

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΡΕΥΝΑΣ ΠΑΘΗΣΕΩΝ ΜΥΟΣΚΕΛΕΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

«Θ. ΓΑΡΟΦΑΛΙΔΗΣ»

ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Κ. ΙΣΜΗΝΗ ΔΟΝΤΑ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΤΟΥ ΚΡΑΣΙΟΥ ΣΤΗΝ ΠΡΟΛΗΨΗ
ΤΗΣ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗΣ ΣΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΤΟΥ ΘΗΛΕΟΣ
ΩΘΗΚΕΚΤΟΜΗΜΕΝΟΥ ΕΠΙΜΥΟΣ**

**ΧΡΙΣΤΙΝΑ Χ. ΠΑΣΑΛΗ
ΝΟΣΗΛΕΥΤΡΙΑ PGDip(ED), BBA(c), MSc, MSHCM**



ΑΘΗΝΑ, 2019

Ημερολόγιο εκπόνησης

Ημερομηνία κατάθεσης αίτησης εκπόνησης διδακτορικής διατριβής: 08/07/2011

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής: 14/11/2011

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 02/07/12

Ημερομηνία ορισμού Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής: 18/12/2018

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

1. Καθηγήτρια κ. Ισμήνη Δοντά (Επιβλέπον μέλος)
Κτηνιατρικής – Πειραματικής Χειρουργικής Έρευνας,
Ιατρική Σχολή, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
2. Καθηγητής κ. Αλέξιος - Λέανδρος Σκαλτσούνης
Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων,
Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
3. Αναπληρωτής Καθηγητής κ. Νικόλαος Παπαϊωάννου
Εργαστήριο Έρευνας Παθήσεων Μυοσκελετικού Συστήματος,
Ιατρική Σχολή, Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών








Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

1. Καθηγήτρια κ. Ισμήνη Δοντά
2. Καθηγητής κ. Αλέξιος - Λέανδρος Σκαλτσούνης
3. Αναπληρωτής Καθηγητής κ. Νικόλαος Παπαϊωάννου
4. Καθηγήτρια κ. Σοφία Μητάκου
5. Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Ευανθία Κασσή
6. Αναπληρωτής Καθηγητής κ. Νεκτάριος Αληγιάννης
7. Επίκουρος Καθηγητής κ. Ιωάννης Τριανταφυλλόπουλος

Επί προεδρίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών υπό τον καθηγητή Πέτρο Σφηκάκη.

Η διδακτορική διατριβή έγινε αποδεκτή με βαθμό άριστα παμψηφεί.

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

 ΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ, ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ,
 ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝ
 ΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙ
 ΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ
 ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ ΗΓΗΣΑΣΘ
 ΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗ
 Ν ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΑΣΘΑΙ, Κ
 ΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ, Κ
 ΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΕΥΤΕΡΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝ
 ΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ,
 ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΘΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥ
 ΓΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ
 ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣ
 ΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝ
 ΤΟΣ, ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΛΟ
 ΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ, ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ, ΔΕ ΟΥΔΕΝΙ
 ΔΙΔΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΟΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟ
 ΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗ
 ΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ, ΕΙΡΞΕΙΝ.  ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ
 ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕΥ
 ΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥ
 ΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ.  ΑΓΝΩΣ Δ
 Ε ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝ
 ΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ.  ΟΥ ΤΕΜΕΛ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘ
 ΙΩΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ ΠΡ
 ΗΪΟΣ ΤΗΣΔΕ.  ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΩ,
 ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΟΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤ
 ΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΗΣ, Τ
 ΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΔΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥ
 ΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡ
 ΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ.  Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ,
 Η ΙΔΩ, Η ΔΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΚΑΤΑ Β
 ΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Δ ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ
 ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟ
 ΙΑΥΤΑ.  ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕ
 Δ ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘ
 ΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ Π
 ΔΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΔΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙ
 ΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΛΩ.

■

*«Η έγκρισις Διδακτορικής Διατριβής υπό την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου
Αθηνών δεν υποδηλοί αποδοχής των γνωμών του συγγραφέως»*

Κανονισμός Πανεπιστημίου Αθηνών, άρθρο 202, παρ.2, Νόμος 5343/1932

Αφιερώνεται

*στην μητέρα μου
που με έμαθε να θέτω υψηλούς στόχους*

στον Νικόλα, την Ειρήνη και τον Χρήστο

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Aν και μία διδακτορική διατριβή χαρακτηρίζεται ως μονογραφή, η πραγματοποίηση και ολοκλήρωσή της θα ήταν αδύνατη χωρίς την βοήθεια εκλεκτών και έμπειρων καθηγητών, συνεργατών και φίλων, προς τους οποίους αισθάνομαι την επιτακτική ανάγκη να εκφράσω τις βαθύτατες ευχαριστίες και την ευγνωμοσύνη μου.

