με σκοπό την μέτρηση τους με φασματοσκοπία Raman. Σημειώνεται ότι τα δείγματα αποψύχθηκαν μόνο δύο φορές.



Σχήμα 38: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε συνθήκες κατάψυξης για διαφορετικά χρονικά διαστήματα.

Μελετώντας προσεχτικά το σχήμα παρατηρούμε ότι τα φάσματα δεν καταγράφουν σημαντικές διαφοροποιήσεις ως προς τις κορυφές τις οποίες εμφανίζουν, εκτός από τη κορυφή στα 754 cm^{-1} , όπου και σε αυτή τη περίπτωση, όμοια και με άλλες μεθόδους αποθήκευσης, δεν παρουσιάζεται, παρά μόνο ως ένας μικρός ώμος (Σχήμα 39).

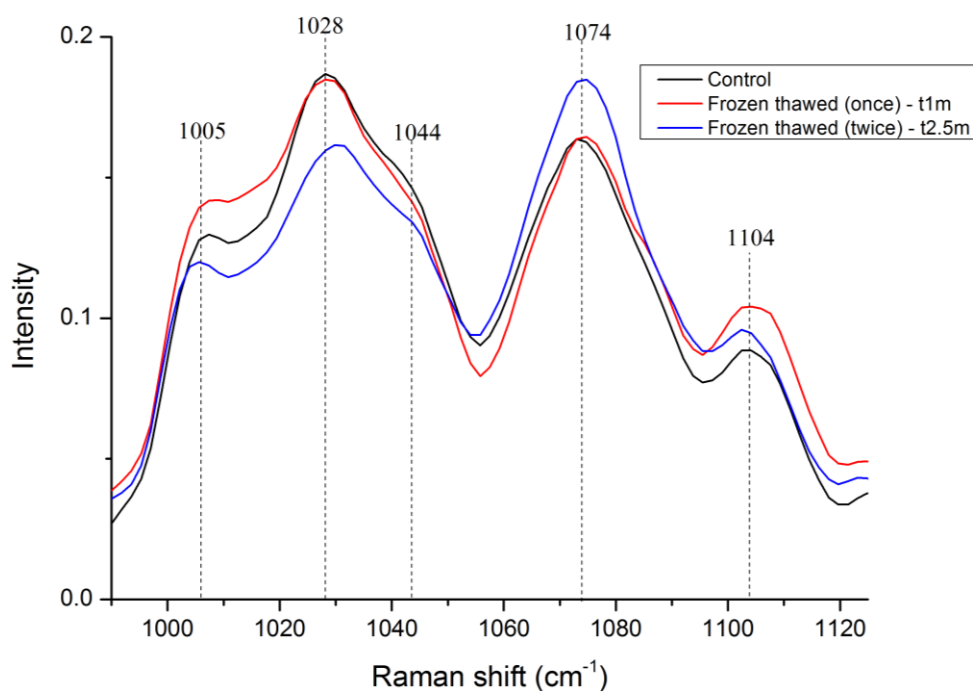


Σχήμα 39: Εντοπισμός κορυφής στα 754 cm^{-1} φασμάτων οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε συνθήκες κατάψυξης.

Συγκρίνοντας τις τιμές των εντάσεων των κορυφών παρατηρούμε μια μικρή αυξομείωση σε κάποιες από τις χαρακτηριστικές κορυφές, με το φαινόμενο να γίνεται πιο έντονο κατά τη περίπτωση όπου η διαδικασία της απόψυξης έχει επέλθει δύο φορές. Το φάσμα των δειγμάτων που έχουν αποψυχθεί μόνο μία φορά παρουσιάζει μορφή αρκετά όμοια με το φάσμα αναφοράς, χωρίς να καταγράφει μεγάλες διαφοροποιήσεις ως προς την ένταση των περισσότερων κορυφών.

Η περιοχή των προλινών - υδροξυπρολινών φαίνεται χαρακτηριστικά να εμφανίζει αύξηση της έντασης για τα αποθηκευμένα δείγματα που έχουν αποψυχθεί μία φορά, ενώ εκείνα στα οποία η διαδικασία επαναλήφθηκε εμφανίζουν ένταση παρόμοια με του φρέσκου οστού. Όσον αφορά την περιοχή των ανθρακικών εμφανίζει αύξηση της τιμής της κορυφής στα 1074 cm^{-1} για το δείγμα που έχει υποστεί διπλή απόψυξη. Ενώ για το αντίστοιχο φάσμα οι τιμές των κορυφών που χαρακτηρίζουν το Αμίδιο III διακρίνονται μειωμένες. Τέλος, μικρή αύξηση καταγράφεται στις τιμές της κορυφής 1450 cm^{-1} και στις δύο περιπτώσεις, όπως και στο Αμίδιο I.

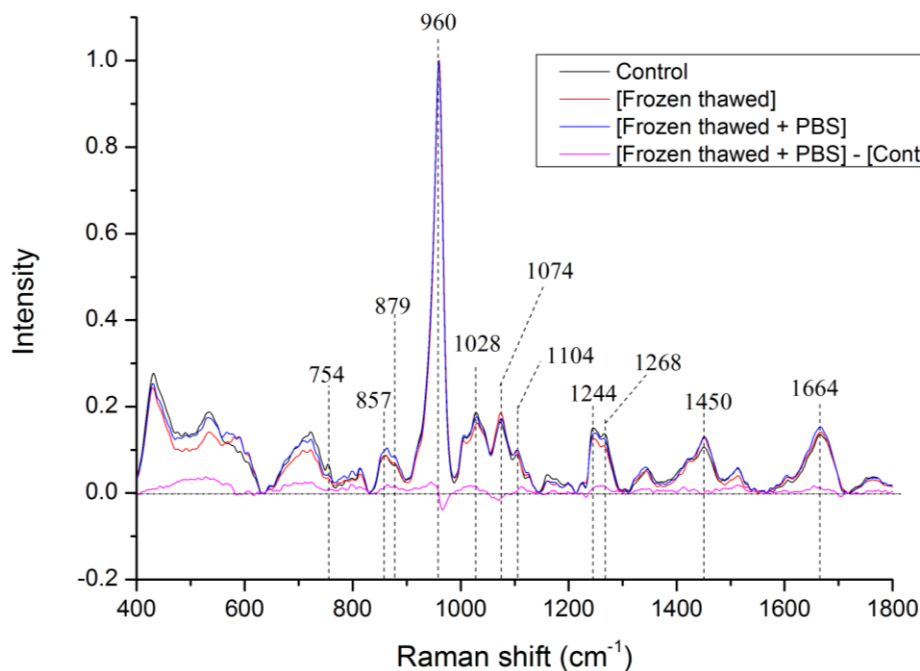
Όσον αφορά την κορυφή που προκύπτει στα 1085 cm^{-1} , παρατηρούμε ότι δεν εμφανίζεται στα φάσματα τα οποία έχουν αποθηκευτεί σε συνθήκες κατάψυξης, σε αντίθεση με μεθόδους συντήρησης όπου γίνεται χρήση διάφορων διαλυτών και στις οποίες η συγκεκριμένη κορυφή εμφανίζει υψηλότερες εντάσεις.



Σχήμα 40: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε συνθήκες κατάψυξης για τη περιοχή των ανθρακικών.

6.2.9. Φάσματα ψύξης – απόψυξης και χρήση PBS

Από τα δείγματα της προηγούμενης ομάδας μελέτης, εκείνα τα οποία είχαν αποψυχθεί για δεύτερη φορά, μετά την πρώτη μέτρηση τους με φασματοσκοπία Raman βυθίστηκαν για ενυδάτωση του οστικού ιστού σε διάλυμα PBS και κατόπιν έγινε επανάληψη της μέτρησης. Στο Σχήμα 41 παρουσιάζεται η σύγκριση και η αφαίρεση του αντίστοιχου φάσματος με το φάσμα του δείγματος ελέγχου και σημειώνονται οι αντίστοιχες κορυφές που σχηματίζονται. Ακόμα, στο ίδιο σχήμα απεικονίζεται και το φάσμα που λήφθηκε πριν την χρήση του διαλύτη, ώστε να είναι εύκολη η λήψη συμπερασμάτων σχετικά με τις αλλαγές που προκύπτουν στο φάσμα μετά την ενυδάτωση του δείγματος.

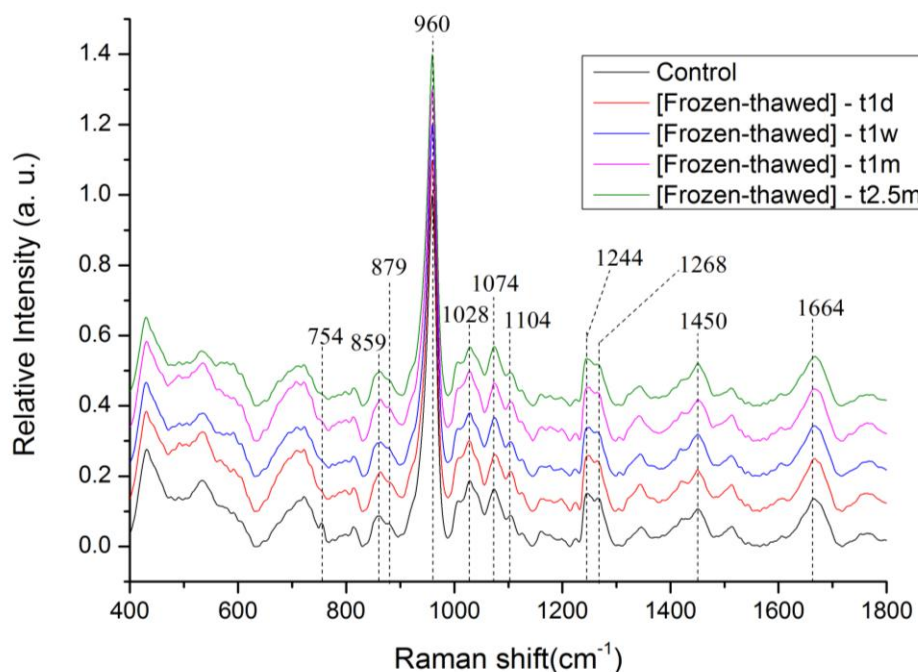


Σχήμα 41: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων σε συνθήκες κατάψυξης και κατόπιν χρήσης PBS.

Όπως παρατηρούμε τα φάσματα δεν παρουσιάζουν διαφορές ως προς το κυματάριθμο στον οποίο εντοπίζονται οι κορυφές ενδιαφέροντος. Η βασική διαφορά αφορά πάλι τις εντάσεις των κορυφών, όπου στη περίπτωση όπου γίνεται χρήση του PBS αυξάνονται οι εντάσεις και η εικόνα του φάσματος πλησιάζει αυτή του φάσματος αναφοράς του δείγματος ελέγχου. Όμως, παρατηρούμε και μετά την ενυδάτωση με τη χρήση του διαλύτη δεν εμφανίζεται η κορυφή στα 754 cm^{-1} , η οποία υπάρχει χαρακτηριστικά στα φάσματα ελέγχου. Σε γενικές γραμμές, όσον αφορά τις διαφοροποιήσεις στις εντάσεις των κορυφών παρατηρούνται όμοιες με αυτές που καταγράφονταν και πριν τη χρήση του διαλύτη, με τη διαφορά ότι όλες έχουν υποστεί μια επιπλέον μικρή αύξηση, λόγω του σήματος που προκύπτει από το διάλυμα το οποίο όπως είδαμε παρουσιάζει κορυφές χαμηλής έντασης και εύρους σε όλη τη περιοχή ενδιαφέροντος του οστικού φάσματος.

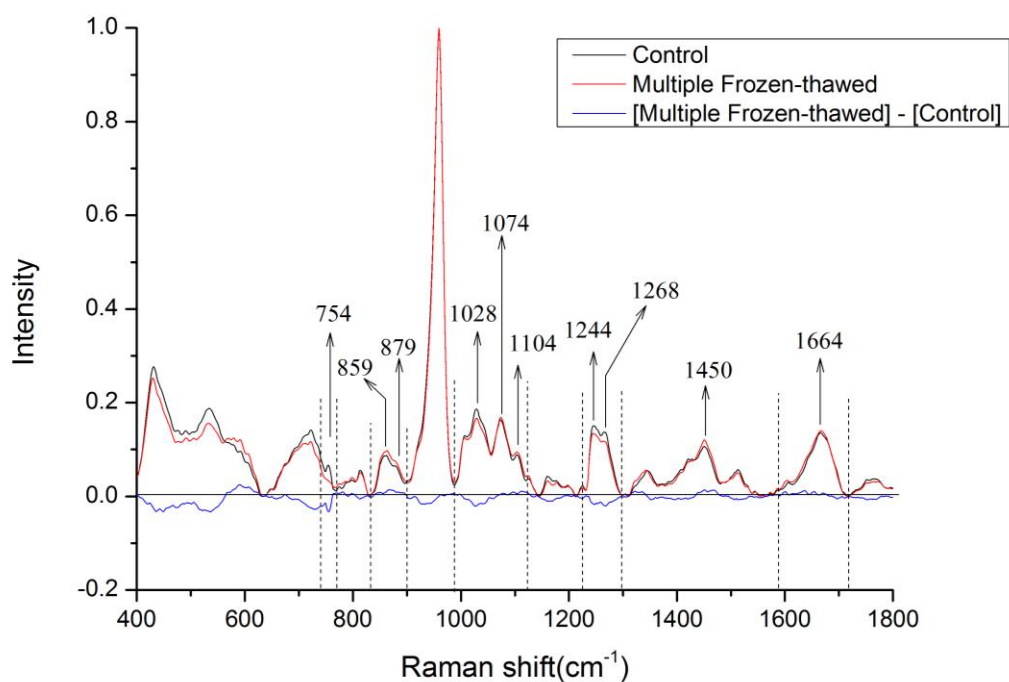
6.2.10. Φάσματα πολλαπλών κύκλων ψύξης – απόψυξης

Τα φάσματα τα οποία προκύπτουν από τα δείγματα τα οποία υπόκεινται σε επαναλαμβανόμενους κύκλους ψύξης – απόψυξης παρουσιάζονται στο παρακάτω σχήμα.



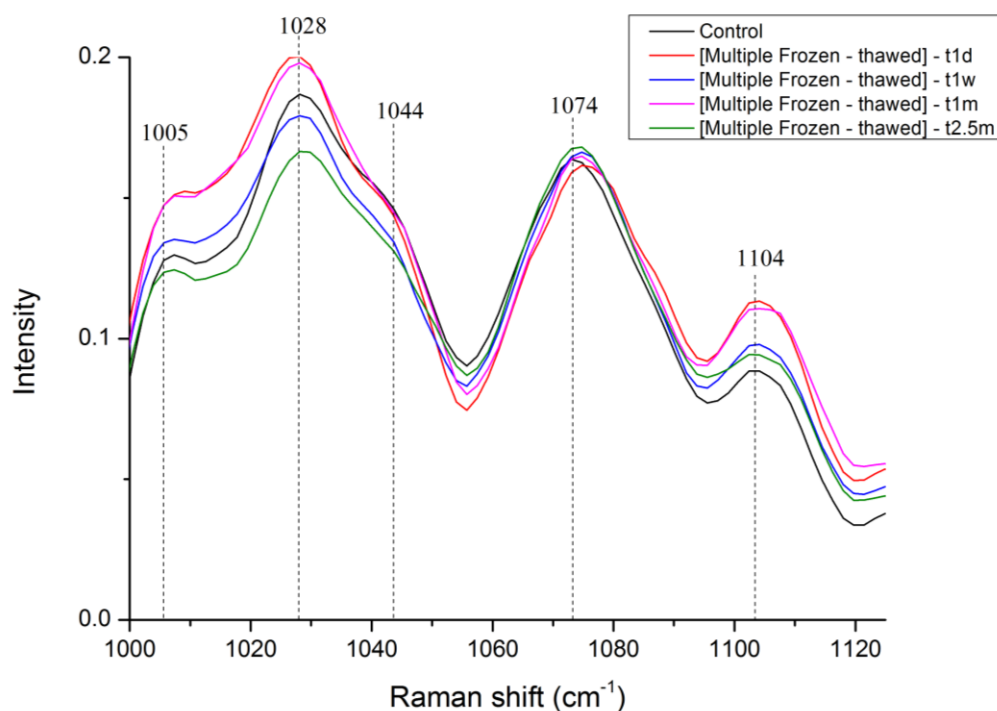
Σχήμα 42: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων αποθηκευμένων που έχουν υποστεί πολλαπλούς κύκλους ψύξης – απόψυξης για διαφορετικά χρονικά διαστήματα.

Παρατηρείται η εμφάνιση όλων των βασικών κορυφών που χαρακτηρίζουν τα οστικά φάσματα. Και σε αυτή τη περίπτωση η κορυφή στα 754 cm^{-1} απουσιάζει από όλα τα φάσματα των δειγμάτων που έχουν αποθηκευτεί για τα διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Οι επιπλέον διαφορές που προκύπτουν παρουσιάζονται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 43) και αφορούν κυρίως τις εντάσεις των κορυφών, οι οποίες επηρεάζονται από τη μέθοδο αποθήκευσης.



Σχήμα 43: Σύγκριση φάσματος δείγματος ελέγχου με φάσμα δείγματος που έχει υποστεί πολλαπλούς κύκλους ψύξης – απόψυξης.

Όπως χαρακτηριστικά βλέπουμε σημειώνεται μια μείωση των εντάσεων των κορυφών σε σχέση με το φάσμα ελέγχου, όπως για παράδειγμα στη περιοχή του Αμιδίου III. Στη περιοχή των ανθρακικών και συγκεκριμένα στη κορυφή που αφορά τις δονήσεις ν_3 των φωσφορικών υποκαταστατών ($\nu_3 PO_4^{3-}$), 1028 cm^{-1} , παρατηρούμε μια περίεργη αυξομείωση των εντάσεων σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, ενώ η κορυφή στα 1104 cm^{-1} σημειώνει αύξηση σε όλα τα χρονικά σημεία λήψης των φασμάτων (Σχήμα 44). Σχετική μείωση σημειώνεται και στη βασική κορυφή των φωσφορικών στα 960 cm^{-1} . Επίσης, όσον αφορά τη περιοχή του Αμιδίου I σημειώνεται αύξηση ως προς τη θέση εμφάνισης του μεγίστου της κορυφής.

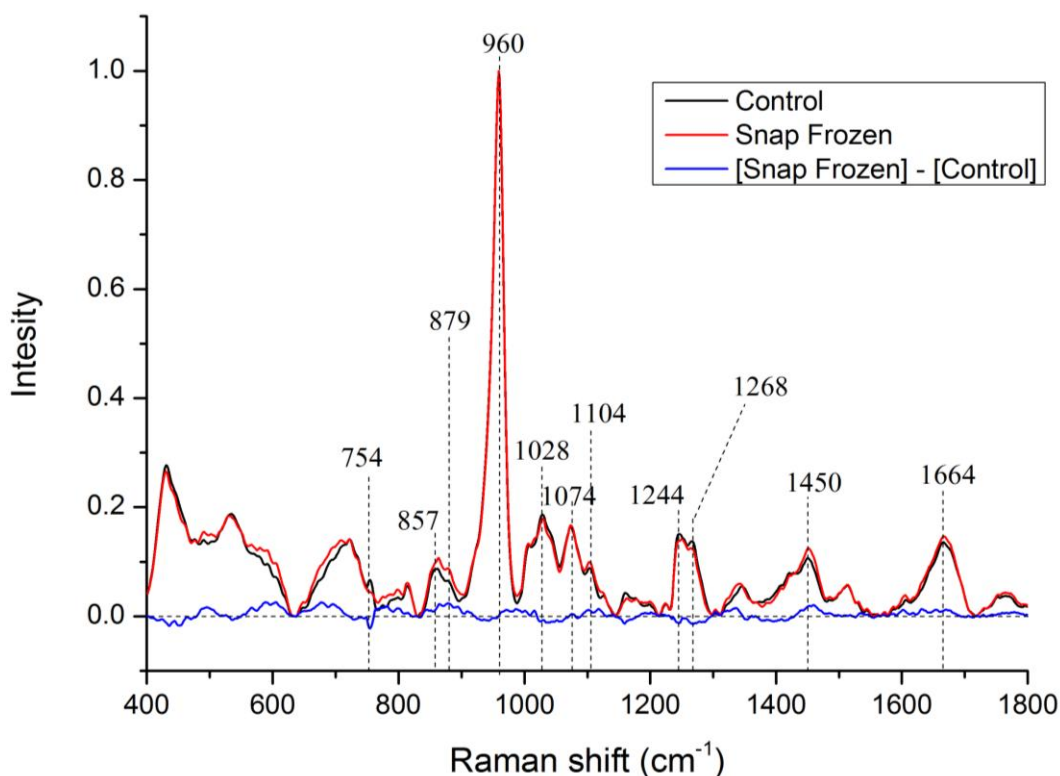


Σχήμα 44: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων που έχουν υποστεί πολλαπλούς κύκλους ψύξης - απόψυξης για τη περιοχή των ανθρακικών.

Άξιο αναφοράς είναι το γεγονός ότι ούτε σε αυτή τη μέθοδο παρατηρείται η εμφάνιση της κορυφής στα 1085 cm^{-1} , χαρακτηριστική κορυφή της δόνησης των ανθρακικών του ασβεστίτη.