Η παρούσα ερευνητική μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Έρευνας Παθήσεων Μυοσκελετικού Συστήματος «Θ. Γαροφαλίδης» της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας κ. Ισμήνης Δοντά. Θα ήθελα πρωτίστως να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στο επιβλέπον μέλος Καθηγήτρια κ. Ισμήνη Δοντά για την ανάθεση του θέματος της διατριβής, την εμπιστοσύνη στο πρόσωπό μου, την άπογη παρακολούθηση και την αποτελεσματική αρωγή της σε όποιο πρόβλημα προέκυπτε. Ως διευθύντρια του Εργαστηρίου Έρευνας Παθήσεων του Μυοσκελετικού Συστήματος «Θ. Γαροφαλίδης», οι πολύτιμες γνώσεις της στο αντικείμενο της και η υψηλή ποιότητα του εργαστηρίου του οποίου προΐσταται, εξασφάλισαν την αξιοπιστία και ποιότητα των σχετικών μετρήσεων. Είναι ο άνθρωπος που πίστεψε στις δυνατότητες μου και μου μετέδωσε την αγάπη της για την έρευνα. Η ψυχική της ευγένεια και γαλήνη με έκανε καλύτερο άνθρωπο. Μου δίδαξε πως μόνο με υπομονή και ηρεμία μπορεί κανείς να προοδεύσει στην έρευνα, αλλά και στην ζωή. Η εμπιστοσύνη που επέδειξε στο πρόσωπό μου ήταν όχι μόνο άκρως τιμητική αλλά και συγκινητική.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά το έτερο μέλος της τριμελούς επιτροπής, Καθηγητή κ. Αλέξιο - Λέανδρο Σκαλτσούνη για την ιδέα διερεύνησης της ευεργετικής επίδρασης των πολυφαινολών του κρασιού στην πρόληψη της οστεοπόρωσης, την

οικονομική υποστήριξη του προγράμματος και την αμέριστη επιστημονική του υποστήριξη σε όλα τα στάδια εκπόνησης της διατριβής.

Ιδιαίτερη μνεία θα ήθελα να κάνω στον Καθηγητή κ. Νικόλαο Παπαϊωάννου, για τη δυνατότητα εκπόνησης της διατριβής στο Εργαστήριο Έρευνας Παθήσεων του Μυοσκελετικού Συστήματος επί Διευθύνσεώς του, για την εμπιστοσύνη του στο πρόσωπό μου και την ηθική και επιστημονική του στήριξη καθ' όλη την διάρκεια της διατριβής.

Ασυγχώρητη παράλειψή μου θα ήταν να μην αναφερθώ στον Καθηγητή κ. Σταύρο Κουρκουλή, η επιστημονική του συμβολή του κατά την διάρκεια των μετρήσεων της μηχανικής αντοχής των οστών, ήταν καθοριστική. Ευχαριστώ θερμά την Καθηγήτρια κ. Σοφία Μητάκου για την βοήθεια της στην συγγραφή της αγγλόφωνης εργασίας, η παρουσία της ήταν αισθητή δίπλα μου, να με καθοδηγεί και να φωτίζει το δρόμο μου στα εύκολα και στα δύσκολα. Θερμές ευχαριστίες και στον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Νεκτάριο Αληγιάννη και την Δρα κ. Μαρία Μακροπούλου για την ανάλυση και παρασκευή του εκχυλίσματος.

Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου προς όλο το επιστημονικό και βοηθητικό προσωπικό του Εργαστηρίου Έρευνας Παθήσεων του Μυοσκελετικού Συστήματος «Θ. Γαροφαλίδης», το οποίο με την άριστα επαγγελματική του κατάρτιση και τεχνογνωσία κατέστησε την ολοκλήρωση των πειραμάτων εφικτή. Θερμές ευχαριστίες στον αγαπητό συνεργάτη και επιβλέπων κτηνίατρο των πειραμάτων, Δρα κ. Παύλο Λελόβα για την ουσιαστική συμβολή του κατά την διάρκεια των πειραμάτων.

Ευχαριστώ θερμά την συνερευνήτρια, συνάδελφο και αγαπημένη μου φίλη Δρα κ. Αναστασία Πατσάκη, με την οποία μοιράστηκα αμέτρητες ώρες εργαστηριακής δουλειάς, αντιξοότητες και προβλήματα.