6.2.11. Φάσματα στιγμιαίας ψύξης και συμπληρωματικής κατάψυξης

Με παρόμοια διαδικασία με προηγούμενα γίνεται η ανάλυση των φασμάτων που έχουν προκύψει από δείγματα τα οποία λίγο μετά τη συλλογή τους από τα πτηνά ψύχθηκαν στιγμιαία με τη χρήση υγρού αζώτου και στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν για συμπληρωματική κατάψυξη σε συνθήκες $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, για χρονικό διάστημα ενός μήνα. Παρακάτω παρουσιάζεται το φάσμα ενός δείγματος που έχει υποστεί την διαδικασία που περιγράφηκε σε σύγκριση με το φάσμα αναφοράς του δείγματος ελέγχου. Στο ίδιο σχήμα περιλαμβάνεται και η μεταξύ τους αφαίρεση για τη κατανόηση των διαφορών που προκύπτουν από τη μέθοδο αποθήκευσης στη φασματοσκοπική εικόνα.



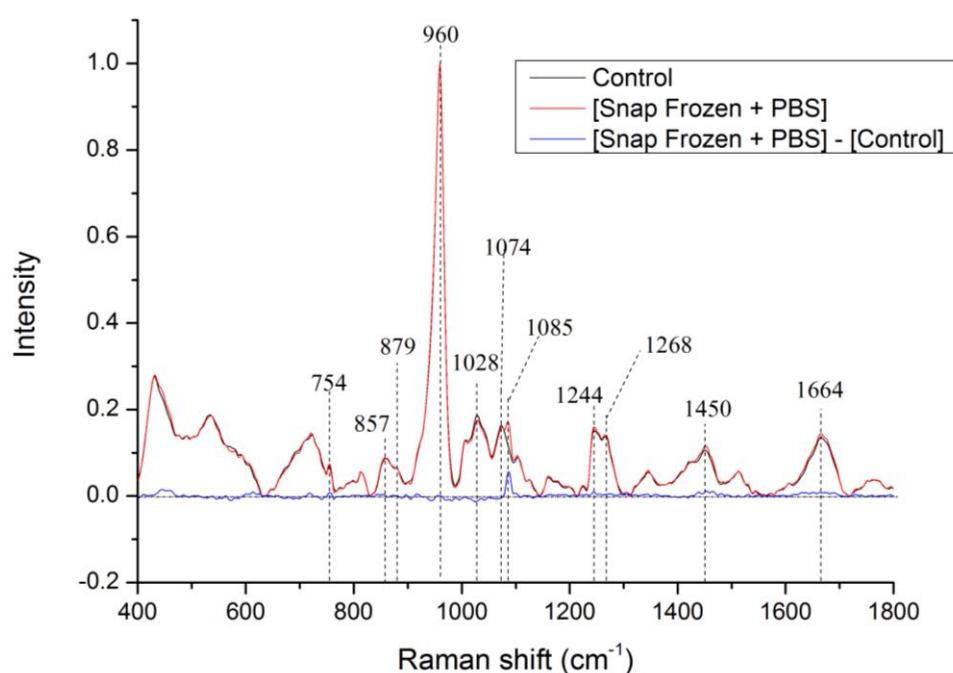
Σχήμα 45: Σύγκριση φάσματος δείγματος ελέγχου με φάσμα δείγματος που έχει υποστεί στιγμιαία ψύξη και συμπληρωματική κατάψυξη.

Όπως προκύπτει και από την αφαίρεση των δύο φασμάτων, οι διαφορές που προκύπτουν είναι μικρές και αφορούν περισσότερο τις εντάσεις των κορυφών. Το φάσμα του δείγματος που έχει υποστεί επεξεργασία παρατηρούμε ότι εμφανίζει όλες τις χαρακτηριστικές κορυφές ενός οστικού φάσματος, όμως και αυτό δεν εμφανίζει τη κορυφή που υπάρχει στο φάσμα ελέγχου στα 754 cm^{-1} . Ακόμα στη περιοχή των προλινών – υδροξυπρολινών φαίνεται να έχει υψηλότερες εντάσεις των αντίστοιχων κορυφών, όπως το ίδιο παρατηρείται και για την κορυφή στα 1450 cm^{-1} , που αποδίδεται στη παλλόμενη (wagging) δόνηση κάμψης του δεσμού $\delta(\text{CH}_2)$. Μικρή αύξηση του μεγίστου της έντασης σημειώνεται και για τη μπάντα του Αμιδίου Ι. Σε γενικές γραμμές, οι πιο έντονες αλλαγές ως προς την ένταση εμφανίζονται στη περιοχή $400\text{ -}900\text{ cm}^{-1}$ του οστικού φάσματος.

Όσον αφορά την περιοχή των ανθρακικών, η κορυφή που σχετίζεται με το βαθμό ανθρακικών υποκαταστάσεων, στα 1074 cm^{-1} , μοιάζει αναλλοίωτη ως προς τη μορφή και τη θέση της. Σημειώνεται ότι η κορυφή των 1085 cm^{-1} που έχει καταγραφεί σε αρκετές περιπτώσεις αποθηκευμένων οστών, εδώ δεν σχηματίζεται. Τέλος, η κορυφή στα 1104 cm^{-1} , χαρακτηριστική των ανθρακικών τύπου Α εμφανίζει αύξηση στην ένταση της.

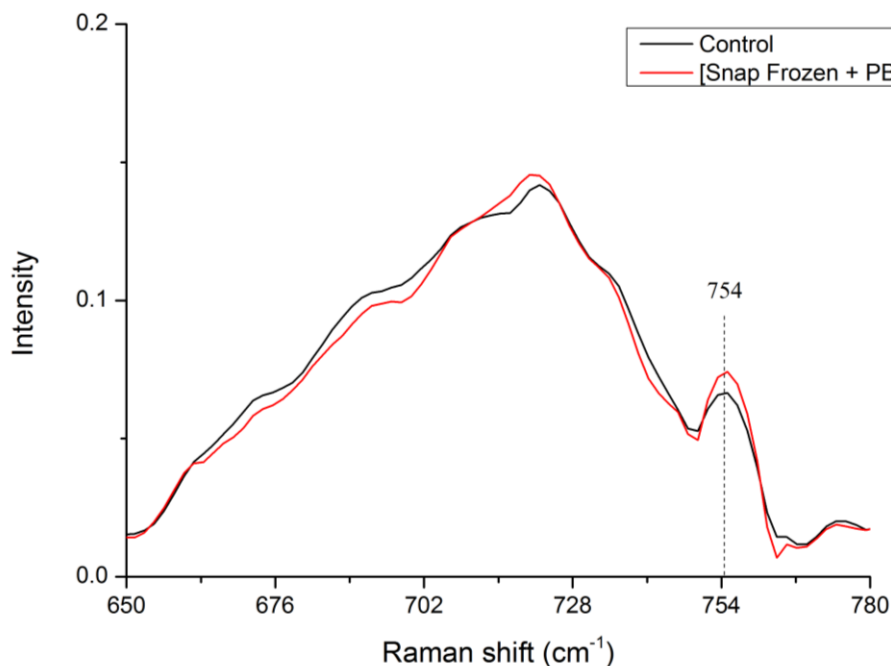
6.2.12. Φάσματα στιγμιαίας ψύξης και χρήσης PBS

Ακολουθώς παρουσιάζεται η σύγκριση μεταξύ των φασμάτων που λαμβάνονται από τα οστικά δείγματα ελέγχου (μαύρη γραμμή) αλλά και των δειγμάτων τα οποία μετά τη συλλογή τους ψύχθηκαν στιγμιαία με τη χρήση υγρού αζώτου και στη συνέχεια βυθίστηκαν απευθείας σε διάλυμα PBS (κόκκινη γραμμή) για ενυδάτωση και αποφυγή της καταστροφής του κολλαγόνου. Στο διάγραμμα παρουσιάζεται και η διαφορά που προκύπτει μεταξύ των φασμάτων (μπλέ γραμμή). Όπως παρατηρούμε οι διαφορές είναι αρκετά μικρές. Οι κορυφές παρατηρούμε ότι δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερες αποκλείσεις ως προς την θέση και ένταση των κορυφών και τα φάσματα σχεδόν ταυτίζονται.



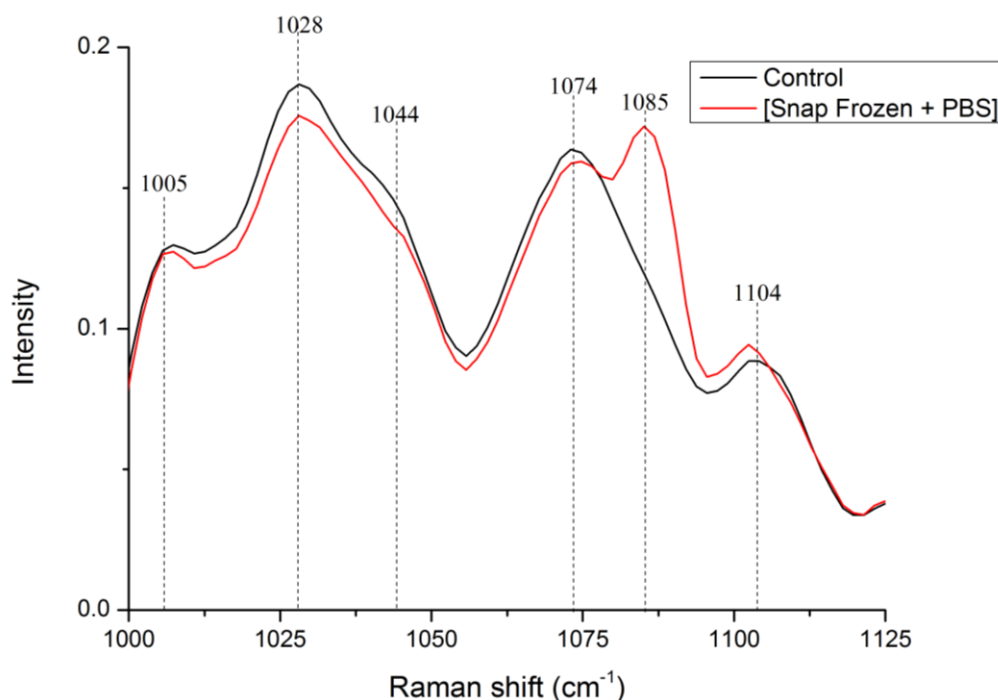
Σχήμα 46: Σύγκριση φάσματος δείγματος ελέγχου με φάσμα δείγματος που έχει υποστεί στιγμιαία ψύξη και κατόπιν βύθιση σε PBS.

Ενδιαφέρον έχει ότι σε αυτή τη περίπτωση επεξεργασίας των δειγμάτων η κορυφή η οποία παρατηρείται στα 754 cm^{-1} στο φάσμα αναφοράς και η οποία στις υπόλοιπες ομάδες μελέτης απουσιάζει μετά τη διαδικασία της αποθήκευσης, παρουσιάζεται σε αυτή τη περίπτωση και μάλιστα σημειώνει μια μικρή αύξηση ως προς την ένταση της.



Σχήμα 47: Εντοπισμός κορυφής στα 754 cm^{-1} φασμάτων οστικών δειγμάτων που έχουν υποστεί στιγμιαία ψύξη και κατόπιν βύθιση σε PBS.

Ακόμα, αναλύοντας την ανθρακική περιοχή του φάσματος παρατηρούμε ότι οι εντάσεις των κορυφών στα 1005 cm^{-1} , 1028 cm^{-1} , 1044 cm^{-1} , 1074 cm^{-1} παρουσιάζουν χαμηλότερες εντάσεις από το φάσμα του δείγματος ελέγχου αλλά δεν παρουσιάζονται μετατοπίσεις κυματάριθμων των αντίστοιχων μεγίστων. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η εμφάνιση της οξείας και έντονα σχηματισμένης κορυφής στα 1085 cm^{-1} , η οποία απουσιάζει από το πρότυπο φάσμα. Υπενθυμίζουμε ότι σε προηγούμενη επεξεργασία δειγμάτων με τη χρήση υγρού αζώτου και αποθήκευση των οστών σε συνθήκες κατάψυξης δεν καταγράφηκε η ύπαρξη αυτής της κορυφής. Επομένως, μπορούμε να καταλήξουμε στο συμπέρασμα ότι η εμφάνιση αυτής της κορυφής είναι αποτέλεσμα της επίδρασης του διαλύτη (PBS) με την ανόργανη φάση του οστού και αυτός είναι και ο λόγος που και στις υπόλοιπες ομάδες μελέτης στις οποίες γίνεται επεξεργασία των οστών με τη χρήση κάποιου διαλύτη εμφανίζεται έντονα σχηματισμένη η συγκεκριμένη κορυφή. Τέλος, η κορυφή στα 1104 cm^{-1} εμφανίζεται με μια μικρή αύξηση έντασης. Αυξήσεις παρόμοιου μεγέθους εντοπίζονται για τις κορυφές του Αμιδίου III, 1450 cm^{-1} και του Αμιδίου I.



Σχήμα 48: Συγκριτική παράθεση φασμάτων Raman οστικών δειγμάτων που έχουν υποστεί στιγμιαία ψύξη και κατόπιν βύθιση σε PBS για τη περιοχή των ανθρακικών.

6.3. Ποσοτική ανάλυση οστού

Μετά τη συγκριτική παρατήρηση των φασμάτων Raman των οστικών δειγμάτων και την ανάλυση των επιμέρους περιοχών ενδιαφέροντος πραγματοποιήθηκε ποσοτική ανάλυση για την ταυτοποίηση των διαφορών που παρατηρούνται στα οστικά φάσματα.

6.3.1. Υπολογισμός ποσοτικών παραμέτρων φασμάτων Raman

Για τον ποιοτικό και ποσοτικό χαρακτηρισμό των κορυφών των δειγμάτων αλλά και του συνολικού φάσματος που αυτές συνιστούν, έγινε ο υπολογισμός της έντασης των επιμέρους κορυφών και η σύγκριση των σχετικών τιμών τους. Οι τιμές προέκυψαν από τη διαδικασία της αποσυνέλιξης.

Οι λόγοι οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για τη σύγκριση των φασμάτων και τη λήψη των αντίστοιχων συμπερασμάτων είναι οι εξής :

- Ο λόγος της έντασης της κορυφής που εντοπίζεται στα 960 cm^{-1} και αποδίδεται στη συμμετρική δόνηση έκτασης ν_1 των φωσφορικών του

βιοαπατίτη προς την ένταση της κορυφής κοντά στα 1664 cm^{-1} , που αντιστοιχεί στη δόνηση έκτασης του αμιδικού δεσμού I [$\nu(\text{C=O})$], I_{960}/I_{1664} .

Η τιμή του λόγου σχετίζεται με την ποσοτική αναλογία των ανόργανων συστατικών, που εντοπίζονται στον οστίτη ιστό, προς των οργανικών (Mineral to Matrix Ratio – MMR).

- Ο λόγος της έντασης της κορυφής στα 1074 cm^{-1} , η οποία αντιστοιχεί σε δονήσεις ν_1 των ανθρακικών υποκαταστατών ($\nu_1\text{CO}_3^{2-}$) προς την ένταση της κορυφής στα 960 cm^{-1} , I_{1074}/I_{960} . Η τιμή του λόγου σχετίζεται με τη

ποσότητα των ανθρακικών προς τα φωσφορικά του βιοαπατίτη (Carbonate to Phosphate Ratio – CPR).

- Ο λόγος της έντασης της κορυφής στα 1074 cm^{-1} προς την ένταση της κορυφής στα 1664 cm^{-1} , I_{1074}/I_{1664} . Η τιμή του λόγου δίνει πληροφορίες

που αφορούν τη σχέση των ανθρακικών με τα οργανικά συστατικά των οστών (Carbonate to Amide I Ratio).

Σχετικά με τους λόγους που εξετάζονται η τιμή MMR, η οποία αντιστοιχεί στο λόγο των ανόργανων προς τα οργανικά συστατικά, αποτελεί κριτήριο αξιολόγησης των οστέινων ιστών σχετικά με το βαθμό της ασβεστοποίησης τους (επαρκής – ελλειμματική – ανεπαρκής ασβεστοποίηση) [14].

Παρόλο που η κορυφή των φωσφορικών 959 cm^{-1} είναι καθολικά αποδεκτή ως μέτρο των ανόργανων συστατικών του οστού, υπάρχει διαφωνία για τις κορυφές οι οποίες χρησιμοποιούνται ως μέτρο της οργανικής μήτρας. Υποψήφιες κορυφές αποτελούν το Αμίδιο I (1660 cm^{-1}), το Αμίδιο III (1242 cm^{-1}) [15], το οποίο εκτείνεται στην ευρεία περιοχή ($1242\text{--}1320\text{ cm}^{-1}$), οι μπάντες της μήτρας οι οποίες βασίζονται σε πλευρικές αλυσίδες του μεθυλενίου (CH_2 deformation) (1446 cm^{-1}) [16,17,18], η φαινυλαλανίνη (Phe) (περίπου στα 1003 cm^{-1}) [19,20,21], η CH stretch (περίπου στα 2940 cm^{-1}) [16,22,21]. Ακόμα, έχουν χρησιμοποιηθεί η προλίνη (Pro) (853 και 920 cm^{-1}) ή ο συνδιασμός προλινών και υδροξυπρολινών ($853+876\text{ cm}^{-1}$) [23]. Βέβαια, πολλές ερευνητικές ομάδες αντιτίθενται στη χρήση μερικών εκ των κορυφών καθώς δεν είναι ειδικές για τη μελέτη του κολλαγόνου (collagen – specific). Η επιλογή της μπάντας της μήτρας εξαρτάται από τις συνθήκες ενσωμάτωσης, την οργανολογία και την ευαισθησία ή την έλλειψη αυτής στο προσανατολισμό των κολλαγονούχων ινών.

Σε μελέτη αρθρικών χόνδρων σχετικά με την επίδραση του προσανατολισμού του δείγματος στους λόγους των παραμέτρων ποιότητας των οστών καταγράφηκε μια μικρή επίδραση στους λόγους όπου χρησιμοποιήθηκαν εντάσεις των Αμιδίου I, φαινυλαλανίνης και προλινών – υδροξυπρολινών. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η κορυφή του Αμιδίου I φαίνεται να είναι η περισσότερο ευαίσθητη στον προσανατολισμό του δείγματος και παρουσιάζει μια περιοδική τάση στην αλλαγή της έντασης της [24,25,26]. Η παρατηρούμενη διακύμανση της έντασης του Αμιδίου I υποδεικνύει ότι το κολλαγόνο έχει προτίμηση στο μοριακό προσανατολισμό σε μικρό βαθμό. Όμως όλες οι διαφοροποιήσεις που καταγράφηκαν στους λόγους,

εντοπίζονται εντός του εύρους των τυπικών αποκλίσεων και η συνεισφορά του προσανατολισμού στα αποτελέσματα θεωρείται αμελητέα [27].

Για το λόγο αυτό στη παρούσα εργασία επιλέγεται η κορυφή του Αμιδίου I για την εκτίμηση του κολλαγόνου του οστού, καθώς θεωρείται ότι ο προσανατολισμός του κολλαγόνου δεν επηρεάζει σημαντικά τους λόγους που υπολογίζονται και οι αλλαγές οι οποίες προκύπτουν σχετίζονται κυρίως με τις πραγματικές επιδράσεις των τρόπων συντήρησης στα δείγματα. Ακόμα, οι κορυφές του Αμιδίου I που προκύπτουν παρουσιάζουν υψηλές εντάσεις και ομοιόμορφη κατανομή, όπου επιτρέπουν τον αξιόπιστο προσδιορισμό της τιμής της έντασης τους σε αντίθεση με τις υπόλοιπες κορυφές που προτείνονται οι οποίες εντοπίζονται με χαμηλότερη ένταση.

Όσον αφορά τον λόγο CPR, αποτελεί δείκτη της υποκατάστασης των φωσφορικών ιόντων στο πλέγμα του απατίτη, ενώ ο λόγος Carbonate/Amide I σχετίζεται με την οστική ανακατασκευή (remodeling) [14].

Για κάθε οστικό δείγμα πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός των περιοχών ενδιαφέροντος, καθώς και ο διαχωρισμός και η καταγραφή των εντάσεων των κορυφών. Σημειώνεται ότι για τον υπολογισμό των εντάσεων χρησιμοποιήθηκαν τα ύψη των κορυφών. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για όλα τα δείγματα της κάθε ομάδας ξεχωριστά και στη συνέχεια για το κάθε δείγμα υπολογίστηκαν οι αντίστοιχοι φασματοσκοπικοί λόγοι. Με βάση τα δεδομένα που προέκυψαν από τα φάσματα Raman δημιουργήθηκαν οι πίνακες που ακολουθούν με τους αντίστοιχους λόγους και διαγράμματα, ώστε να καταλήξουμε σε συμπεράσματα σχετικά με τις επιδράσεις των μεθόδων συντήρησης στη χημική σύσταση των οστών. Οι λόγοι που χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία των διαγραμμάτων προκύπτουν από το μέσο όρο των διαφορετικών δειγμάτων που ανήκουν στην ίδια ομάδα.

6.3.1.1. Υπολογισμός αναλογίας ανόργανων προς οργανικών συστατικών (MMR)

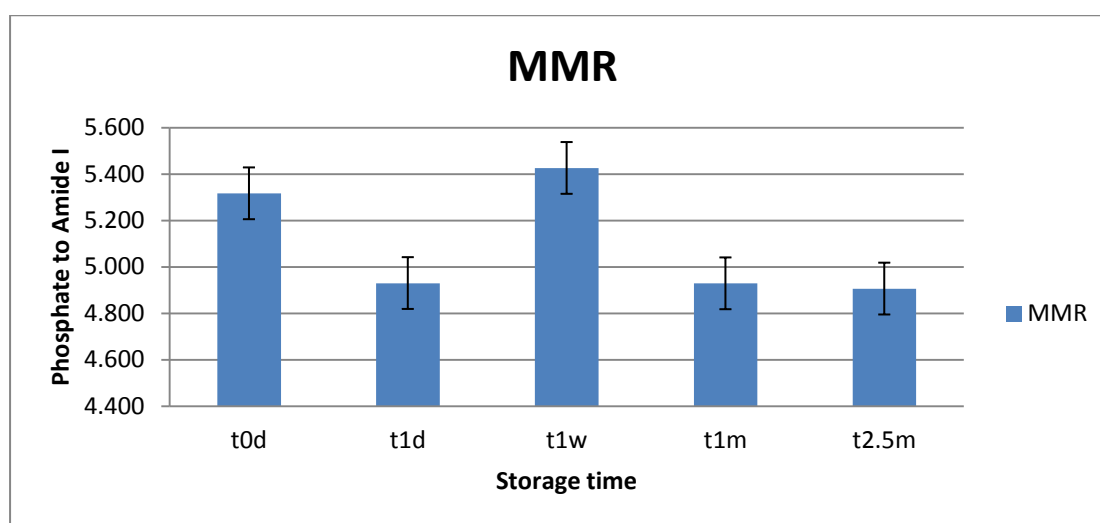
Αποθήκευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος

Για τα οστικά δείγματα τα οποία αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, χωρίς τη χρήση κάποιου διαλύτη, υπολογίστηκε ο λόγος των ανόργανων προς τα οργανικά συστατικά (MMR) για τα διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Τα αποτελέσματα καταγράφονται στον Πίνακα 3. Στον Πίνακα καταγράφεται και η τυπική απόκλιση των τιμών. Τα δείγματα αυτά θεωρούνται ως δείγματα ελέγχου και στη πορεία γίνεται σύγκριση των αντίστοιχων τιμών με αυτές που προκύπτουν από τις υπόλοιπες ομάδες.

Πίνακας 3: Τιμές MMR για τα οστικά δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Χρονική στιγμή	MMR	Τυπική Απόκλιση
t0d	5.317	0.192
t1d	4.930	1.362
t1w	5.426	0.391
t1m	4.929	0.446
t2.5m	4.906	0.267

Παρακάτω, παρουσιάζεται το αντίστοιχο διάγραμμα των τιμών του Πίνακα 3.



Γράφημα 1: Λόγος ανόργανων προς οργανικά συστατικά (MMR) για τα οστικά δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (controls).

Για τον έλεγχο των τιμών που προκύπτουν πραγματοποιήθηκε μη παραμετρικός έλεγχος (Mann – Whitney U test), από τον οποίο προέκυψε ότι οι τιμές που αντιστοιχούν στις μετρήσεις των διαφορετικών χρονικών διαστημάτων δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους ($p > 0.05$).

Κατά το μη παραμετρικό test (non – parametric test) ελέγχεται η ισότητα δύο μέσων μεταξύ ανεξάρτητων δειγμάτων, τα οποία όμως δεν ακολουθούν κανονική κατανομή. Οι μη παραμετρικοί έλεγχοι δεν χρησιμοποιούν τις πραγματικές τιμές των παρατηρήσεων αλλά τη τάξη (θέση) κάθε παρατήρησης στο σύνολο όλων των δεδομένων. Εφαρμόζονται σε ποσοτικά χαρακτηριστικά όταν το πλήθος των παρατηρήσεων είναι μικρό και η κατανομή είναι άγνωστη ή μη κανονική. Το κριτήριο Mann-Whitney είναι ένας βαθμολογικός έλεγχος που εξετάζει την υπόθεση ότι το άθροισμα των βαθμών των θέσεων των παρατηρήσεων του ενός δείγματος είναι ίσο με το άθροισμα των βαθμών των θέσεων των παρατηρήσεων του άλλου δείγματος.

$$H_0: W_A = W_B$$

$$H_1: W_A \neq W_B$$

Όπου κατά τη μηδενική υπόθεση (H_0) θεωρούμε ότι δεν υπάρχει καμία διαφορά μεταξύ των ομάδων. Ακόμα, τίθεται μία εναλλακτική υπόθεση H_1 , σύμφωνα με την οποία υπάρχει διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων.

Εάν η υπόθεση ότι τα αθροίσματα είναι ίσα δεν απορριφθεί, τότε συνεπάγεται ότι η κατανομή των παρατηρήσεων της μιας ομάδας είναι σχεδόν ίδια με την κατανομή της άλλης και ότι οι παρατηρήσεις εμφανίζονται με τυχαίο τρόπο τόσο στη μια όσο και στην άλλη ομάδα. Συνεπώς, η διαφοροποίηση λόγω της κατηγορικής μεταβλητής δεν σχετίζεται με τη συνεχή μεταβλητή. Η συνάρτηση ελέγχου βασίζεται στη σχέση:

$$U = \min (U_A, U_B)$$

Όπου:

$$U_A = n_A n_B + \frac{n_A(n_A + 1)}{2} - W_A$$

$$U_B = n_A n_B + \frac{n_B(n_B + 1)}{2} - W_B$$

Κατά την εκτέλεση του ελέγχου, επιλέγοντας το επιθυμητό επίπεδο σημαντικότητας (α), υπολογίζεται η p -τιμή (από τους αντίστοιχους Mann-Whitney πίνακες) που αντιστοιχεί στη U στατιστική. Σύμφωνα με την τιμή που προκύπτει απορρίπτεται η μηδενική υπόθεση υπέρ της εναλλακτικής εάν $p < \alpha$. Έτσι, εάν $p < \alpha$ τότε καταγράφεται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ανεξάρτητων τιμών των δειγμάτων.

Κατά τον έλεγχο ελέγχθηκε κατά πόσο οι διαφορές που καταγράφονται στις τιμές των δειγμάτων που θεωρούνται δείγματα αναφοράς με τις τιμές που προκύπτουν ύστερα από τη διαδικασία της αποθήκευσης κρίνονται ως σημαντικές, με επίπεδο σημαντικότητας $p=0,05$. Σημειώνεται ότι οι τιμές που αντιστοιχούν στις χρονικές στιγμές μετά την t_0 , χρησιμοποιούνται ακόλουθα για τη σύγκριση με τις τιμές των υπόλοιπων ομάδων μελέτης, για τα αντίστοιχα διαστήματα.

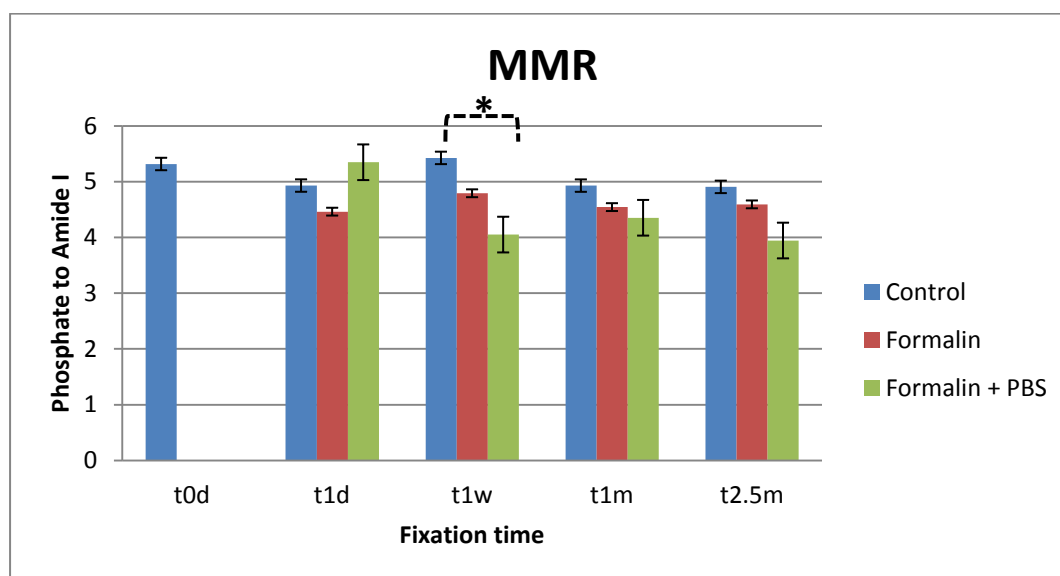
Σταθεροποίηση σε διάλυμα φορμαλίνης

Για τα δείγματα τα οποία σταθεροποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλίνης για τα διαφορετικά χρονικά διαστήματα προκύπτουν οι λόγοι MMR που παρουσιάζονται στο Πίνακα 4. Στον Πίνακα καταγράφονται και οι λόγοι MMR για τα αντίστοιχα δείγματα μετά τη χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος PBS.

Πίνακας 4: Τιμές MMR για τα οστικά δείγματα που σταθεροποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλίνης και οι αντίστοιχες τιμές μετά τη χρήση PBS.

Χρονική στιγμή	MMR (Formalin Fixation)	Τυπική Απόκλιση	MMR (Formalin + PBS)	Τυπική Απόκλιση
t0d	---	---	---	---
t1d	4.462	0.456	5.348	0.366
t1w	4.792	0.258	4.051	0.526
t1m	4.543	0.619	4.352	0.438
t2.5m	4.592	0.440	3.944	0.877

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα προκύπτει το Γράφημα 2. Στο γράφημα παρουσιάζονται και οι αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων ελέγχου.



Γράφημα 2: Λόγος ανόργανων προς οργανικά συστατικά (MMR) για τα οστικά δείγματα που σταθεροποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλίνης και οι αντίστοιχες τιμές μετά τη χρήση PBS.

Στα διαγράμματα παρατηρούμε μείωση των τιμών του λόγου MMR μετά τη πάροδο μιας εβδομάδας για τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στη φορμαλίνη σε σχέση με τις τιμές αναφοράς. Όμοια και για τις τιμές των δειγμάτων μετά τη βύθιση τους στο PBS. Όμως από το μη παραμετρικό έλεγχο που πραγματοποιήθηκε προέκυψε ότι οι τιμές MMR των δειγμάτων που έχουν σταθεροποιηθεί σε διάλυμα φορμαλίνης δεν διαφέρουν σημαντικά από τις τιμές των δειγμάτων που αποθηκεύονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ($p > 0.05$). Ωστόσο, σημειώνεται σημαντική διαφορά για τιμές των δειγμάτων, τα οποία κατόπιν την σταθεροποίησή τους στο διάλυμα της φορμαλίνης είχαν βυθιστεί σε PBS, που αντιστοιχούν στη μέτρηση t1w ($p < 0.05$). Η στατιστική διαφορά η οποία προκύπτει για $p < 0.05$, σημειώνεται στα διαγράμματα με τη χρήση αστερίσκου (*).

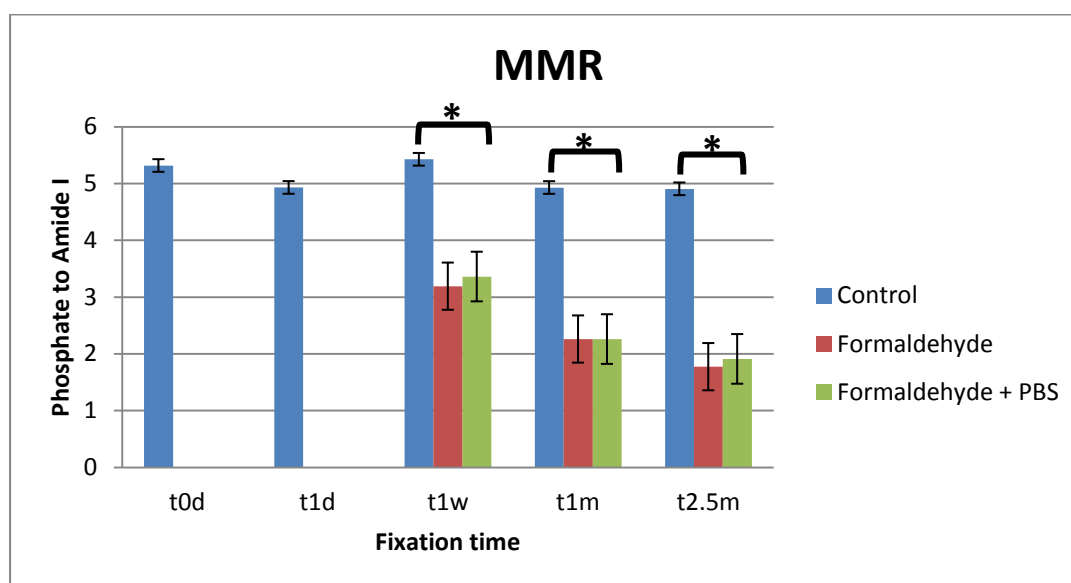
Σταθεροποίηση σε διάλυμα φορμαλδεΐδης

Για τα δείγματα τα οποία σταθεροποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλδεΐδης για τα διαφορετικά χρονικά διαστήματα προκύπτουν οι λόγοι MMR που παρουσιάζονται στο Πίνακα 5. Στον Πίνακα καταγράφονται και οι λόγοι MMR για τα αντίστοιχα δείγματα μετά τη χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος PBS.

Πίνακας 5: Τιμές MMR για τα οστικά δείγματα που σταθεροποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλδεΐδης και οι αντίστοιχες τιμές μετά τη χρήση PBS.

Χρονική στιγμή	MMR (Formaldehyde Fixation)	Τυπική Απόκλιση	MMR (Formaldehyde + PBS)	Τυπική Απόκλιση
t0d	---	---	---	---
t1d	---	---	---	---
t1w	3.190	0.878	3.360	0.204
t1m	2.259	0.581	2.259	0.321
t2.5m	1.772	0.420	1.909	0.210

Το αντίστοιχο διάγραμμα είναι το έξης :



Γράφημα 3: Λόγος ανόργανων προς οργανικά συστατικά (MMR) για τα οστικά δείγματα που σταθεροποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλδεΐδης και οι αντίστοιχες τιμές μετά τη χρήση PBS.

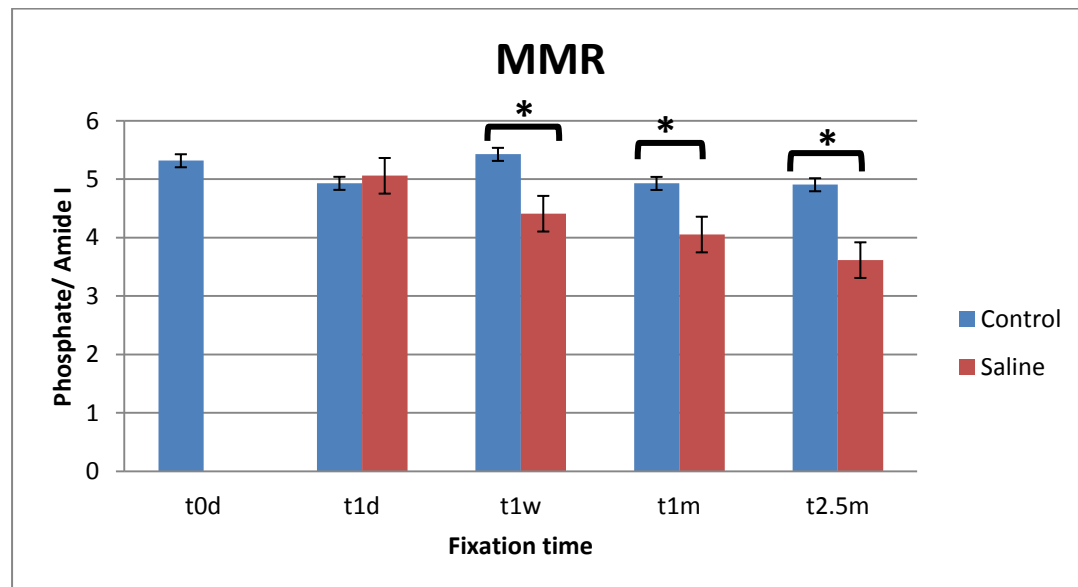
Από το μη παραμετρικό τεστ που πραγματοποιήθηκε προέκυψε ότι οι τιμές MMR των δειγμάτων που έχουν σταθεροποιηθεί σε διάλυμα φορμαλδεΐδης παρουσιάζουν σημαντική διαφορά σε σχέση με τις τιμές των δειγμάτων που αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου για τα χρονικά διαστήματα t1w, t1m και t2.5m ($p < 0.05$). Όμοια διαφορά καταγράφεται και μετά τη χρήση του PBS. Συγκεκριμένα μετά τη χρήση της φορμαλδεΐδης οι τιμές του λόγου MMR μειώνονται σε σχέση με τις τιμές ελέγχου.

Αποθήκευση σε Φυσιολογικό Ορό

Για τα δείγματα τα οποία αποθηκεύτηκαν σε φυσιολογικό ορό για τα διαφορετικά χρονικά διαστήματα προκύπτουν οι λόγοι MMR που παρουσιάζονται στο Πίνακα 6. Με βάση τα δεδομένα του Πίνακα δημιουργήθηκε και το Γράφημα 4.

Πίνακας 6: Τιμές MMR για τα οστικά δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε φυσιολογικό ορό.

Χρονική στιγμή	MMR	Τυπική Απόκλιση
t0d	---	---
t1d	5.059	0.737
t1w	4.410	0.259
t1m	4.054	0.269
t2.5m	3.616	0.091



Γράφημα 4: Λόγος ανόργανων προς οργανικά συστατικά (MMR) για τα οστικά δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε φυσιολογικό ορό.

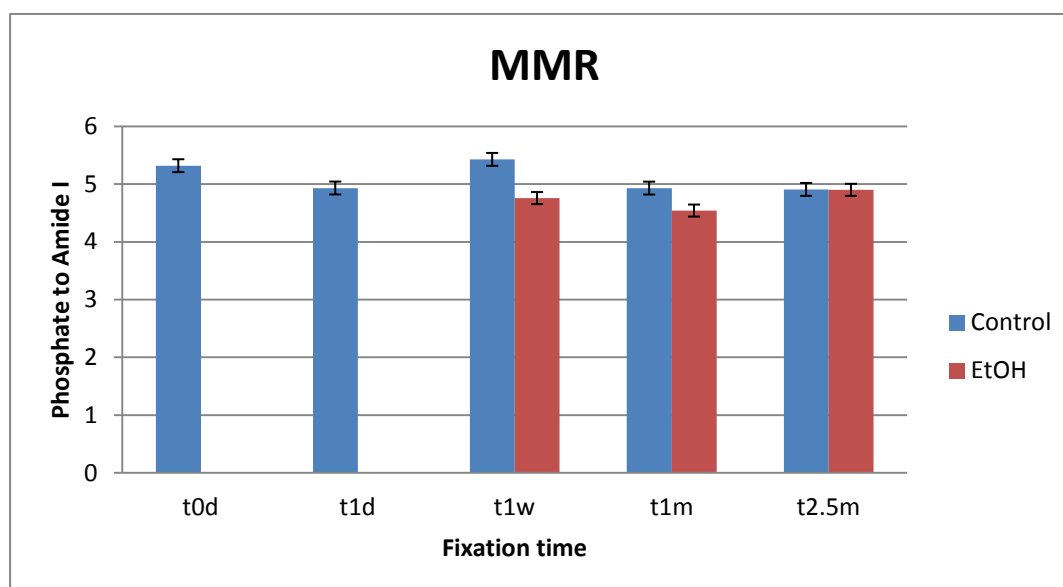
Από το μη παραμετρικό τεστ που πραγματοποιήθηκε προέκυψε ότι οι τιμές MMR των δειγμάτων που έχουν αποθηκευτεί σε φυσιολογικό ορό παρουσιάζουν σημαντική διαφορά (καταγράφεται μείωση των τιμών) σε σχέση με τις τιμές των δειγμάτων που αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου για τα χρονικά διαστήματα t1w, t1m και t2.5m ($p < 0.05$).

Σταθεροποίηση σε διάλυμα αιθανόλης

Για τα δείγματα τα οποία αποθηκεύτηκαν σε διάλυμα αιθανόλης για τα διαφορετικά χρονικά διαστήματα προκύπτουν οι λόγοι MMR που παρουσιάζονται στο Πίνακα 7. Με βάση τα δεδομένα του Πίνακα δημιουργήθηκε και το Γράφημα 5.

Πίνακας 7: Τιμές MMR για τα οστικά δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε διάλυμα αιθανόλης.

Χρονική στιγμή	MMR	Τυπική Απόκλιση
t0d	---	---
t1d	---	---
t1w	4.755	0.139
t1m	4.539	0.243
t2.5m	4.898	0.280



Γράφημα 5: Λόγος ανόργανων προς οργανικά συστατικά (MMR) για τα οστικά δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε διάλυμα αιθανόλης.