Η ολοκλήρωση της διατριβής θα ήταν ανέφικτη χωρίς τη συνεισφορά ορισμένων ανθρώπων, των οποίων η συμβολή ήταν καθοριστική. Θα ήθελα, λοιπόν, να ευχαριστήσω από καρδιάς την κ. Βαλασία Νταϊφότη, καθηγήτρια αγγλικών και τον κ. Κωνσταντίνο Καλαθά, στατιστικό για την άριστη συνεργασία, την ψυχική υποστήριξη και την ανεκτίμητη βοήθεια που μου παρείχαν.

Εξχωριστά θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου για την απεριόριστη αγάπη τους και την αμέριστη συμπαράστασή τους στην πραγματοποίηση των ονείρων μου και τη θερμή τους υποστήριξη σε όλα μου τα βήματα. Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ και όλη μου την αγάπη, οφείλω στον σύζυγο μου Νίκο για την υπομονή, την κατανόηση και την στήριξή του σε κάθε μου εγχείρημα. Αφιερώνω το παρόν πόνημα στο νόημα της ζωής μου, την Ειρήνη και τον Χρήστο, με την ευχή να κυνηγούν τα όνειρά τους.

Χριστίνα Χ. Πασαλή

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

1. ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ημερομηνία Γεννήσεως: 31/5/1980

Τηλέφωνα επικοινωνίας: 6948041092

E-mail : cpassali@gmail.com

2. ΤΡΕΧΟΥΣΑ ΘΕΣΗ

- 15/1/2017-σήμερα: Επιτροπή Έρευνας και Συνεχιζόμενης Εκπαίδευσης στο Γ.Ν.Ε. Θριάσιο
- 11/1/2010-σήμερα: Νοσηλεύτρια στο Αιμοδυναμικό – Ηλεκτροφυσιολογικό Εργαστήριο στο Γ.Ν.Ε. Θριάσιο

3. ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- 26/1/2009-11/1/2010 Νοσηλεύτρια στην Μονάδα Εντατικής Θεραπείας Καρδιοπαθών στο Θριάσιο Νοσοκομείο
- 1/1/2006-8/8/2008 Υπεύθυνη Νοσηλεύτρια και Κλινική Εκπαιδευτρια Αιμοδυναμικό & Ηλεκτροφυσιολογικό και Αγγειογραφικό Εργαστήριο της Ευρωκλινικής Αθηνών
- 1/10/2003–31/12/2005 Νοσηλεύτρια στην Καρδιολογική– Καρδιοχειρουργική Κλινική – Μονάδα της Ευρωκλινικής Αθηνών

4. ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ - ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

A. Λύκειο

- 1996-1999: Ενιαίο Πολυκλαδικό Λύκειο Αιγάλεω, κλάδος Ιατρικών Εργαστηρίων με βαθμό 19^{12/13}.

Γ. Μεταπτυχιακές σπουδές

- 2018 **Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης «Διοίκηση Υπηρεσιών Υγείας»** με κατεύθυνση Διοίκηση Νοσηλευτικών Υπηρεσιών της Εθνικής Σχολής Δημόσιας Διοίκησης. (εκκρεμεί η παρουσίαση της διπλωματικής εργασίας).

- 2010 **Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης. «Καρδιοαναπνευστική Αναζωογόνηση».** του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών με βαθμό πτυχίου 9.42 «άριστα».

Δ. Διδακτορικές σπουδές

- 2018 **Υποψήφια Διδάκτωρ**
Εργαστήριο Έρευνας Παθήσεων του Μυοσκελετικού Συστήματος, Χειρουργικός Τομέας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστημίου Αθηνών.

Ε. Εκπαίδευση ενηλίκων

- 2017 Πιστοποίηση από τον Ε.Ο.Π.Π.Ε.Π στην Εκπαίδευση Ενηλίκων.
- 2012 **Μεταπτυχιακό Πιστοποιητικό Παιδαγωγικής και Διδακτικής Επάρκειας** του Ετήσιου Προγράμματος Παιδαγωγικής Κατάρτισης της Ανώτατης Σχολής Παιδαγωγικής και Τεχνολογικής Εκπαίδευσης με βαθμό πτυχίου «άριστα».