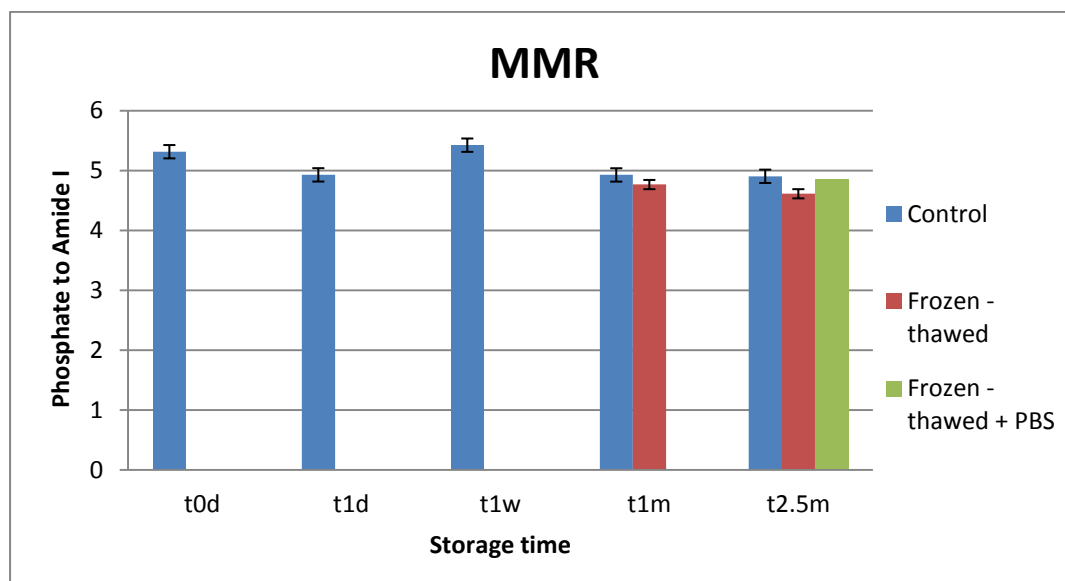
Από το μη παραμετρικό τεστ που πραγματοποιήθηκε προέκυψε ότι οι τιμές MMR των δειγμάτων που έχουν αποθηκευτεί σε διάλυμα αιθανόλης δεν διαφέρουν σημαντικά από τις τιμές των δειγμάτων που αποθηκεύονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ($p > 0.05$).

Αποθήκευση σε συνθήκες κατάψυξης

Για τα δείγματα τα οποία αποθηκεύτηκαν συνθήκες ψύξης και αποψύχθηκαν μόνο δύο φορές προκύπτουν οι λόγοι MMR που παρουσιάζονται στο Πίνακα 8. Στον Πίνακα καταγράφεται και ο λόγος MMR για τα αντίστοιχα δείγματα μετά τη χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος PBS. Με βάση τα δεδομένα του Πίνακα δημιουργήθηκε και το Γράφημα 6.

Πίνακας 8: Τιμές MMR για τα οστικά δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε συνθήκες κατάψυξης.

Χρονική στιγμή	MMR (Frozen - thawed)	Τυπική Απόκλιση	MMR (Frozen - thawed + PBS)	Τυπική Απόκλιση
t0d	---	---	---	---
t1d	---	---	---	---
t1w	---	---	---	---
t1m	4.768	0.395	---	---
t2.5m	4.614	0.502	4.843	0.576



Γράφημα 6: Λόγος ανόργανων προς οργανικά συστατικά (MMR) για τα οστικά δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε συνθήκες κατάψυξης και η αντίστοιχη τιμή μετά τη χρήση PBS.

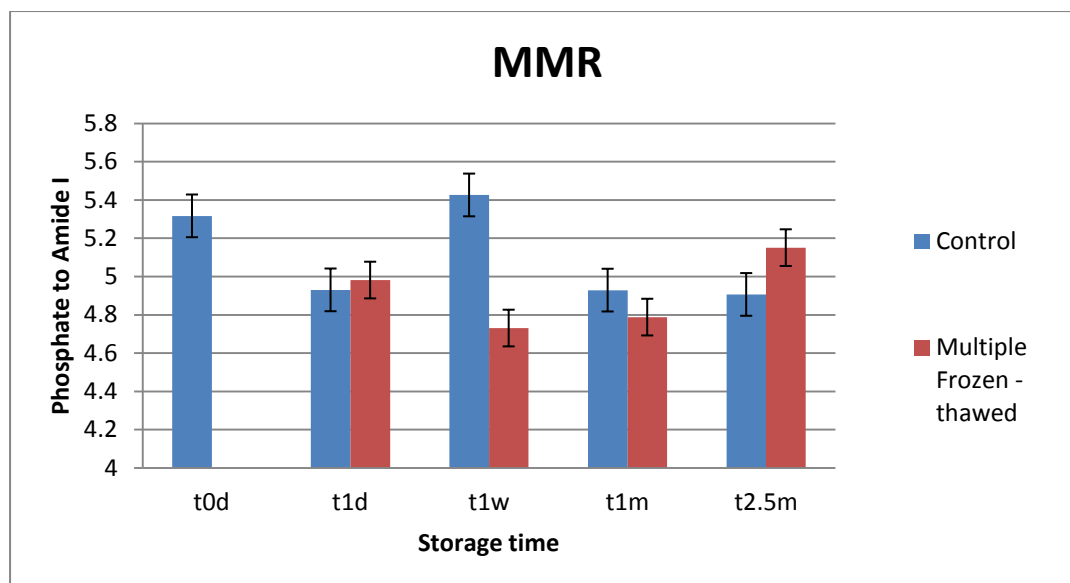
Από το μη παραμετρικό έλεγχο που πραγματοποιήθηκε προέκυψε ότι οι τιμές MMR των δειγμάτων που έχουν αποθηκευτεί σε συνθήκες κατάψυξης δεν διαφέρουν σημαντικά από τις τιμές των δειγμάτων που αποθηκεύονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ($p > 0.05$). Διαφορά δεν καταγράφεται ούτε στη περίπτωση όπου έγινε χρήση του PBS, αλλά ούτε στις μεταξύ τους τιμές [(Frozen – thawed) – (Frozen – thawed + PBS)] .

Αποθήκευση σε συνθήκες κατάψυξης και πολλαπλούς κύκλους απόψυξης

Για τα δείγματα τα οποία έχουν υποστεί πολλαπλούς κύκλους ψύξης – απόψυξης προκύπτουν οι λόγοι MMR που παρουσιάζονται στο Πίνακα 9. Με βάση τα δεδομένα του Πίνακα δημιουργήθηκε και το Γράφημα 7.

Πίνακας 9: Τιμές MMR για τα οστικά δείγματα που έχουν υποστεί πολλαπλούς κύκλους ψύξης – απόψυξης.

Χρονική στιγμή	MMR	Τυπική Απόκλιση
t0d	---	---
t1d	4.981	0.212
t1w	4.731	0.290
t1m	4.788	0.253
t2.5m	5.151	0.230



Γράφημα 7: Λόγος ανόργανων προς οργανικά συστατικά (MMR) για τα οστικά δείγματα που έχουν υποστεί πολλαπλούς κύκλους ψύξης – απόψυξης.

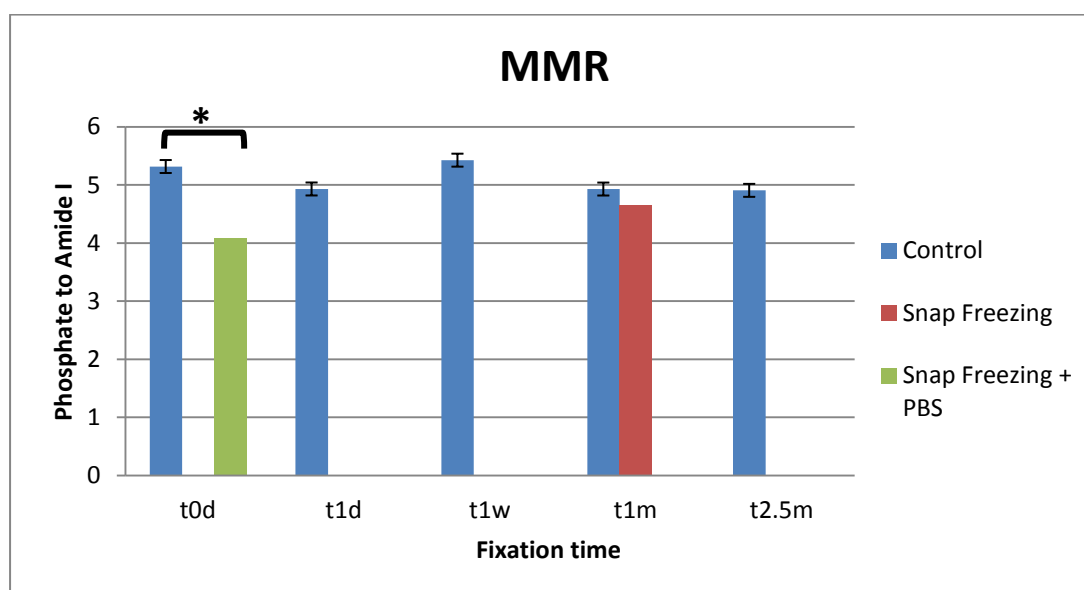
Από το παραμετρικό τεστ που πραγματοποιήθηκε προέκυψε ότι οι τιμές MMR των δειγμάτων που έχουν υποστεί πολλαπλούς κύκλους ψύξης - απόψυξης δεν διαφέρουν σημαντικά από τις τιμές των δειγμάτων που αποθηκεύονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ($p > 0.05$).

Στιγμαία ψύξη και συμπληρωματική κατάψυξη ή χρήση PBS

Για τα δείγματα τα οποία έχουν υποστεί στιγμαία κατάψυξη και συμπληρωματική κατάψυξη προκύπτουν οι λόγοι MMR που παρουσιάζονται στο Πίνακα 10. Με βάση τα δεδομένα του Πίνακα δημιουργήθηκε και το Γράφημα 8.

Πίνακας 10: Τιμές MMR για τα οστικά δείγματα που έχουν υποστεί στιγμαία ψύξη και συμπληρωματική κατάψυξη ή έχουν βυθιστεί σε PBS.

Χρονική στιγμή	MMR (Snap Freezing + PBS)	Τυπική Απόκλιση	MMR (Snap Freezing)	Τυπική Απόκλιση
t0d	4.091	0.632	---	
t1d	---	---	---	---
t1w	---	---	---	---
t1m	---	---	4.654	0.586
t2.5m	---	---	---	---



Γράφημα 8 : Λόγος ανόργανων προς οργανικά συστατικά (MMR) για τα οστικά δείγματα που έχουν υποστεί στιγμαία ψύξη και συμπληρωματική κατάψυξη ή έχουν βυθιστεί σε PBS.

Από το μη παραμετρικό τεστ που πραγματοποιήθηκε προέκυψε ότι οι τιμές MMR των δειγμάτων που έχουν υποστεί στιγμαία ψύξη και συμπληρωματική κατάψυξη δεν διαφέρουν σημαντικά από τις τιμές των δειγμάτων που αποθηκεύονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ($p > 0.05$). Όμως, για τα δείγματα τα οποία αμέσως μετά τη στιγμαία ψύξη βυθίστηκαν σε PBS (Snap Freezing + PBS) καταγράφεται σημαντική διαφορά και μείωση στις αντίστοιχες τιμές ($p < 0.05$).

6.3.1.2. Υπολογισμός αναλογίας ανθρακικών υποκαταστατών προς φωσφορικών ιόντων (CPR)

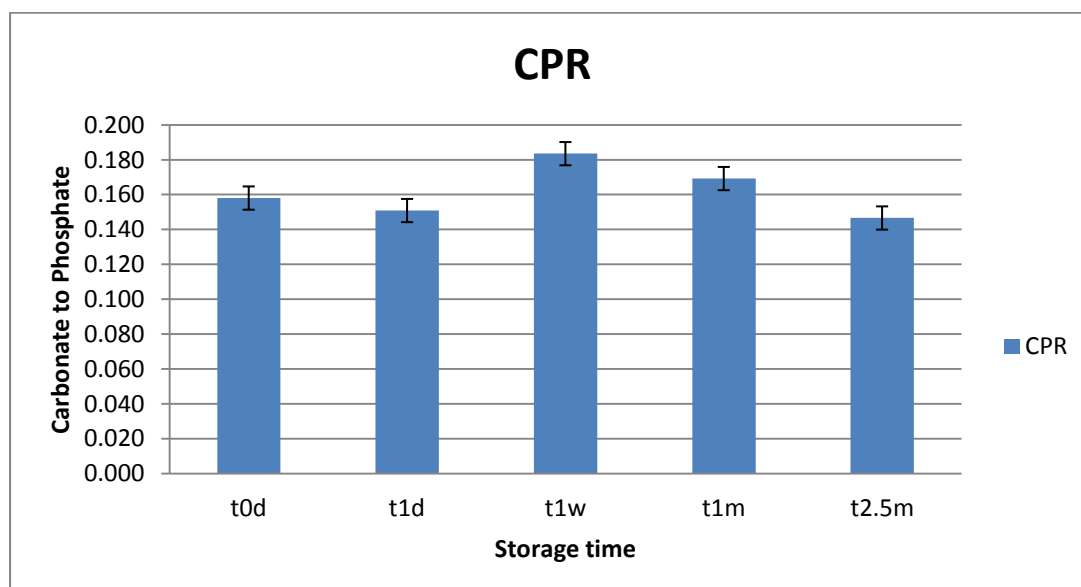
Αποθήκευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος

Για τα οστικά δείγματα τα οποία αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, χωρίς τη χρήση κάποιου διαλύτη, υπολογίστηκε ο λόγος των ανθρακικών υποκαταστατών προς τα φωσφορικά ιόντα (CPR) για τα διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Τα αποτελέσματα καταγράφονται στον Πίνακα 11. Στον Πίνακα καταγράφεται και η τυπική απόκλιση των τιμών. Τα δείγματα αυτά θεωρούνται ως δείγματα ελέγχου και στη πορεία γίνεται σύγκριση των αντίστοιχων τιμών με αυτές που προκύπτουν από τις υπόλοιπες ομάδες.

Πίνακας 11: Τιμές CPR για τα οστικά δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Χρονική στιγμή	CPR	Τυπική Απόκλιση
t0d	0.158	0.048
t1d	0.151	0.033
t1w	0.184	0.038
t1m	0.169	0.007
t2.5m	0.147	0.032

Με βάση τα δεδομένα του παραπάνω Πίνακα, προκύπτει το Γράφημα 9.



Γράφημα 9 : Λόγος ανθρακικών υποκαταστατών προς φωσφορικών ιόντων (CPR) για τα οστικά δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (controls).

Από τον μη παραμετρικό έλεγχο που πραγματοποιήθηκε οι τιμές που αντιστοιχούν στις μετρήσεις των διαφορετικών χρονικών διαστημάτων δεν διαφέρουν σημαντικά

μεταξύ τους ($p>0.05$). Οι τιμές αυτές θα χρησιμοποιηθούν για τη σύγκριση με τις τιμές των άλλων ομάδων, καθώς θεωρούνται τιμές αναφοράς.

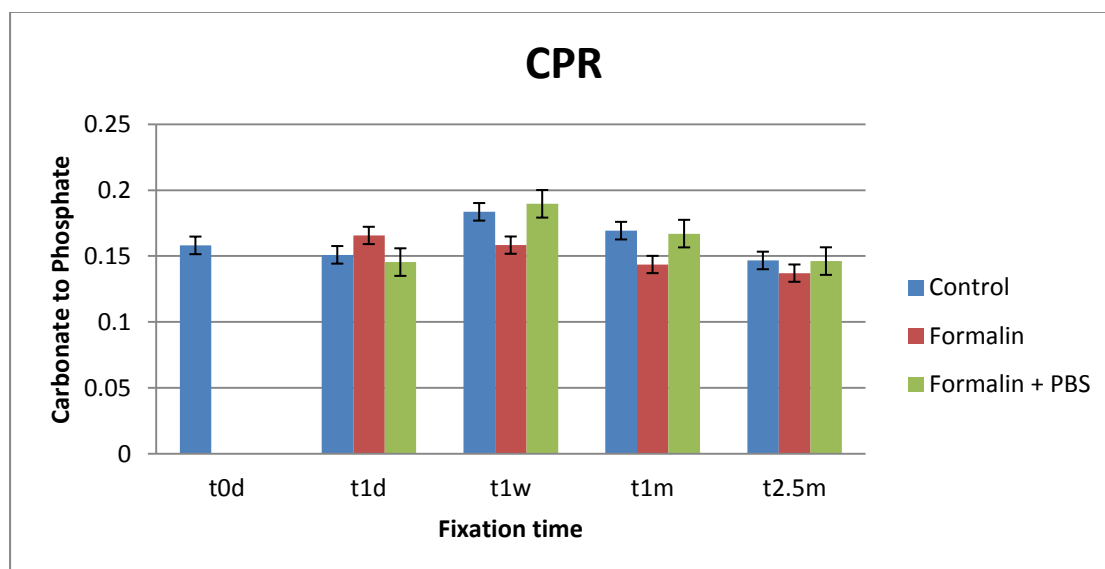
Σταθεροποίηση σε διάλυμα φορμαλίνης

Για τα δείγματα τα οποία σταθεροποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλίνης για τα διαφορετικά χρονικά διαστήματα προκύπτουν οι λόγοι CPR που παρουσιάζονται στο Πίνακα 12. Στον Πίνακα καταγράφονται και οι λόγοι CPR για τα αντίστοιχα δείγματα μετά τη χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος PBS.

Πίνακας 12: Τιμές CPR για τα οστικά δείγματα που σταθεροποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλίνης και οι αντίστοιχες τιμές μετά τη χρήση PBS.

Χρονική στιγμή	CPR (Formalin Fixation)	Τυπική Απόκλιση	CPR (Formalin + PBS)	Τυπική Απόκλιση
t0d	---	---	---	---
t1d	0.166	0.056	0.145	0.014
t1w	0.158	0.020	0.190	0.032
t1m	0.144	0.016	0.167	0.035
t2.5m	0.137	0.024	0.146	0.022

Το αντίστοιχο διάγραμμα είναι το εξής :



Γράφημα 10: Λόγος ανθρακικών υποκαταστατών προς φωσφορικών ιόντων (CPR) για τα οστικά δείγματα που σταθεροποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλίνης και οι αντίστοιχες τιμές μετά τη χρήση PBS.

Από το μη παραμετρικό τεστ που πραγματοποιήθηκε προέκυψε ότι οι τιμές CPR των δειγμάτων που έχουν σταθεροποιηθεί σε διάλυμα φορμαλίνης δεν διαφέρουν σημαντικά από τις τιμές των δειγμάτων που αποθηκεύονται σε θερμοκρασία

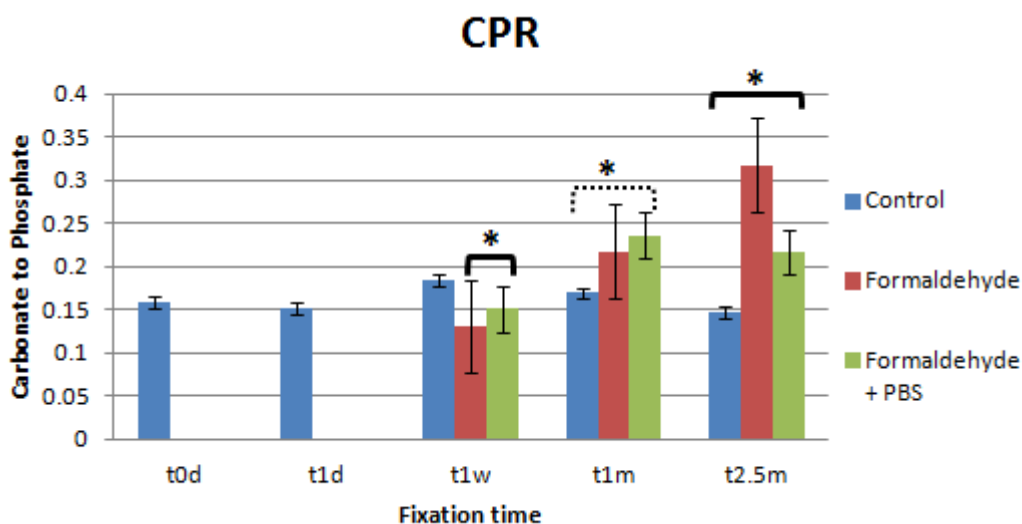
περιβάλλοντος ($p > 0.05$). Όμοια και για τις τιμές των δειγμάτων μετά τη εμβάπτιση τους στο PBS.

Σταθεροποίηση σε διάλυμα φορμαλδεΰδης

Για τα δείγματα τα οποία σταθεροποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλδεΰδης για τα διαφορετικά χρονικά διαστήματα προκύπτουν οι λόγοι CPR που παρουσιάζονται στο Πίνακα 13. Στον Πίνακα καταγράφονται και οι λόγοι CPR για τα αντίστοιχα δείγματα μετά τη χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος PBS.

Πίνακας 13: Τιμές CPR για τα οστικά δείγματα που σταθεροποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλδεΰδης και οι αντίστοιχες τιμές μετά τη χρήση PBS.

Χρονική στιγμή	CPR (Formaldehyde Fixation)	Τυπική Απόκλιση	CPR (Formaldehyde + PBS)	Τυπική Απόκλιση
t0d	---	---	---	---
t1d	---	---	---	---
t1w	0.131	0.023	0.151	0.017
t1m	0.218	0.066	0.236	0.014
t2.5m	0.318	0.075	0.217	0.015



Γράφημα 11: Λόγος ανθρακικών υποκαταστατών προς φωσφορικών ιόντων (CPR) για τα οστικά δείγματα που σταθεροποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλδεΰδης και οι αντίστοιχες τιμές μετά τη χρήση PBS.

Από το μη παραμετρικό τεστ που πραγματοποιήθηκε προέκυψε ότι οι τιμές CPR των δειγμάτων που έχουν σταθεροποιηθεί σε διάλυμα φορμαλδεΰδης παρουσιάζουν σημαντική διαφορά σε σχέση με τις τιμές των δειγμάτων που αποθηκεύονται σε

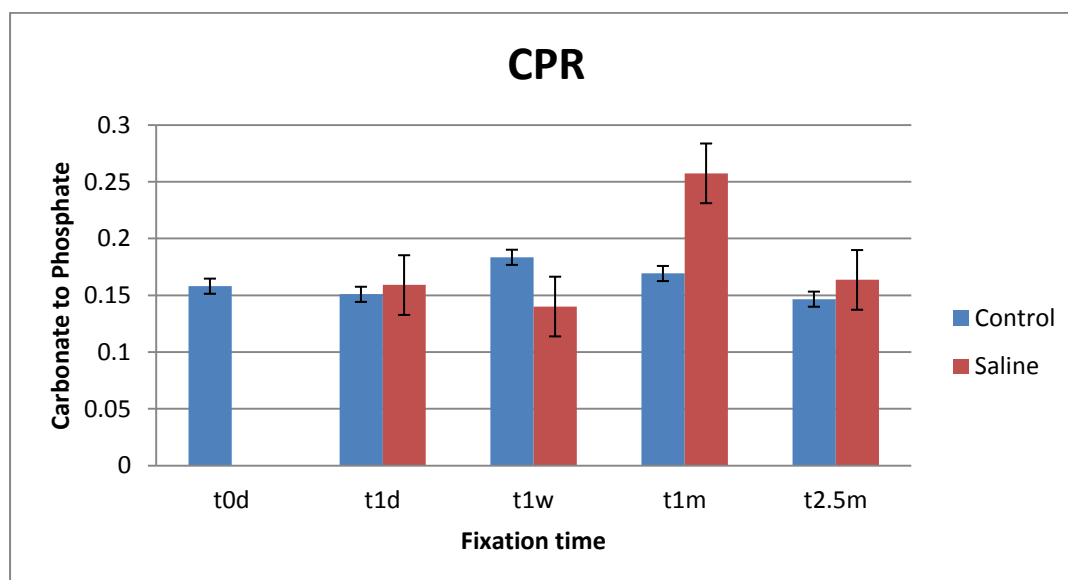
θερμοκρασία δωματίου για τη χρονική στιγμή t2.5m ($p < 0.05$). Συγκεκριμένα καταγράφεται αύξηση στις τιμές των αντίστοιχων λόγων, η οποία γίνεται πιο έντονη με την μεγαλύτερη παραμονή των δειγμάτων στο διάλυμα της φορμαλδεΐδης. Διαφορά καταγράφεται και μετά τη χρήση του PBS για τα χρονικά διαστήματα t1m και t2.5m. Σημειώνεται ότι διαφορά καταγράφηκε και μεταξύ των τιμών των δειγμάτων πριν και μετά τη βύθιση τους σε PBS για t1w.

Αποθήκευση σε Φυσιολογικό Ορό

Για τα δείγματα τα οποία αποθηκεύτηκαν σε φυσιολογικό ορό για τα διαφορετικά χρονικά διαστήματα προκύπτουν οι λόγοι CPR που παρουσιάζονται στο Πίνακα 14. Με βάση τα δεδομένα του Πίνακα δημιουργήθηκε και το Γράφημα 12.

Πίνακας 14: Τιμές CPR για τα οστικά δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε φυσιολογικό ορό.

Χρονική στιγμή	CPR	Τυπική Απόκλιση
t0d	---	---
t1d	0.159	0.022
t1w	0.140	0.021
t1m	0.257	0.205
t2.5m	0.164	0.022



Γράφημα 12: Λόγος ανθρακικών υποκαταστατών προς φωσφορικών ιόντων (CPR) για τα οστικά δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε φυσιολογικό ορό.

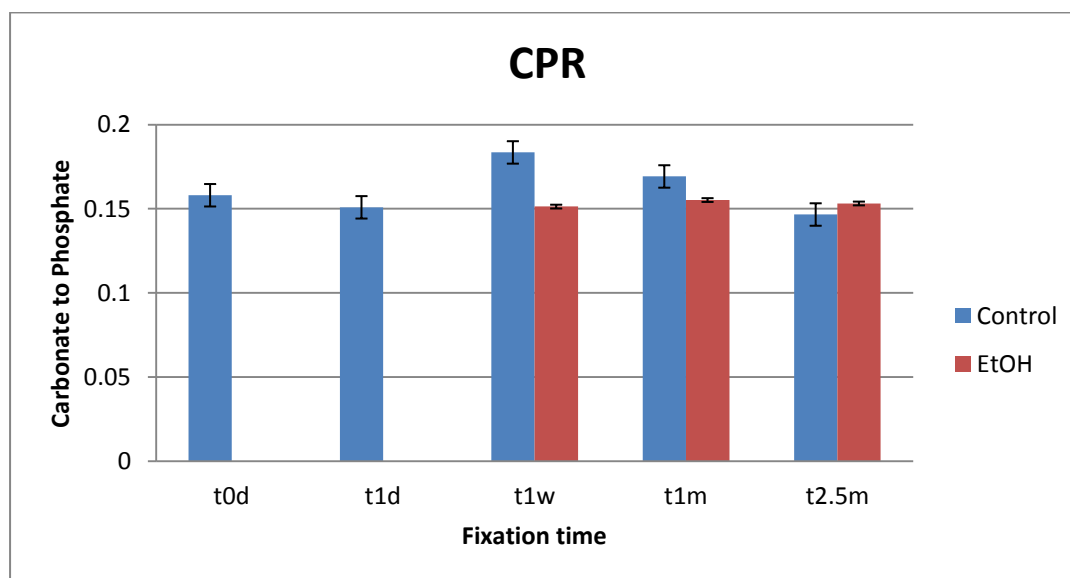
Από το μη παραμετρικό τεστ που πραγματοποιήθηκε προέκυψε ότι οι τιμές CPR των δειγμάτων που έχουν αποθηκευτεί σε φυσιολογικό ορό δεν παρουσιάζουν σημαντική διαφορά σε σχέση με τις τιμές των δειγμάτων που αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου ($p > 0.05$).

Σταθεροποίηση σε διάλυμα Αιθανόλης

Για τα δείγματα τα οποία αποθηκεύτηκαν σε διάλυμα αιθανόλης για τα διαφορετικά χρονικά διαστήματα προκύπτουν οι λόγοι CPR που παρουσιάζονται στο Πίνακα 15. Με βάση τα δεδομένα του Πίνακα δημιουργήθηκε και το Γράφημα 13.

Πίνακας 15: Τιμές CPR για τα οστικά δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε διάλυμα αιθανόλης.

Χρονική στιγμή	CPR	Τυπική Απόκλιση
t0d	---	---
t1d	---	---
t1w	0.151	0.037
t1m	0.155	0.015
t2.5m	0.153	0.050



Γράφημα 13: Λόγος ανθρακικών υποκαταστατών προς φωσφορικών ιόντων (CPR) για τα οστικά δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε διάλυμα αιθανόλης.

Από το μη παραμετρικό τεστ που πραγματοποιήθηκε προέκυψε ότι οι τιμές CPR των δειγμάτων που έχουν αποθηκευτεί σε διάλυμα αιθανόλης δεν διαφέρουν

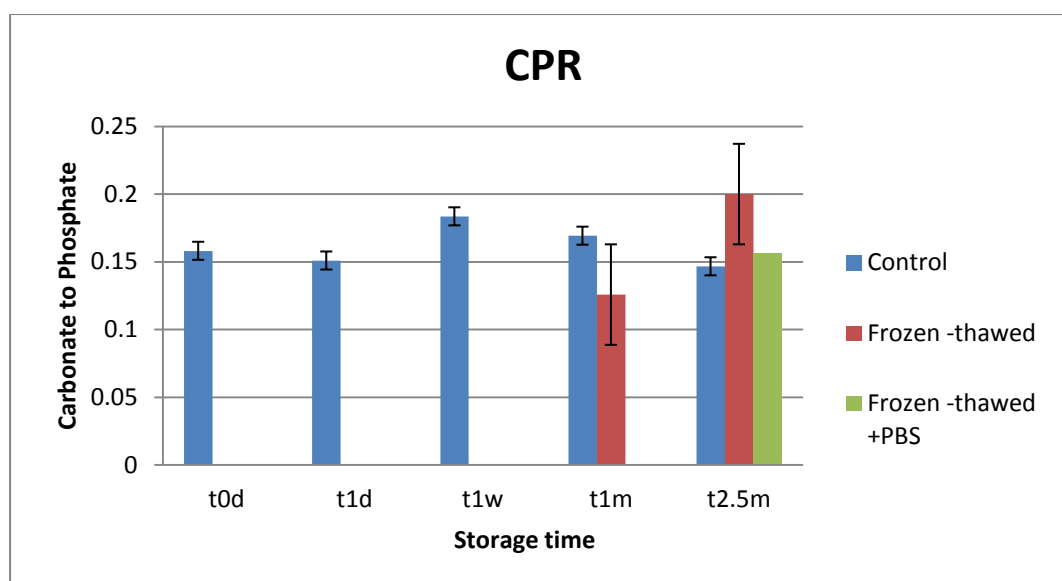
σημαντικά από τις τιμές των δειγμάτων που αποθηκεύονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ($p > 0.05$).

Αποθήκευση σε συνθήκες κατάψυξης

Για τα δείγματα τα οποία αποθηκεύτηκαν συνθήκες ψύξης και αποψύχθηκαν μόνο δύο φορές προκύπτουν οι λόγοι CPR που παρουσιάζονται στο Πίνακα 16. Στον Πίνακα καταγράφεται και ο λόγος CPR για τα αντίστοιχα δείγματα μετά τη χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος PBS. Με βάση τα δεδομένα του Πίνακα δημιουργήθηκε και το Γράφημα 14.

Πίνακας 16: Τιμές CPR για τα οστικά δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε συνθήκες κατάψυξης.

Χρονική στιγμή	CPR (Frozen - thawed)	Τυπική Απόκλιση	CPR (Frozen - thawed + PBS)	Τυπική Απόκλιση
t0d	---	---	---	---
t1d	---	---	---	---
t1w	---	---	---	---
t1m	0.126	0.052	---	---
t2.5m	0.200	0.056	0.156	0.049



Γράφημα 14: Λόγος ανθρακικών υποκαταστατών προς φωσφορικών ιόντων (CPR) για τα οστικά δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε συνθήκες κατάψυξης και η αντίστοιχη τιμή μετά τη χρήση PBS.

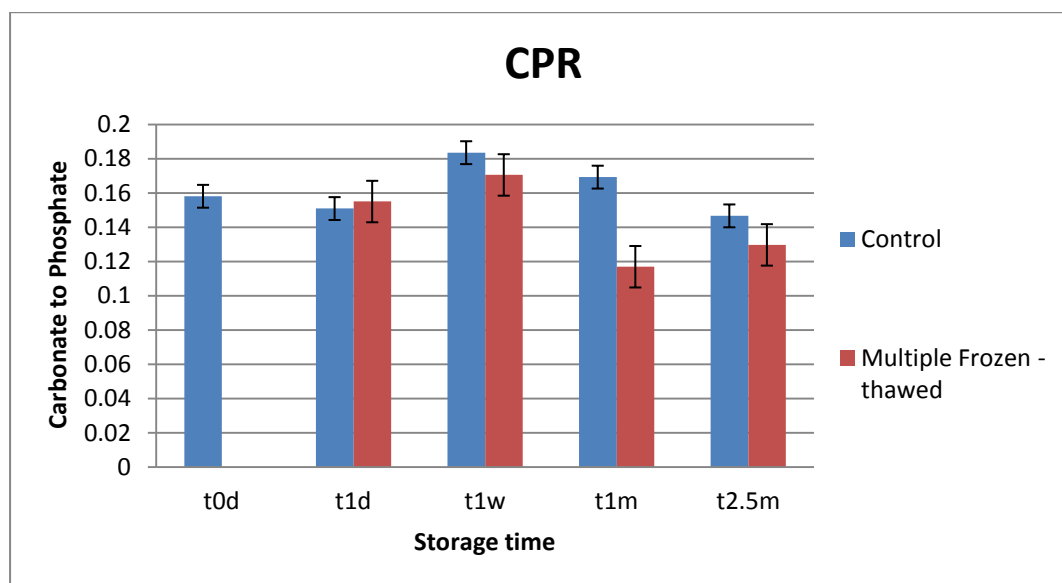
Από το μη παραμετρικό τεστ που πραγματοποιήθηκε προέκυψε ότι οι τιμές CPR των δειγμάτων που έχουν αποθηκευτεί σε συνθήκες κατάψυξης δεν διαφέρουν σημαντικά από τις τιμές των δειγμάτων που αποθηκεύονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ($p > 0.05$). Διαφορά δεν καταγράφεται ούτε στη περίπτωση όπου έγινε χρήση του PBS, αλλά ούτε στις μεταξύ τους τιμές [(Frozen – thawed) – (Frozen – thawed + PBS)] .

Αποθήκευση σε συνθήκες κατάψυξης και πολλαπλούς κύκλους απόψυξης

Για τα δείγματα τα οποία έχουν υποστεί πολλαπλούς κύκλους ψύξης – απόψυξης προκύπτουν οι λόγοι CPR που παρουσιάζονται στο Πίνακα 17. Με βάση τα δεδομένα του Πίνακα δημιουργήθηκε και το Γράφημα 15.

Πίνακας 17: Τιμές CPR για τα οστικά δείγματα που έχουν υποστεί πολλαπλούς κύκλους ψύξης – απόψυξης.

Χρονική στιγμή	CPR	Τυπική Απόκλιση
t0d	---	---
t1d	0.155	0.016
t1w	0.171	0.025
t1m	0.117	0.046
t2.5m	0.130	0.060



Γράφημα 15: Λόγος ανθρακικών υποκαταστατών προς φωσφορικών ιόντων (CPR) για τα οστικά δείγματα που έχουν υποστεί πολλαπλούς κύκλους ψύξης – απόψυξης.

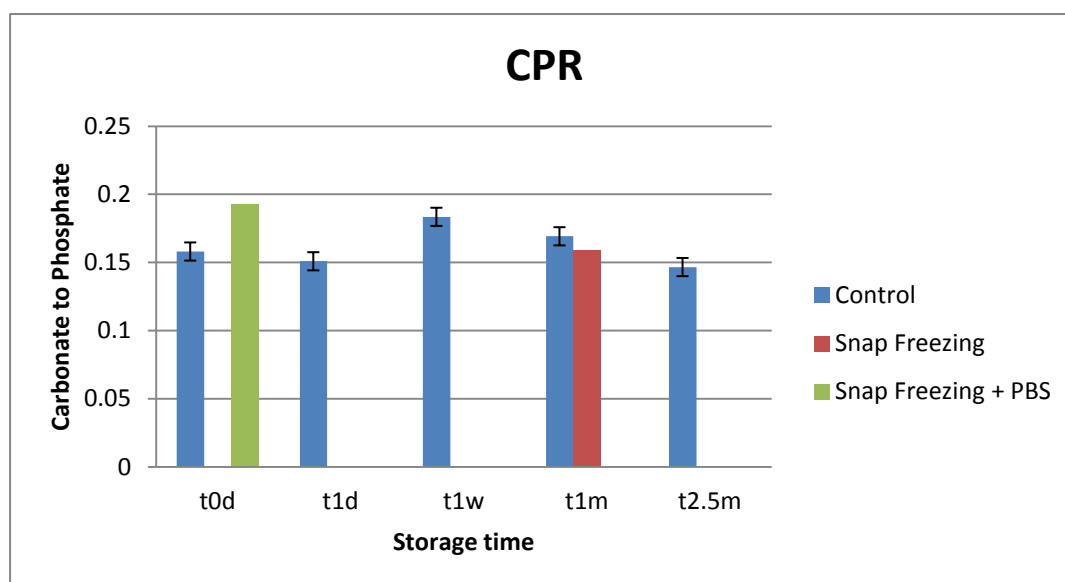
Από το μη παραμετρικό τεστ που πραγματοποιήθηκε προέκυψε ότι οι τιμές CPR των δειγμάτων που έχουν υποστεί πολλαπλούς κύκλους ψύξης - απόψυξης δεν διαφέρουν σημαντικά από τις τιμές των δειγμάτων που αποθηκεύονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ($p > 0.05$).

Στιγμαία ψύξη και συμπληρωματική κατάψυξη ή χρήση PBS

Για τα δείγματα τα οποία έχουν υποστεί στιγμαία κατάψυξη και συμπληρωματική κατάψυξη προκύπτουν οι λόγοι CPR που παρουσιάζονται στο Πίνακα 18. Με βάση τα δεδομένα του Πίνακα δημιουργήθηκε και το Γράφημα 16.

Πίνακας 18: Τιμές CPR για τα οστικά δείγματα που έχουν υποστεί στιγμαία ψύξη και συμπληρωματική κατάψυξη ή έχουν βυθιστεί σε PBS.

Χρονική στιγμή	CPR (Snap Freezing + PBS)	Τυπική Απόκλιση	CPR (Snap Freezing)	Τυπική Απόκλιση
t0d	0.192	0.025	---	---
t1d	---	---	---	---
t1w	---	---	---	---
t1m	---	---	0.158	0.040
t2.5m	---	---	---	---



Γράφημα 16: Λόγος ανθρακικών υποκαταστατών προς φωσφορικών ιόντων (CPR) για τα οστικά δείγματα που έχουν υποστεί στιγμαία ψύξη και συμπληρωματική κατάψυξη ή έχουν βυθιστεί σε PBS.

Από το μη παραμετρικό τεστ που πραγματοποιήθηκε προέκυψε ότι οι τιμές CPR των δειγμάτων που έχουν υποστεί στιγμαία ψύξη και συμπληρωματική κατάψυξη δεν διαφέρουν σημαντικά από τις τιμές των δειγμάτων που αποθηκεύονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ($p > 0.05$). Όμοια, και για τα δείγματα τα οποία αμέσως μετά τη στιγμαία ψύξη βυθίστηκαν σε PBS (Snap Freezing + PBS).

6.3.1.3. Υπολογισμός αναλογίας ανθρακικών υποκαταστατών προς τα οργανικά συστατικά (Carbonate to Amide I Ratio)

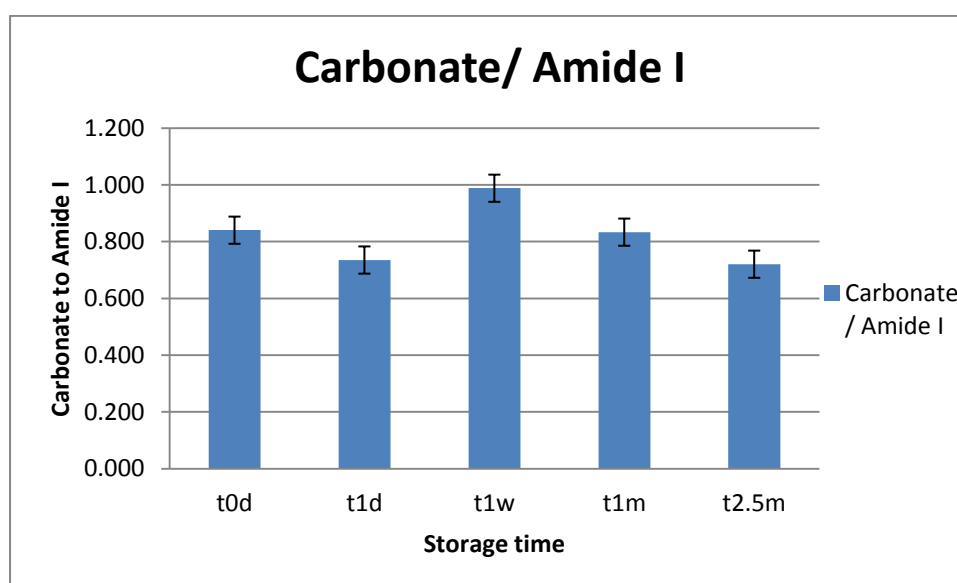
Αποθήκευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος

Για τα οστικά δείγματα τα οποία αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, χωρίς τη χρήση κάποιου διαλύτη, υπολογίστηκε ο λόγος των ανθρακικών υποκαταστατών προς τα οργανικά συστατικά (Carbonate to Amide I Ratio) για τα διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Τα αποτελέσματα καταγράφονται στον Πίνακα 19. Στον Πίνακα καταγράφεται και η τυπική απόκλιση των τιμών. Τα δείγματα αυτά θεωρούνται ως δείγματα ελέγχου και στη πορεία γίνεται σύγκριση των αντίστοιχων τιμών με αυτές που προκύπτουν από τις υπόλοιπες ομάδες.

Πίνακας 19: Τιμές λόγου ανθρακικών υποκαταστατών προς τα οργανικά συστατικά για τα οστικά δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Χρονική στιγμή	Carbonate/ Amide I	Τυπική Απόκλιση
t0d	0.840	0.258
t1d	0.735	0.248
t1w	0.988	0.177
t1m	0.833	0.073
t2.5m	0.721	0.173

Παρακάτω, παρουσιάζεται το αντίστοιχο διάγραμμα των τιμών του Πίνακα 19.



Γράφημα 17: Λόγος ανθρακικών υποκαταστατών προς τα οργανικά συστατικά (Carbonate to Amide I Ratio) για τα οστικά δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (controls).

Από τον μη παραμετρικό έλεγχο που πραγματοποιήθηκε οι τιμές που αντιστοιχούν στις μετρήσεις των διαφορετικών χρονικών διαστημάτων δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους ($p>0.05$). Οι τιμές αυτές θα χρησιμοποιηθούν για τη σύγκριση με τις τιμές των άλλων ομάδων, καθώς θεωρούνται τιμές αναφοράς.