ΣΤ. Ειδική αγωγή

- 30/10-18/12/2018 Σεμινάριο «Νοσηλεύω στην Ελληνική Νοηματική Γλώσσα» διάρκειας 30 ωρών από το Κέντρο Εκπαίδευσης Νοηματικής Γλώσσας «Πολυχώρος Κιβωτός» και την Ένωση Νοσηλευτών Ελλάδος.
- 24/5/2018 Σεμινάριο εκμάθησης Τεχνικών Βλέποντος Οδηγού για άτομα με πρόβλημα όρασης από τον Πανελλήνιο Σύνδεσμο Τυφλών
- 2018 εκμάθηση του συστήματος γραφής και ανάγνωσης των ατόμων με οπτική αναπηρία Braille από το Κέντρο Εκπαίδευσης και Αποκατάστασης Τυφλών.

Ζ. Μεταπτυχιακές επιμορφώσεις

- 28/4/2018 Σεμινάριο Ανανηπτών ILS, European Resuscitation Council.
- 16/10/2017-11/12/2017 “Όψεις του Προσφυγικού Φαινομένου” από το Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο. Διάρκειας: 50 ώρες.
- 15/3/2014-6/4/2014 “Εκπαίδευση Εκπαιδευτών”, ΕΣΠΑ (2007-2013). Διάρκειας: 37 ώρες.
- 4/12/2013 Σεμινάριο ανανηπτών ILS Provider Course, European Resuscitation Council.

- 20/9/2013 ACLS Instructors Essentials for Health Providers, BLS Instructor Essentials και BLS for Health Providers της American Heart Association, Online Course.
- 24/9/2013 Σεμινάριο ανανηπτών BLS Providers for Health Providers της American Heart Association.
- 25/9/2013 Σεμινάριο εκπαιδευτών BLS Instructor της American Heart Association.
- 26/9/2013 Σεμινάριο εκπαιδευτών ACLS Instructor της American Heart Association.
- 3-4/6/2013 - Σεμινάριο «Εισαγωγή στο στατιστικό πακέτο IBM SPSS Statistics: Βασικά θέματα επεξεργασίας και ανάλυσης δεδομένων». Ε.Κ.Π.Α. Διάρκειας: 16 ώρες.
- 23/6/2009 Σεμινάριο ανανηπτών στην Επείγουσα Υποστήριξη της Ζωής στα Παιδιά (EPILS), European Resuscitation Council.
- 28/5/2009 Σεμινάριο ανανηπτών στην Άμεση και Εξειδικευμένη Υποστήριξη του Αεραγωγού στην καρδιακή Ανακοπή.
- 25/4/2009 Sudden Cardiac Death: A focus on the ACLS Guidelines, Department of Continuing Education, Harvard Medical School.
- 10-11/1/2009 Σεμινάριο εκπαιδευτών eACLS Instructor Course, American College of Emergency Physicians.
- 10-12/10/2008 Σεμινάριο ανανηπτών eACLS Provider Course, American College of Emergency Physicians.
- 3/6/2007 Σεμινάριο εκπαιδευτών BLS/AED Instructor Course, European Resuscitation Council.
- 10/12/2006 Σεμινάριο ανανηπτών BLS/AED Provider Course, European Resuscitation Council.
- 4/2/2004-12/5/2004 “Μετεκπαιδευτικά Μαθήματα Κλινικής Νοσηλευτικής” από το ΤΕΙ Αθηνών-Τμήμα Νοσηλευτικής Α και την Ευρωκλινική Αθηνών, (Διάρκειας 30 ωρών)

H. Γνώσεις Πληροφορικής

- 2018 σχεδιασμός, δημιουργία, πλατφόρμας διαδραστικής τηλεκπαίδευσης moodle και free open eclass για περίπου 150 εκπαιδευόμενους κατά τον πρώτο χρόνο λειτουργίας.
- 2017 Δημιουργία και διαχείριση εκπαιδευτικού site πλήρως προσβάσιμου σύμφωνα με τις Web Content Accessibility Guidelines (WCAG) 2.0 απαιτήσεις.
- Χρήση στατιστικού προγράμματος SPSS, Statgraphics
- 2007 Κάτοχος ECDL Core Certificate του Πανεπιστημίου του Cambridge

B. Προπτυχιακές σπουδές

- 2017-σήμερα: Οργάνωση και Διοίκηση Επιχειρήσεων της Σχολής Οικονομικών, Επιχειρηματικών και Διεθνών Σπουδών του Πανεπιστημίου Πειραιώς
- 2004: Άδεια ασκήσεως επαγγέλματος Νοσηλευτικής στην Ελλάδα.
- 2000-2004: Πτυχίο Νοσηλευτικής, Ανώτατου Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος Αθηνών. Βαθμός πτυχίου 7,88 (Λίαν καλώς)

Θ. Γνώσεις ξένων γλωσσών

- 2014 Proficiency (C2) In English BULATS του Πανεπιστημίου Cambridge.
- 1994 First Certificate (B2) In English του Πανεπιστημίου του Cambridge

5. ΣΥΓΓΡΑΦΙΚΟ ΕΡΓΟ

A. Συγγραφή κεφαλαίων σε ξενόγλωσσα βιβλία

- “In-Hospital Resuscitation: Association between Nurses CPR Training and Survival to Discharge” στο βιβλίο "Advances in Medicine and Biology. Volume 48", NOVA Publishers, 2012.