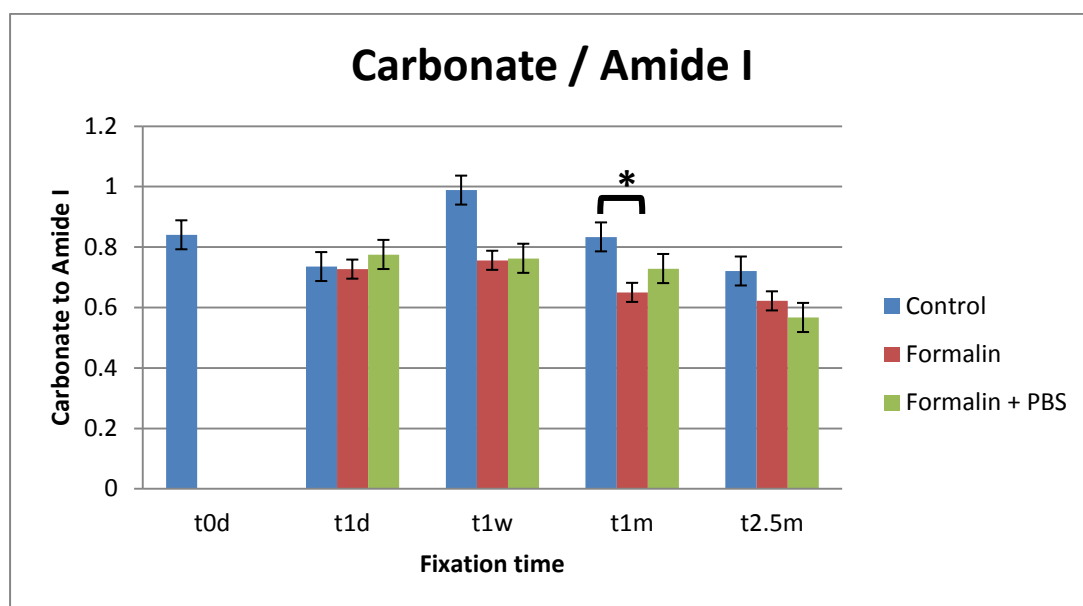
Σταθεροποίηση σε διάλυμα φορμαλίνης

Για τα δείγματα τα οποία σταθεροποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλίνης για τα διαφορετικά χρονικά διαστήματα προκύπτουν οι λόγοι Carbonate/Amide I που παρουσιάζονται στο Πίνακα 20. Στον Πίνακα καταγράφονται και οι λόγοι Carbonate/ Amide I για τα αντίστοιχα δείγματα μετά τη χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος PBS.

Πίνακας 20: Τιμές λόγου ανθρακικών υποκαταστατών προς τα οργανικά συστατικά για τα οστικά δείγματα που σταθεροποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλίνης και οι αντίστοιχες τιμές μετά τη χρήση PBS.

Χρονική στιγμή	Carbonate/Amide I (Formalin)	Τυπική Απόκλιση	Carbonate/Amide I (Formalin + PBS)	Τυπική Απόκλιση
t0d	---	---	---	---
t1d	0.727	0.215	0.775	0.058
t1w	0.756	0.085	0.763	0.124
t1m	0.650	0.090	0.729	0.174
t2.5m	0.622	0.050	0.567	0.090

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα προκύπτει το Γράφημα 18. Στο γράφημα παρουσιάζονται και οι αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων ελέγχου.



Γράφημα 18: Λόγος ανθρακικών υποκαταστατών προς τα οργανικά συστατικά (Carbonate to Amide I Ratio) για τα οστικά δείγματα που σταθεροποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλίνης και οι αντίστοιχες τιμές μετά τη χρήση PBS.

Από το μη παραμετρικό τεστ που πραγματοποιήθηκε προέκυψε ότι οι τιμές Carbonate/Amide I των δειγμάτων που έχουν σταθεροποιηθεί σε διάλυμα φορμαλίνης δεν διαφέρουν σημαντικά από τις τιμές των δειγμάτων που αποθηκεύονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ($p > 0.05$), παρά μόνο για το χρονικό διάστημα t1m, όπου εκεί σημειώνεται σημαντική διαφορά. Για τις τιμές των δειγμάτων μετά τη εμβάπτιση τους στο PBS δεν καταγράφεται σημαντική διαφορά.

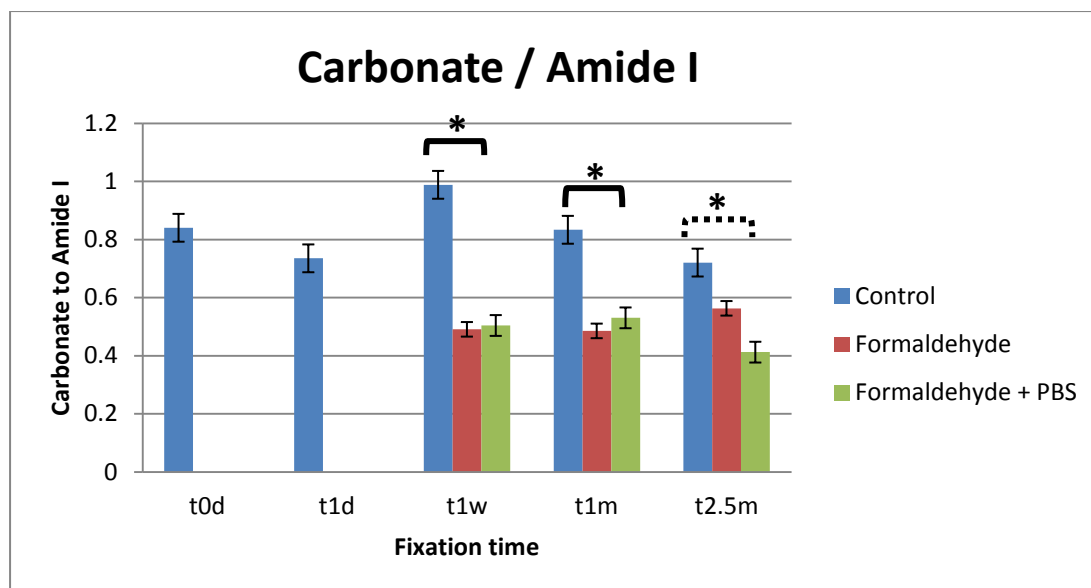
Σταθεροποίηση σε διάλυμα φορμαλδεΰδης

Για τα δείγματα τα οποία σταθεροποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλδεΰδης για τα διαφορετικά χρονικά διαστήματα προκύπτουν οι λόγοι Carbonate/ Amide I που παρουσιάζονται στο Πίνακα 21. Στον Πίνακα καταγράφονται και οι λόγοι Carbonate/ Amide I για τα αντίστοιχα δείγματα μετά τη χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος PBS.

Πίνακας 21: Τιμές λόγου ανθρακικών υποκαταστατών προς τα οργανικά συστατικά για τα οστικά δείγματα που σταθεροποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλδεΰδης και οι αντίστοιχες τιμές μετά τη χρήση PBS.

Χρονική στιγμή	Carbonate/Amide I (Formaldehyde)	Τυπική Απόκλιση	Carbonate/Amide I (Formaldehyde + PBS)	Τυπική Απόκλιση
t0d	---	---	---	---
t1d	---	---	---	---
t1w	0.491	0.118	0.504	0.026
t1m	0.485	0.160	0.530	0.056
t2.5m	0.563	0.172	0.412	0.038

Το αντίστοιχο διάγραμμα :



Γράφημα 19: Λόγος ανθρακικών υποκαταστατών προς τα οργανικά συστατικά (*Carbonate to Amide I Ratio*) για τα οστικά δείγματα που σταθεροποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλδεΐδης και οι αντίστοιχες τιμές μετά τη χρήση PBS.

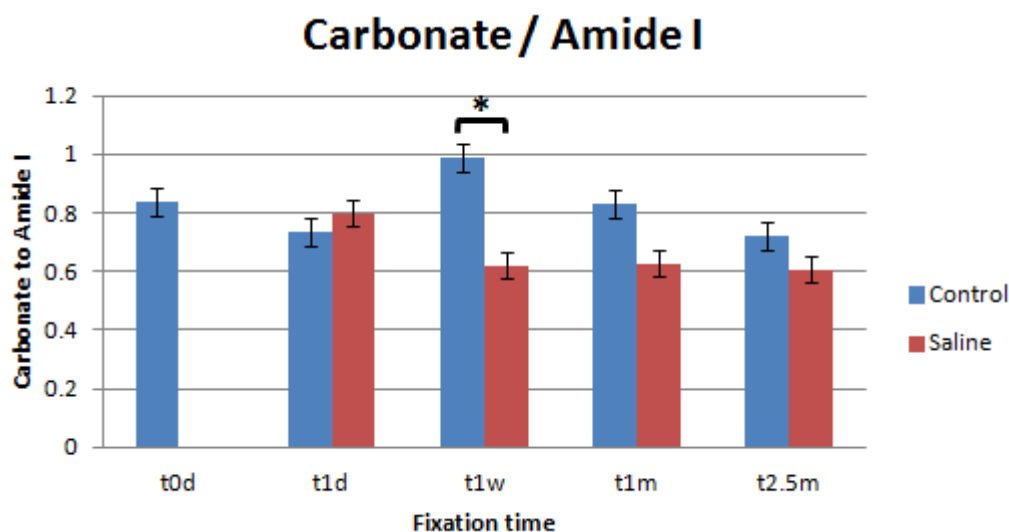
Από το μη παραμετρικό τεστ που πραγματοποιήθηκε προέκυψε ότι οι τιμές Carbonate/ Amide I των δειγμάτων που έχουν σταθεροποιηθεί σε διάλυμα φορμαλδεΐδης παρουσιάζουν σημαντική διαφορά (μείωση του λόγου) σε σχέση με τις τιμές των δειγμάτων που αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου για τις χρονικές στιγμές t1w και t1m ($p < 0.05$). Διαφορά καταγράφεται και μετά τη χρήση του PBS για τα χρονικά διαστήματα t1w, t1m και t2.5m.

Αποθήκευση σε Φυσιολογικό Ορό

Για τα δείγματα τα οποία αποθηκεύτηκαν σε φυσιολογικό ορό για τα διαφορετικά χρονικά διαστήματα προκύπτουν οι λόγοι Carbonate/Amide I που παρουσιάζονται στο Πίνακα 22. Με βάση τα δεδομένα του Πίνακα δημιουργήθηκε και το Γράφημα 20.

Πίνακας 22: Τιμές λόγου ανθρακικών υποκαταστατών προς τα οργανικά συστατικά για τα οστικά δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε φυσιολογικό ορό.

Χρονική στιγμή	Carbonate/ Amide I	Τυπική Απόκλιση
t0d	---	---
t1d	0.797	0.106
t1w	0.621	0.118
t1m	0.627	0.011
t2.5m	0.607	0.054



Γράφημα 20 : Λόγος ανθρακικών υποκαταστατών προς τα οργανικά συστατικά (Carbonate to Amide I Ratio) για τα οστικά δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε φυσιολογικό ορό.

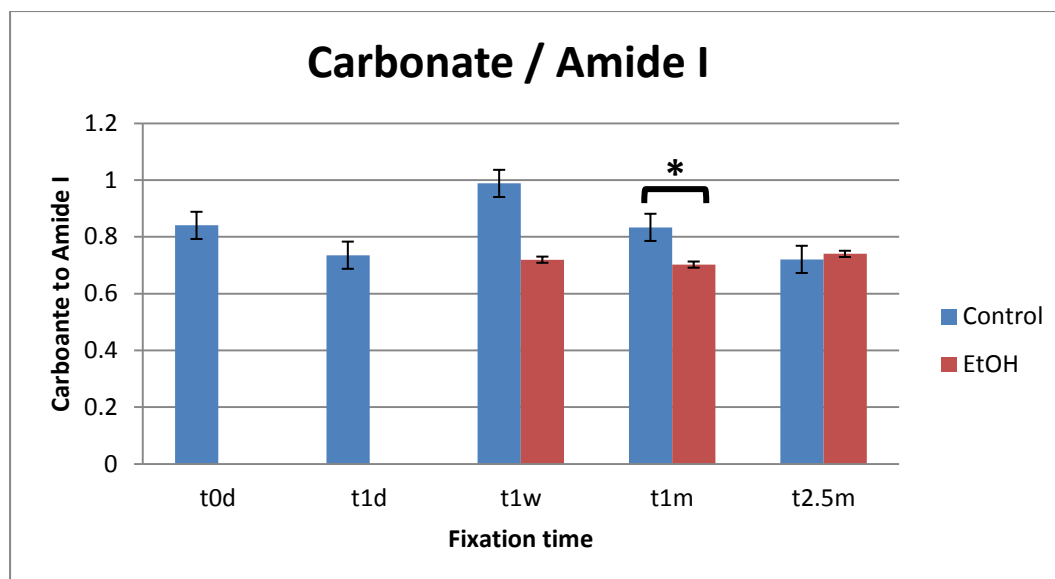
Από το μη παραμετρικό τεστ που πραγματοποιήθηκε προέκυψε ότι οι τιμές Carbonate/Amide I των δειγμάτων που έχουν αποθηκευτεί σε φυσιολογικό ορό παρουσιάζουν σημαντική διαφορά (μείωση) σε σχέση με τις τιμές των δειγμάτων που αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου για τη χρονική στιγμή t1w ($p < 0.05$).

Σταθεροποίηση σε διάλυμα Αιθανόλης

Για τα δείγματα τα οποία αποθηκεύτηκαν σε διάλυμα αιθανόλης για τα διαφορετικά χρονικά διαστήματα προκύπτουν οι λόγοι Carbonate/Amide I που παρουσιάζονται στο Πίνακα 23. Με βάση τα δεδομένα του Πίνακα δημιουργήθηκε και το Γράφημα 21.

Πίνακας 23: Τιμές λόγου ανθρακικών υποκαταστατών προς τα οργανικά συστατικά για τα οστικά δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε διάλυμα αιθανόλης.

Χρονική στιγμή	Carbonate/ Amide I	Τυπική Απόκλιση
t0d	---	---
t1d	---	---
t1w	0.719	0.178
t1m	0.702	0.032
t2.5m	0.740	0.207



Γράφημα 21: Λόγος ανθρακικών υποκαταστατών προς τα οργανικά συστατικά (Carbonate to Amide I Ratio) για τα οστικά δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε διάλυμα αιθανόλης.

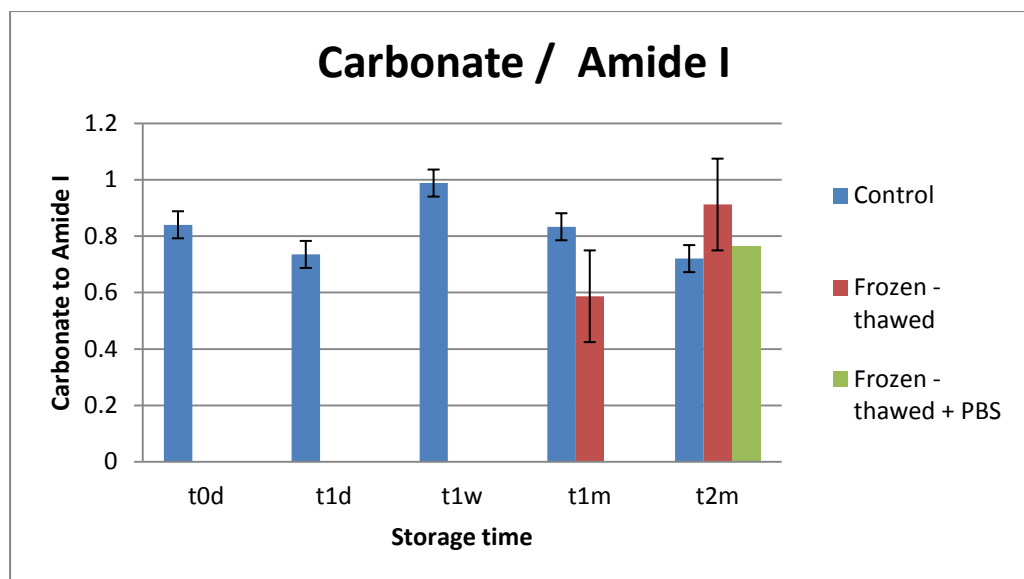
Από το μη παραμετρικό τεστ που πραγματοποιήθηκε προέκυψε ότι οι τιμές Carbonate/Amide I των δειγμάτων που έχουν αποθηκευτεί σε διάλυμα αιθανόλης παρουσιάζουν σημαντική διαφορά σε σχέση με τις τιμές των δειγμάτων που αποθηκεύονται σε θερμοκρασία δωματίου για τη χρονική στιγμή t1w ($p < 0.05$). Συγκεκριμένα, καταγράφεται μείωση των τιμών.

Αποθήκευση σε συνθήκες κατάψυξης

Για τα δείγματα τα οποία αποθηκεύτηκαν συνθήκες ψύξης και αποψύχθηκαν μόνο δύο φορές προκύπτουν οι λόγοι Carbonate/Amide I που παρουσιάζονται στο Πίνακα 24. Στον Πίνακα καταγράφεται και ο λόγος Carbonate/Amide I για τα αντίστοιχα δείγματα μετά τη χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος PBS. Με βάση τα δεδομένα του Πίνακα δημιουργήθηκε και το Γράφημα 22.

Πίνακας 24: Τιμές λόγου ανθρακικών υποκαταστατών προς τα οργανικά συστατικά για τα οστικά δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε συνθήκες κατάψυξης.

Χρονική στιγμή	Carbonate/Amide I (Frozen - thawed)	Τυπική Απόκλιση	Carbonate/Amide I (Frozen - thawed + PBS)	Τυπική Απόκλιση
t0d	---	---	---	---
t1d	---	---	---	---
t1w	---	---	---	---
t1m	0.587	0.210	---	---
t2.5m	0.912	0.214	0.765	0.263



Γράφημα 22: Λόγος ανθρακικών υποκαταστατών προς τα οργανικά συστατικά (Carbonate to Amide I Ratio) για τα οστικά δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε συνθήκες κατάψυξης και η αντίστοιχη τιμή μετά τη χρήση PBS.

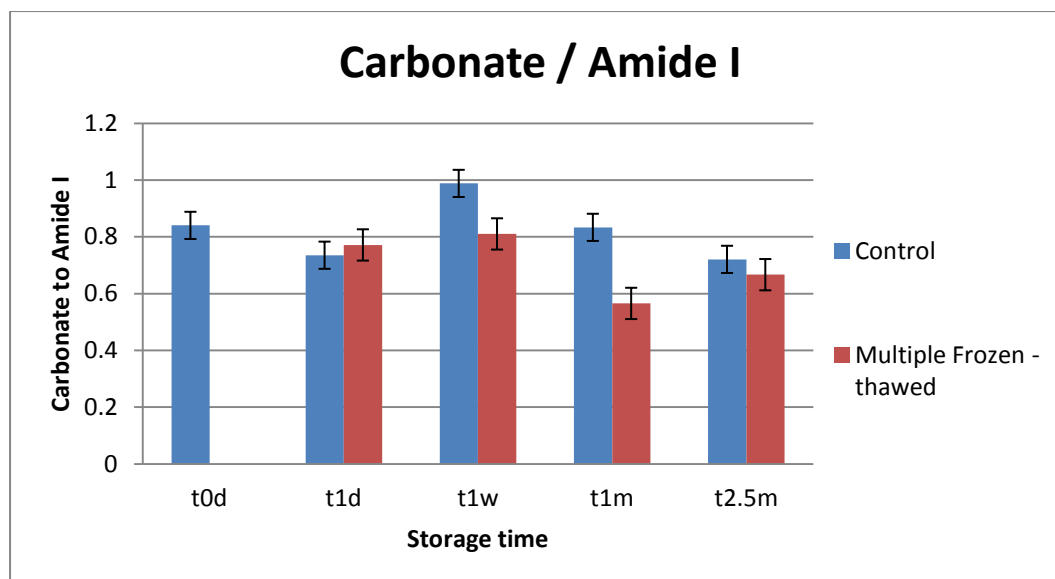
Από το μη παραμετρικό τεστ που πραγματοποιήθηκε προέκυψε ότι οι τιμές Carbonate/Amide I των δειγμάτων που έχουν αποθηκευτεί σε συνθήκες κατάψυξης δεν διαφέρουν σημαντικά από τις τιμές των δειγμάτων που αποθηκεύονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ($p > 0.05$). Διαφορά δεν καταγράφεται ούτε στη περίπτωση όπου έγινε χρήση του PBS, αλλά ούτε στις μεταξύ τους τιμές [(Frozen – thawed) – (Frozen – thawed + PBS)].

Αποθήκευση σε συνθήκες κατάψυξης και πολλαπλούς κύκλους απόψυξης

Για τα δείγματα τα οποία έχουν υποστεί πολλαπλούς κύκλους ψύξης – απόψυξης προκύπτουν οι λόγοι Carbonate/ Amide I που παρουσιάζονται στο Πίνακα 25. Με βάση τα δεδομένα του Πίνακα δημιουργήθηκε και το Γράφημα 23.

Πίνακας 25: Τιμές λόγου ανθρακικών υποκαταστατών προς τα οργανικά συστατικά για τα οστικά δείγματα που έχουν υποστεί πολλαπλούς κύκλους ψύξης – απόψυξης.

Χρονική στιγμή	Carbonate/ Amide I	Τυπική Απόκλιση
t0d	---	---
t1d	0.772	0.316
t1w	0.810	0.153
t1m	0.565	0.244
t2.5m	0.667	0.302



Γράφημα 23: Λόγος ανθρακικών υποκαταστατών προς τα οργανικά συστατικά (Carbonate to Amide I Ratio) για τα οστικά δείγματα που έχουν υποστεί πολλαπλούς κύκλους ψύξης – απόψυξης.

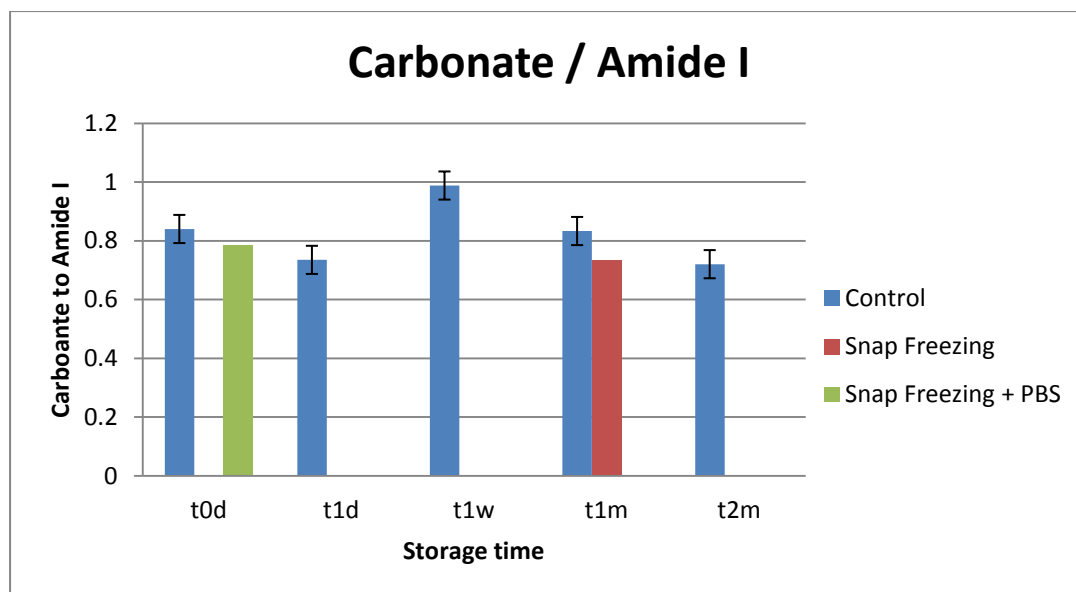
Από το μη παραμετρικό τεστ που πραγματοποιήθηκε προέκυψε ότι οι τιμές Carbonate/ Amide I των δειγμάτων που έχουν υποστεί πολλαπλούς κύκλους ψύξης - απόψυξης δεν διαφέρουν σημαντικά από τις τιμές των δειγμάτων που αποθηκεύονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ($p > 0.05$).

Στιγμιαία ψύξη και συμπληρωματική κατάψυξη ή χρήση PBS

Για τα δείγματα τα οποία έχουν υποστεί στιγμιαία κατάψυξη και συμπληρωματική κατάψυξη προκύπτουν οι λόγοι Carbonate/Amide I που παρουσιάζονται στο Πίνακα 26. Με βάση τα δεδομένα του Πίνακα δημιουργήθηκε και το Γράφημα 24.

Πίνακας 26: Τιμές λόγου ανθρακικών υποκαταστατών προς τα οργανικά συστατικά για τα οστικά δείγματα που έχουν υποστεί στιγμιαία ψύξη και συμπληρωματική κατάψυξη ή έχουν βυθιστεί σε PBS.

Χρονική στιγμή	Carbonate/Amide I(Snap Freezing + PBS)	Τυπική Απόκλιση	Carbonate/Amide I (Snap Freezing)	Τυπική Απόκλιση
t0d	0.786	0.156	---	---
t1d	---	---	---	---
t1w	---	---	---	---
t1m	---	---	0.734	0.197
t2.5m	---	---	---	---



Γράφημα 24 : Λόγος ανθρακικών υποκαταστατών προς τα οργανικά συστατικά (Carbonate to Amide I Ratio) για τα οστικά δείγματα που έχουν υποστεί στιγμιαία ψύξη και συμπληρωματική κατάψυξη ή έχουν βυθιστεί σε PBS.

Από το μη παραμετρικό τεστ που πραγματοποιήθηκε προέκυψε ότι οι τιμές Carbonate/ Amide I των δειγμάτων που έχουν υποστεί στιγμιαία ψύξη και συμπληρωματική κατάψυξη δεν διαφέρουν σημαντικά από τις τιμές των δειγμάτων που αποθηκεύονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ($p > 0.05$). Όμοια, και για τα δείγματα τα οποία αμέσως μετά τη στιγμιαία ψύξη βυθίστηκαν σε PBS (Snap Freezing + PBS).

Συγκεντρωτικά επισυνάπτεται ο Πίνακας 27, ο οποίος παρουσιάζει τις ομάδες μελέτης και καταγράφει τον εντοπισμό στατιστικής διαφοράς στις τιμές των ποσοτικών παραμέτρων, για κάποια χρονική στιγμή.

Πίνακας 27: Εντοπισμός στατιστικά σημαντικών διαφορών στις τιμές των ποσοτικών παραμέτρων των διαφορετικών ομάδων μελέτης.

Ομάδα Μελέτης	MMR	CPR	Carbonate/Amide I
Αποθήκευση σε RT	---	---	---
Σταθεροποίηση σε Φορμαλίνη	---	---	✓
Σταθεροποίηση σε Φορμαλίνη + PBS	✓	---	---
Σταθεροποίηση σε Φορμαλδεΰδη	✓	✓	✓
Σταθεροποίηση σε Φορμαλδεΰδη + PBS	✓	✓	✓
Αποθήκευση σε Φυσιολογικό Ορό	✓	---	✓
Αποθήκευση σε Αιθανόλη	---	---	✓
Αποθήκευση σε συνθήκες κατάψυξης	---	---	---
Αποθήκευση σε συνθήκες κατάψυξης + PBS	---	---	---
Πολλαπλοί κύκλοι ψύξης -απόψυξης	---	---	---
Στιγμιαία ψύξη και συμπληρωματική κατάψυξη	---	---	---
Στιγμιαία ψύξη + PBS	✓	---	---

Όπως παρατηρούμε στατιστικά σημαντικές διαφορές εντοπίζονται σε όλες τις περιπτώσεις όπου έχει πραγματοποιηθεί η χρήση κάποιου διαλύτη, ενώ αντίθετα για τα δείγματα που έχουν αποθηκευτεί με τη διαδικασία της ψύξης δεν έχει καταγραφεί κάποια σημαντική απόκλιση.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στη παρούσα εργασία η φασματοσκοπία Raman επιλέχθηκε για την μελέτη διαφορετικών πρωτοκόλλων αποθήκευσης και διατήρησης οστικών δειγμάτων. Οι βασικοί τρόποι αποθήκευσης περιλαμβάνουν τη χρήση σταθεροποιητικών (fixatives) όπως φορμαλίνη, φορμαλδεΰδη, φυσιολογικό όρο και αιθανόλη αλλά επιπλέον και τη διατήρηση των δειγμάτων μέσω της διαδικασίας της ψύξης ή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η ανάγκη ανάπτυξης και μελέτης διαφορετικών τρόπων αποθήκευσης οστών αποσκοπεί στη λήψη συμπερασμάτων σχετικά με την επίδραση και την αλλοίωση που προσδίδουν οι μέθοδοι στην φασματοσκοπική εικόνα Raman, καθώς επίσης και στις φασματικές παραμέτρους Raman που υπολογίζονται, έτσι ώστε μελλοντικά να εφαρμόζονται με ασφάλεια σε μελέτες οστικών δειγμάτων.

Από τη ανάλυση των φασμάτων που πραγματοποιήθηκε προκύπτει ότι όσον αφορά τα δείγματα τα οποία αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, δεν καταγράφονται στατιστικά σημαντικές διαφορές για τις τιμές των λόγων MMR, CPR και Carbonate/Amide I για τα διαφορετικά χρονικά διαστήματα στα οποία πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις Raman. Για το λόγο αυτό, οι τιμές αυτές χρησιμοποιήθηκαν για τη σύγκριση με τα δείγματα τα οποία είχαν υποστεί προ - επεξεργασία. Σχετικά με τα δείγματα τα οποία σταθεροποιήθηκαν με τη χρήση κάποιου διαλύτη, σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρούνται μεγαλύτερες διαφορές στους δείκτες που επιλέχθηκαν προς μελέτη με φασματοσκοπία Raman και καταγράφονται στατιστικά σημαντικές διαφορές, οι οποίες επιβεβαιώνουν την αλλοίωση που προκαλούν τα σταθεροποιητικά στην ανόργανη και οργανική μήτρα των οστών [28].

Συγκρίνοντας τη δράση των σταθεροποιητικών παρατηρείται ότι η χρήση της 37% φορμαλδεΰδης προκαλεί πιο έντονες αλλαγές στα φάσματα με εμφανή τη παρουσία των κορυφών του διαλύτη στα 914 cm^{-1} , 1319 cm^{-1} και 1492 cm^{-1} , οι οποίες εξακολουθούν να συνυπάρχουν στα φάσματα και μετά τη εμβάπτιση των δειγμάτων στο PBS. Η φορμαλδεΰδη φαίνεται να αυξάνει τις εντάσεις των κορυφών του φάσματος και ιδιαίτερα στις περιοχές ενδιαφέροντος, του Αμιδίου I και των ανθρακικών. Σε αντίθεση με τις υπόλοιπες κορυφές που συνιστούν την περιοχή των ανθρακικών η κορυφή στα 1074 cm^{-1} φαίνεται να μειώνεται και να αλλοιώνεται η μορφή της. Η επίδραση του σταθεροποιητικού επιβεβαιώνεται και ποσοτικά με την μείωση του λόγου MMR, αύξηση του CPR με την πάροδο του χρόνου και μείωση της τιμής του Carbonate/Amide I.

Η φορμαλδεΰδη επηρεάζει κυρίως κορυφές οι οποίες σχετίζονται με το κολλαγόνο, με αποτέλεσμα να αλλάζει τη δευτεροταγή δομή του και να αλλοιώνει τους λόγους που προκύπτουν από τις εντάσεις του Αμιδίου I, το οποίο χρησιμοποιείται για το

χαρακτηρισμό της μήτρας του κολλαγόνου στων οστών. Η επιρροή στις κορυφές που σχετίζονται με το κολλαγόνο είναι αναμενόμενη και λόγω των σταυροδεσμών που δημιουργεί η φορμαλδεΰδη με τα οργανικά συστατικά των δειγμάτων [29]. Μείωση του λόγου MMR έχει επίσης καταγραφεί [30]. Ακόμα, η αύξηση της τιμής του CPR υποδεικνύει την επιρροή του αριθμού ανθρακικών υποκαταστάσεων τύπου Β στο πλέγμα του βιοαπατίτη. Αντίθετη παρατήρηση καταγράφηκε σε μελέτη βραχυπρόθεσμης σταθεροποίησης με τη χρήση φορμαλδεΰδης σε δείγματα μηριαίων οστών ποντικών από την ερευνητική ομάδα του Fiedler [29]. Οι τιμές παρουσιάζουν την ίδια συμπεριφορά σε σχέση με τις τιμές των δειγμάτων ελέγχου ακόμα και μετά τη χρήση του PBS, το οποίο φαίνεται να αυξάνει την ένταση των κορυφών πάνω από το φάσμα αναφοράς. Το PBS προκαλεί την ενυδάτωση του κολλαγόνου και έτσι τα φάσματα τείνουν να πλησιάσουν τη μορφή των φρέσκων δειγμάτων, χωρίς να αποτρέπουν τις αλλοιώσεις που προκαλεί η φορμαλδεΰδη.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η περίπτωση της σταθεροποίησης με ρυθμιστικό διάλυμα (10%) φορμαλίνης, η οποία φαίνεται να επηρεάζει σε μικρότερο βαθμό αλλά με παρόμοιο τρόπο τα οστικά δείγματα σε σχέση με τη φορμαλδεΰδη και η δράση της να εμφανίζεται με τη πάροδο του χρόνου. Μεγαλύτερες διαφορές στα φάσματα αντιστοιχούν σε μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα αποθήκευσης και αφορούν κυρίως τη μείωση της έντασης της κορυφής των ανθρακικών και την αύξηση του Αμιδίου Ι. Στους λόγους δεν εντοπίζονται αρκετές στατιστικές σημαντικές διαφορές, με εξαίρεση κάποιες τιμές που αφορούν το Αμίδιο Ι. Όπως και στη περίπτωση της φορμαλδεΰδης καταγράφεται μικρή μείωση των τιμών των MMR και Carbonate/Amide Ι ενώ σε αντίθεση με τη προηγούμενη περίπτωση οι τιμές CPR υφίστανται μια μικρή μείωση η οποία όμως δε προκύπτει σημαντική σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου.

Η αύξηση των εντάσεων των κορυφών έρχεται σε αντίθεση με αναφορές τις βιβλιογραφίας στις οποίες μετά τη σταθεροποίηση με διάλυμα φορμαλίνης έχει καταγραφεί μείωση των εντάσεων των κορυφών των αμιδίων Ι και ΙΙΙ καθώς και άλλων σε όλο το εύρος του φάσματος, η οποία αποδίδεται στην αφυδάτωση που υφίσταται το κολλαγόνο κατά τη σταθεροποίηση, λόγω της αντικατάστασης του νερού των ιστών από τα σταθεροποιητικά [27,31]. Όμως, στη πραγματικότητα η αφυδάτωση της δομής θα προκαλούσε μείωση των δεσμών υδρογόνου και αύξηση της ελευθερίας των αμιδικών δεσμών, με αποτέλεσμα την ενίσχυση του σήματος Raman και συνεπώς την καταγραφή αυξανόμενων εντάσεων, όπως παρατηρείται και στα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας. Οι συχνότητες Raman των Αμιδίων Ι και ΙΙΙ συσχετίζονται με τις διαδρικές (dihedral) γωνίες και τους δεσμούς υδρογόνου και για το λόγο αυτό οι μπάντες των αμιδίων είναι κατάλληλες για την ανάλυση αλλαγών στα μόρια του κολλαγόνου και τύπων των δευτεροταγών δομών όπως η α -έλικα και το φύλλο – β [32]. Οποιαδήποτε αλλαγή πλευρικά των μορίων κολλαγόνου και στη δομή των δεσμών νερού, μέσω της αντικατάστασης των μορίων

νερού κατά τη σταθεροποίηση, διαταράσσει τη δευτεροταγή δομή του κολλαγόνου και συνεπώς στη διαμόρφωση του πεπτιδικού δεσμού. Για το λόγο αυτό οι πρωταρχικές επιδράσεις της σταθεροποίησης θα είναι στις μπάντες των αμιδίων του φάσματος Raman, το οποίο αποτελείται κυρίως από πεπτιδικές δονήσεις.

Η φορμαλδεΰδη αποτελεί πιο δραστικό σταθεροποιητικό σε σχέση με τη ρυθμιστικά ουδέτερη φορμαλίνη, καθώς αντιδρά με το οξυγόνο με αποτέλεσμα η υποξία να μειώνει την τιμή του pH, δημιουργώντας μυρμιγκικό οξύ το οποίο διαλύει συστατικά του οστού όπως Ca και P (mineral dissolution). Έτσι λοιπόν, προτιμάται η χρήση ρυθμιστικά ουδέτερων διαλυμάτων ώστε να αποφεύγεται η περίσσεια οξέων. Αυτό εξηγεί και τη μεγαλύτερη μείωση του λόγου ανόργανων προς οργανικών για το διάλυμα της φορμαλδεΰδης, που πιθανά οφείλεται στη σταθερότητα των οργανικών συστατικών έναντι της δράσης των οξέων.

Ακόμα, σε έρευνα του Timchenko [33] που πραγματοποιήθηκε για τη μελέτη δειγμάτων υδροξυαπατίτη μέσω της απομόνωσης τους από διαλύματα μετά από διαφορετικές περιόδους απασβεστοποίησης (demineralization), παρατηρήθηκε ότι με αύξηση του χρόνου προκλήθηκε ανάλογη μείωση των εντάσεων των κορυφών που σχετίζονται με τις υποκαταστάσεις τύπου B. Ακόμα με την αύξηση του χρόνου, ο λόγος MMR μειώθηκε, εξαιτίας της σταθερότητας των οργανικών συστατικών ενάντια στη δράση των οξέων κατά τη διάρκεια της απασβεστοποίησης και τη σταδιακή συγκέντρωση στο διάλυμα (υποδηλώνοντας διαφορετικό βαθμό αποβολής (leaching) ανόργανων και οργανικών συστατικών, με σχετική μείωση στη συγκέντρωση των ανόργανων συστατικών). Η παρουσία ελλειμμάτων (vacant site) στο κρύσταλλο του απατίτη και η ικανότητα υποκατάστασης ατόμων και ιόντων μέσα στο κρύσταλλο με την έλλειψη ή εισροή ιόντων από το εξωτερικό περιβάλλον καθορίζει τις διαφοροποιήσεις (variability) της δομής του απατίτη. Οι παράμετροι ποιότητας στην περίπτωση οστικών δειγμάτων χήνας και πάπιας αλλάζουν πολύ αργά με το χρόνο, μάλλον εξαιτίας του μεγαλύτερου πορώδους στα οστά των πτηνών [33].

Η σταθεροποίηση με τη χρήση φυσιολογικού ορού φαίνεται να επηρεάζει τις πρωτεΐνες του κολλαγόνου καθώς μετά τη πάροδο μιας εβδομάδας προκαλεί μείωση των τιμών MMR και Carbonate/Amide I ενώ οι τιμές CPR καταγράφουν μικρή αύξηση, η οποία όμως δεν προκύπτει στατιστικά σημαντική. Η αύξηση των εντάσεων του Αμιδίου I μπορεί να οφείλεται και στην επικάλυψη της κορυφής από την ευρεία μπάντα του διαλύματος του φυσιολογικού ορού που προκύπτει περίπου στα 1640 cm^{-1} . Ακόμα, στη περίπτωση της χρήσης αιθανόλης χαρακτηριστική είναι η εμφάνιση των κορυφών του διαλύματος (στα 883, 1052, 1097, 1453 cm^{-1}) οι οποίες αλληλεπικαλύπτουν και προκαλούν αλλοιώσεις σε άλλες κορυφές του φάσματος. Η αιθανόλη προκαλεί μικρή μείωση των τιμών των λόγων MMR, CPR και Carbonate/Amide I, με τον τελευταίο να καταγράφει στατιστικά σημαντική

διαφορά. Οι εντάσεις των κορυφών της περιοχής των ανθρακικών παρουσιάζουν υψηλότερες εντάσεις, όπως και το Αμιδίο Ι. Σε αναφορές της βιβλιογραφίας σημειώνεται ότι η αιθανόλη διαλύει τα λιπίδια μετουσιώνει τις πρωτεΐνες της μήτρας του οστού[34], διαταράσσοντας τη δευτεροταγή δομή τους και επηρεάζοντας κυρίως τους λόγους MMR [17]. Όμως, η τελευταία παρατήρηση δε καταγράφεται ως σημαντική στη παρούσα εργασία.

Από την άλλη πλευρά, η αποθήκευση και διατήρηση των δειγμάτων σε συνθήκες ψύξης φάνηκε να μην προκαλεί έντονες τροποποιήσεις στα φάσματα, με τους αντίστοιχους λόγους να μην καταγράφουν κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τους λόγους των δειγμάτων αναφοράς. Από τη σύγκριση των φασμάτων προκύπτει ότι η απόψυξη επηρεάζει την περιοχή των ανθρακικών, προκαλώντας μείωση της έντασης της κορυφής των ανθρακικών, ενώ καταγράφεται και μικρή αύξηση της τιμής του Αμιδίου Ι, κυρίως κατά τη δεύτερη απόψυξη. Ακόμα, η ψύξη αυξάνει σε όλες τις περιπτώσεις την κορυφή των ανθρακικών που εμφανίζεται στα 1104 cm^{-1} , που χαρακτηρίζει τις ανθρακικές υποκαταστάσεις τύπου Α. Φαίνεται ότι η απόψυξη πάνω από μία φορά των οστικών δειγμάτων επηρεάζει περισσότερο τη δομή των οστών, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τη βιβλιογραφία[27,35] και προκαλεί μικρή μείωση και της έντασης του Αμιδίου ΙΙΙ.

Σχετικά με τα δείγματα εκείνα τα οποία έχουν υποστεί πολλαπλούς κύκλους ψύξης – απόψυξης παρατηρείται ότι οι τιμές των λόγων παρουσιάζουν μια μικρή μείωση, η οποία δεν προκύπτει σημαντική. Η μέτρηση που αντιστοιχεί στο μεγαλύτερο διάστημα αποθήκευσης φαίνεται να παρουσιάζει όπως και πριν τις περισσότερες αποκλίσεις στους λόγους, ενώ με την αύξηση των κύκλων απόψυξης φαίνεται να μειώνεται η ένταση και της κορυφής του Αμιδίου ΙΙΙ, παρατήρηση που συμφωνεί με αντίστοιχη μελέτη [35].

Τέλος, για τα οστά τα οποία ψύχθηκαν με τη χρήση υγρού αζώτου, φαίνεται η δομή τους να μην επηρεάζεται ιδιαίτερα. Καταγράφεται μια μικρή μείωση των τιμών των λόγων και εντοπίζεται στατιστική διαφορά στη τιμή MMR μόνο στη περίπτωση όπου έχει γίνει χρήση του ρυθμιστικού PBS. Η διαφορά αυτή μπορεί να οφείλεται και στη ποσότητα φωσφορικών που προστίθεται στο δείγμα από το διάλυμα. Ακόμα, παρατηρείται αύξηση έντασης στη κορυφή 1450 cm^{-1} που αποδίδεται στη (wagging) δόνηση κάμψης του δεσμού $\delta(\text{CH}_2)$ των πρωτεϊνών, καθώς και του Αμιδίου Ι. Η ψύξη προκαλεί το σχηματισμό κρυστάλλων πάγου στη μήτρα του κολλαγόνου ενώ έχει αναφερθεί η επιρροή των πεπτιδικών δονήσεων του Αμιδίου Ι και η αφυδάτωση του [27], ενώ η περιεκτικότητα σε ανθρακικά παραμένει ανεπηρέαστη. Στη βιβλιογραφία η αποικοδόμηση της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών αποδίδεται στη μείωση των εντάσεων στις κορυφές του Αμιδίου Ι, μια παρατήρηση που δεν καταγράφεται στη παρούσα εργασία. Η μέθοδος του snap freezing μοιάζει να διατηρεί τα οστικά δείγματα σε κατάσταση αρκετά κοντά σε

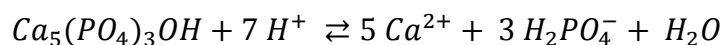
αυτή που παρουσίαζαν πριν την αποθήκευση. Αναφορές οι οποίες σημειώνουν την επίδραση αυτής της διαδικασίας στο κολλαγόνο εξαιτίας του πολύ γρήγορου σχηματισμού κρυστάλλων στη μήτρα του κολλαγόνου [27], δεν επιβεβαιώνονται.

Ενδιαφέρουσα παρατήρηση κατά την ανάλυση των φασμάτων αποτελεί η κορυφή που εντοπίζεται στα 754 cm^{-1} και αποδίδεται σε δονήσεις ν_4 των ανθρακικών του ασβεστίτη. Μελέτες αναφέρουν ότι η κορυφή του ασβεστίτη ν_4 παρουσιάζει μια μονή κορυφή στο εύρος $750\text{-}760\text{ cm}^{-1}$ [36,37] και σχετίζονται με Β τύπου υποκαταστάσεις. Η σχετικά αδύναμη αυτή κορυφή παρατηρείται μόνο στα φάσματα των δειγμάτων που αναλύονται κατά την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας (t1d) και απουσιάζει από όλες τις μετρήσεις των επόμενων χρονικών διαστημάτων. Η χαμηλή περιεκτικότητα του οστού σε ασβεστίτη φαίνεται να επηρεάζεται από όλες τις μεθόδους αποθήκευσης και η πάροδος του χρόνου μετά την λήψη των δειγμάτων να εμποδίζει τη δόνηση του ν_4 τρόπου των ανθρακικών του και για το λόγο αυτό δεν παρατηρείται. Η απουσία της συγκεκριμένης κορυφής έχει αναφερθεί ακόμα και σε in - vitro μελέτη δειγμάτων τα οποία είχαν υποστεί κάποιου είδους επεξεργασία (prepared samples) [38].

Ακόμα μια σημαντική παρατήρηση, είναι η εμφάνιση της χαρακτηριστικής κορυφής που εντοπίζεται στα 1085 cm^{-1} και η οποία αντιστοιχεί σε δονήσεις ν_1 συμμετρική έκταση της ομάδας CO_3 του ασβεστίτη (CaCO_3). Η κορυφή αυτή εμφανίζεται μόνο στα φάσματα τα οποία έχουν επεξεργαστεί με τη χρήση κάποιου διαλύτη και απουσιάζει τόσο από τα φάσματα αναφοράς όσο και από τα φάσματα των δειγμάτων τα οποία έχουν αποθηκευτεί μέσω ψύξης, ενώ η ένταση της σε αρκετές περιπτώσεις παρουσιάζει αύξηση ανάλογη με το χρόνο παραμονής του δείγματος στο αντίστοιχο διάλυμα, λόγω της περισσότερης ενυδάτωσης του ιστού. Από τα δείγματα που ψύχονται εμφανίζεται μόνο στη περίπτωση όπου πραγματοποιήθηκε στιγμιαία ψύξη των δειγμάτων και στη συνέχεια χρήση PBS. Η παρατήρηση αυτή θα μπορούσε να εξηγηθεί αν λάβουμε υπόψη την δομή του απατίτη καθώς και την ένυδρη στοιβάδα η οποία βρίσκεται στην επιφάνεια των νανοκρυστάλλων του. Το ένυδρο στρώμα περιλαμβάνει ένα περιβάλλον ιοντικά μη απατητικό, όπου περιέχει σχετικά κινητά ιοντικά είδη στην επιφάνεια του, το οποίο παρατηρείται μόνο σε υδατικά μέσα και είναι υπεύθυνο για την αντιδραστικότητα του (κινητικότητα ιόντων και ιδιότητες απορρόφησης). Τα κινητά ιοντικά είδη μπορούν εύκολα να ανταλλάσσονται με ιόντα από περιβάλλοντα υγρά. Η επαφή με υδατικά διαλύματα μπορεί να προκαλέσει επιφανειακή υδρόλυση δημιουργώντας στην επιφάνεια του ιόντα HPO_4^{2-} . Έτσι, από την ανταλλαγή ιόντων μεταξύ των διαλυμάτων και των ιόντων του μη απατητικού περιβάλλοντος μπορεί να ενισχύεται η δόνηση των δεσμών του ασβεστίτη. Αναλογιζόμενοι και τον ρόλο του pH στον απατίτη μπορούμε να υποθέσουμε ότι στοιχεία του απατίτη όπως Ca και P αντιδρούν με τα διαλύματα δημιουργώντας το CaCO_3 που παρατηρείται.

Τα φωσφορικά ασβέστια γίνονται περισσότερο διαλυτά με τη μείωση του pH.

Η παρακάτω εξίσωση δείχνει το ρόλο των ιόντων υδρογόνου στη διαλυτότητα του υδροξυαπατίτη :



Μια αύξηση στη συγκέντρωση των ιόντων υδρογόνου, η οποία μπορεί να παρέχεται από τα σταθεροποιητικά, εξαναγκάζει την αντίδραση προς τα δεξιά και έτσι διαλύεται ο υδροξυαπατίτης. Η διάλυση αυτή μπορεί να επηρεάζει την περιοχή των ανθρακικών. Επομένως, σε περισσότερο αλκαλικές συνθήκες, ο υδροξυαπατίτης είναι όλο και πιο σταθερός, αλλά με τη παρουσία CO_2 , το ασβέστιο καθιζάνει (precipitate) από το διάλυμα ως διανθρακικό (bicarbonate). Σε ένα τέτοιο περιβάλλον, η διαλυτότητα του υδροξυαπατίτη μπορεί να αυξηθεί υπό αλκαλικές συνθήκες, αλλά αυτό θα περιοριστεί από την συγκέντρωση του CO_2 . Όταν ο υδροξυαπατίτης διαλύεται, καταναλώνει ιόντα H^+ και ωθεί την αντίδραση προς τα αριστερά, μειώνοντας την οξύτητα.

Ο υδροξυαπατίτης είναι περισσότερο σταθερός σε pH γύρω στο 7.8 και έχει χαμηλή διαλυτότητα σε αλκαλικά υδατικά συστήματα ($pH > 7.5$), ενώ σε όξινα περιβάλλοντα ($pH \leq 6.0$), η διαλυτότητα του είναι σχετικά υψηλή. Σημειώνεται ότι όλα τα διαλύματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη σταθεροποίηση των οστών χαρακτηρίζονται όξινα. Έτσι, το οστό τείνει να επιβιώνει καλύτερα σε αλκαλικά περιβάλλοντα, καθώς ο απατίτης είναι λιγότερο πιθανό να διαλυθεί και για αυτό στη περίπτωση της φορμαλδεΰδης που είναι και το πιο όξινο διάλυμα, οι διαφορές που παρατηρούνται είναι πιο έντονες, ενώ τα ενυδατωμένα διαλύματα όπως η φορμαλίνη παρουσιάζουν αλλοιώσεις μικρότερου βαθμού. Το pH των περιβάλλοντων υδάτων καθορίζει επίσης τη φύση των ιόντων που είναι παρόντα στις αντιδράσεις ιοντικής ανταλλαγής. Διαφορές των ανόργανων συστατικών ανταποκρίνονται στα όρια του όξινου περιβάλλοντος. Οι ιοντικές ανταλλαγές εντός του ενυδατωμένου στρώματος του απατίτη των οστών συνοδεύονται από μια μαζική απελευθέρωση πρωτεϊνών. Η έκλυση της πρωτεΐνης λαμβάνεται με αντικατάσταση χρησιμοποιώντας φωσφορικά διαλύματα αυξημένης συγκέντρωσης. Έτσι, η ανταλλαγή ιόντων τροποποιεί τα τοπικά ιοντικά περιβάλλοντα και τη δομή του ενυδατωμένου στρώματος [39].

Θα πρέπει να αναφερθεί ότι αλλαγές στους λόγους που σχετίζονται με τον υπολογισμό των ανθρακικών μπορεί να οφείλονται και στο γεγονός ότι η κορυφή $\nu_1 CO_3^{2-}$ περίπου στα 1070 cm^{-1} μπορεί να περιλαμβάνει ποσοστό της $\nu_3 PO_4^{3-}$ δόνησης στα 1076 cm^{-1} , καθώς οι δύο αυτές κορυφές αλληλεπικαλύπτονται όπως έχει αναφέρει και ο Penel [29,38]. Η κορυφή φωσφορικών στα 1076 cm^{-1} διατηρεί μια σταθερή θέση και περιοχή, η οποία περιβάλλεται από τη κορυφή των ανθρακικών όταν η περιεκτικότητα σε άνθρακα υπερβαίνει το 3%. Επιπλέον, οι

αποκλίσεις οι οποίες καταγράφονται στη βιβλιογραφία σχετικά με την κορυφή του Αμιδίου Ι αποδίδονται στο διαφορετικό προσανατολισμό του δείγματος.

Συμπερασματικά καταλήγουμε στο ότι καμία από τις μεθόδους που περιγράφηκαν δε διατηρεί την αρχική σύνθεση των οστών αναλλοίωτη. Τα σταθεροποιητικά μπορεί να προκαλέσουν διάλυση των ανόργανων συστατικών των οστών, τροποποιήσεις στις δονήσεις των δεσμών του κολλαγόνου και επικαλύψεις σε κορυφές των φασμάτων προσθέτοντας πολυπλοκότητα στο υπόβαθρο των φασμάτων με αποτέλεσμα τη δυσκολία υπολογισμού των αξιόπιστων λόγων. Όμως, στη περίπτωση που δεν είναι δυνατή η απευθείας μέτρηση φρέσκων ιστών, οι διαδικασίες ψύξης των οστικών δειγμάτων αποδείξαμε πως είναι οι καλύτερες για την συντήρησή τους και συστήνεται η επανάληψη της απόψυξης να αποφεύγεται για περισσότερες από τη μια φορά, έτσι ώστε να διατηρούνται πιο ακριβή τα αποτελέσματα και οι πληροφορίες που προκύπτουν από τα δείγματα. Χρήσιμη κρίνεται και η εμβάπτιση σε PBS για την ενυδάτωση των δειγμάτων και την επαναφορά τους σε στάδιο παρόμοιο με το αρχικό.

Μελλοντικός στόχος είναι η επέκταση της έρευνας και η μελέτη και άλλων παραμέτρων ποιότητας των οστών, όπως είναι η κρυσταλλικότητα και η ωριμότητα του κολλαγόνου. Η εφαρμογή των μεθόδων αποθήκευσης σε οστικά δείγματα που παρουσιάζουν παθογένεια θα ήταν μια ενδιαφέρουσα επιλογή με σκοπό τη σύγκριση των υγιών και μη δειγμάτων και τη χρήση της φασματοσκοπίας Raman ως διαγνωστικό εργαλείο. Τέλος, η σύγκριση των μετρήσεων Raman με διαφορετικές τεχνικές όπως φασματοσκοπία υπερύθρου (IR) και περίθλαση ακτίνων Χ.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ – ΜΕΡΟΣ (Β)

- [1] M. Wang, C. Laurencin, X. Yu, "Encyclopedia of Biomedical Engineering", vol. I, Elsevier, 2019
- [2] M. Raghavan, N. D. Sahar, R. H. Wilson, M.A. Mycek, N. Pleshko, D. H. Kohn, M. D. Morris, "Quantitative polarized Raman spectroscopy in highly turbid bone tissue", *Journal of Biomedical Optics*, vol. 15, 2010
- [3] Imke A.K. Fiedler, M. Casanova, T. Keplinger, B. Busse, R. Müller, "Effect of short-term formaldehyde fixation on Raman spectral parameters of bone quality ", *Journal of Biomedical Optics*, vol. 23, 2018
- [4] Μ. Βαρδάκη, "Μελέτη της οστεοαρθρίτιδας σε ανθρώπινες κεφαλές μηριαίου οστού με φασματοσκοπία micro- Raman", Πανεπιστήμιο Πατρών, 2013
- [5] N. Kourkoumelis, I. Balatsoukas, V. Moulia, A. Elka, G. Gaitanis, I. Bassukas, "Advances in the in Vivo Raman Spectroscopy of Malignant Skin Tumors Using Portable Instrumentation", *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 16, pp. 14554–14570, 2015
- [6] Sheppard, W. Fleetwood, "Interpolation", *Encyclopedia Britannica*, Cambridge University Press, pp. 706–710, 1911
- [7] E.T. Whittaker, G. Robinson, "The Calculus Of Observations: A treatise on Numerical Analysis", *Nature*, vol. 114, pp. 377-378, 1924
- [8] C. G. Ryan, E. Clayton, W. L. Griffin, S. H. Sie, D. R. Cousens, "SNIP, a statistics-sensitive background treatment for the quantitative analysis of PIXE spectra in geoscience applications", *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, vol 34, pp396–402, 1988
- [9] M. D. Morris, G. S. Mandair, "Raman Assessment of Bone Quality," *Clinical Orthopaedics and Related Research*, vol. 469, pp. 2160-2169, Aug 2011
- [10] G. S. Mandair, M.D. Morris, "Contributions of Raman spectroscopy to the understanding of bone strength", *BoneKey Reports*, vol. 4, p. 620, 2015
- [11] A. Awonusi, M. D. Morris, M. M. J. Tecklenburg, "Carbonate assignment and calibration in the raman spectrum of apatite", *Calcified Tissue International*, vol. 81, pp. 46-52, Jul 2007
- [12] J. Engel, H. P. Baechinger, " Structure stability and folding of collagen triple helix", *Topics in Current Chemistry: Collagen Primer in Structure, Processing and Assembly*, vol. 247, pp. 7-33, 2005

- [13] P. E. Timchenko, E. V. Timchenko, E. V. Pisareva, M. Yu. Vlasov, L. T. Volova, O. O. Frolov, A. R. Kalimullina, "Experimental studies of hydroxyapatite by Raman spectroscopy", *Journal of Optical Technology*, vol. 85, pp. 130-135, March 2018
- [14] B. R. McCreadie, M. D. Morris, T. C. Chen, D. S. Rao, W. F. Finney, E. Widjaja, et al., "Bone tissue compositional differences in women with and without osteoporotic fracture," *Bone*, vol. 39, pp. 1190-1195, Dec 2006
- [15] M. Kazanci, P. Roschger, E.P. Paschalis, K. Klaushofer, P. Fratzl, "Bone osteonal tissues by Raman spectral mapping: orientation - composition", *Journal of Structural Biology*, vol. 156, pp. 489–496, 2006
- [16] J. Shen, L. Fan, J. Yang, A.G. Shen, J.M. Hu, "A longitudinal Raman microspectroscopic study of osteoporosis induced by spinal cord injury", *Osteoporosis International*, vol. 21, pp. 81–87, 2010
- [17] Y.N. Yeni, J. Yerramshetty, O. Akkus, C. Pechey, C.M. Les, "Effect of fixation and embedding on Raman spectroscopic analysis of bone tissue", *Calcified Tissue International*, vol. 78, pp. 363–371, 2006
- [18] J.S. Yerramshetty, C. Lind, O. Akkus, "The compositional and physicochemical homogeneity of male femoral cortex increases after the sixth decade", *Bone*, vol. 39, pp. 1236–1243, 2006
- [19] S. Gourion-Arsiquaud, J.C. Burket, L.M. Havill, E. DiCarlo, S.B. Doty, R. Mendelsohn, M.C. van der Meulen, A.L. Boskey, "Spatial variation in osteonal bone properties relative to tissue and animal age", *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 24, pp. 1271–1281, 2009
- [20] M.V. Schulmerich, K.A. Dooley, T.M. Vanasse, S.A. Goldstein, M.D. Morris, "Subsurface and transcutaneous Raman spectroscopy and mapping using concentric illumination rings and collection with a circular fiber-optic array", *Applied Spectroscopy*, vol. 61, pp. 671–678, 2007
- [21] B. Wopenka, A. Kent, J.D. Pasteris, Y. Yoon, S. Thomopoulos, "The tendon-to-bone transition of the rotator cuff: a preliminary Raman spectroscopic study documenting the gradual mineralization across the insertion in rat tissue samples", *Applied Spectroscopy*, vol. 62, pp. 1285–1294, 2008
- [22] M.J. Silva, M.D. Brodt, B. Wopenka, S. Thomopoulos, D. Williams, M.H. Wassen, M. Ko, N. Kusano, R.A. Bank, "Decreased collagen organization and content are associated with reduced strength of demineralized and intact bone in the SAMP6 mouse", *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 21, pp. 78–88, 2006
- [23] D.H. Kohn, N.D. Sahar, J.M. Wallace, K. Golcuk, M.D. Morris, "Exercise alters mineral and matrix composition in the absence of adding new bone", *Cells Tissues Organs*, vol. 189, pp. 33-37, 2009
- [24] S. Gamsjaeger, K. Klaushofer, E. P. Paschalis, "Raman analysis of proteoglycans simultaneously in bone and cartilage", *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 45, pp. 794–800, 2014
- [25] S. Gamsjaeger, A. Masic, P. Roschger, M. Kazanci, J. W. C. Dunlop, K. Klaushofer, P. Fratzl, "Cortical bone composition and orientation as a function of animal and tissue age in mice by Raman spectroscopy", *Bone*, vol. 47, p. 392, (2010)

- [26] A. J. Makowski, C. A. Patil, A. Mahadevan-Jansen, J. S. Nyman, "Polarization control of Raman spectroscopy optimizes the assessment of bone tissue ", *Journal of Biomedical Optics*, vol. 18, 2013
- [27] Y. Takahashi, T. Shishido, K. Yamamoto, Y. Sawaji, J. Nishida, G. Pezzotti, "Do formalin fixation and freeze-thaw affect near-infrared Raman spectroscopy of cartilaginous tissue? A preliminary ex vivo analysis of native human articular cartilage", *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 46, pp. 1166-1172, 2015
- [28] E. A. Taylor, E. Donnelly, "Raman and Fourier transform infrared imaging for characterization of bone material properties", *Bone*, vol. 139, 2020
- [29] G. Penel, G. Leroy, C. Rey, E. Bres, "MicroRaman spectral study of the PO₄ and CO₃ vibrational modes in synthetic and biological apatites", *Calcified Tissue International*, vol. 63, pp. 475–481, 1998
- [30] T. Pascart, B. Cortet, C. Olejnik, J. Paccou, H. Migaud, A. Cotten, G. Falgayrac, "Bone Samples Extracted from Embalmed Subjects Are Not Appropriate for the Assessment of Bone Quality at the Molecular Level Using Raman Spectroscopy", *Analytical Chemistry*, vol. 88, pp. 2777–2783, 2016
- [31] A. Krajewski, M. Mazzocchi, P.L. Buldini, A. Ravaglioli, A. Tinti, P. Taddei, C. Fagnano, "Synthesis of carbonated hydroxyapatites: efficiency of the substitution and critical evaluation of analytical methods", *Journal of Molecular Structure*, vol. 744, pp. 221–228, 2005
- [31] Z. Huang, A. McWilliams, S. Lam, J. English, D. McLean, H. Lui, H. Zeng, "Effect of formalin fixation on the near-infrared Raman spectroscopy of normal and cancerous human bronchial tissues", *International Journal of Oncology*, vol. 23, pp. 649-655, 2003
- [32] A. V Mikhonin, S. V Bykov, N. S. Myshakina, S. A. Asher, "Peptide Secondary Structure Folding Reaction Coordinate: Correlation between UV Raman Amide III Frequency, Ψ Ramachandran Angle, and Hydrogen Bonding", *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 110, pp. 1928–1943, 2006
- [33] P. E. Timchenko, E. V. Timchenko, E. V. Pisareva, M. Y. Vlasov, L. T. Volova, O. O. Frolov, A. R. Kalimullina, "Experimental studies of hydroxyapatite by Raman spectroscopy", *Journal of Optical Technology*, vol. 85, p. 130, 2018
- [34] N. L. Pleshko, A. L. Boskey, R. Mendelsohn, "An FT-IR microscopic investigation of the effects of tissue preservation on bone", *Calcified Tissue International*, vol. 51, pp. 72–77, 1992

- [35] J.D. P. McElderry, M. R. Kole, M. D. Morris, "Repeated freeze-thawing of bone tissue affects Raman bone quality measurements", *Journal of Biomedical Optics* vol. 16, July 2011
- [36] D.G.A. Nelson, J.D.B. Featherstone, "Preparation, analysis, and characterization of carbonated apatites", *Calcified Tissue International*, vol. 34, 1982
- [37] M. Markovic, M.S. Tung, B.O. Fowler, J.P. Cline, "Certificate of analysis, standard reference material 2910, calcium hydroxyapatite", National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, 1997
- [38] G. Penel, C. Delfosse, M. Descamps, G. Leroy, "Composition of bone and apatitic biomaterials as revealed by intravital Raman microspectroscopy", *Bone*, vol. 36, pp. 893–901, 2005
- [39] C. N. Nielsen Marsh, A. M Gernaey, G. Turner-Walker, R. E. M. Hedges, "The chemical degradation of bone", Greenwich Medical Media, Jan 2000