B. Συντακτική επιτροπή σε ξενόγλωσσα περιοδικά

- 11/2018- σήμερα Chief Editor - Clinical Journal of Nursing Care and Practice

Γ. Συντακτική επιτροπή σε ελληνικά περιοδικά

- 4/2016-σήμερα Συντακτική Επιτροπή του Περιοδικού “Σύγχρονος Νοσηλευτής”

Δ. Κριτής σε ξενόγλωσσα περιοδικά

- Merit Research Journal of Medicine and Medical Sciences
- BMC Medical Education.

E. Κριτής σε Ελληνικά περιοδικά

- Hellenic Journal of Nursing Science

ΣΤ. Ξενόγλωσσες δημοσιεύσεις σε περιοδικά με κρίση

- 2018. Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society. “Red wine polyphenols modulate bone loss in the ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis”. C. Passali, A. Patsaki, P. Lelovas, N. Aligiannis, M. Makropoulou, S. Kourkoulis, N. Papaioannou, S. Mitakou, A. L. Skaltsounis, I. Dontas. Accepted.
- 2018. Work Journal. “Work-related musculoskeletal disorders among Greek hospital nursing professionals; a cross - sectional observation study”. Passali C, Maniopoulou D., Apostolakis I., Varlamis I. Work, vol. 61, o. 3, pp. 489-498, 2018.
- 2017. Archives of Hellenic Medicine. “Dose-dependent effect of Amphimas pterocarpoides plant extract on bone loss in estrogen-deficient ovariectomized rats”. A. Patsaki, J. Tchoumchoua, C. Passali, P. Lelovas, S. Mitakou, N. Papaioannou, J. Mbanya, D. Njamen, M. Halabalaki, S. Kourkoulis, I. Dontas. Arch Hellen Med, 34(5), September-October 2017, 690-699.

- 2016. Medical and Aromatic Plants. “The Protective Effect of Amphimas pterocarpoides Plant Extract on Bone Mineral Density and Strength in Estrogen Deficient Ovariectomized Wistar Rats.” Patsaki Anastasia, Job Tchoumtchoua, Christina Passali, Lelovas Pavlos, Stavros Kourkoulis, Nikolaos Papaioannou, Jean-Claude Mbanya, Dieudonné Njamen, Sofia Mitakou, Maria Halabalaki, and Ismene Dontas. Med Aromat Plants (Los Angel) 5:269. doi: 10.4172/2167-0412.1000269
- 2012. European Journal of Emergency Nursing. “Evaluation of Greek high school teacher’s knowledge in basic life support, automated external defibrillation and foreign body airway obstruction.” Anastasia Patsaki, Theodoros Xanthos, Ioannis Pantazopoulos, Christina Passali, Lila Papadimitriou, Ismene Dontas. J Emerg Nurs. 2012 Mar;38(2):176-81. doi: 10.1016/j.jen.2010.09.002.
- 2011. Nursing Education in Practice. “Evaluation of nurses’ and doctors’ knowledge of basic & advanced life support resuscitation guidelines.” Christina Passali, Ioannis Pantazopoulos, Ismene Dontas, Anastasia Patsaki, Dimitris Barouxis, Georgios Troupis, Theodoros Xanthos. Nurse Educ Pract. 2011 Nov;11(6):365-9. doi: 10.1016/j.nepr.2011.03.010.

Z. Σύσταση Νοσηλευτικών πρωτοκόλλων

- 19/5/2015 Συμμετοχή στην επιτροπή εκπόνησης των νοσηλευτικών πρωτοκόλλων από την Ένωση Νοσηλευτών Ελλάδος, που κατατέθηκαν στην αρμόδια υπηρεσία του Υπουργείου Υγείας.

H. Δημοσιευμένα πρακτικά

- 2011. European Journal of Cardiovascular Nursing, April 2011 (Vol. 10 Supplement 1, Page S23), "Evaluating knowledge and attitudes of a sample of Greek high school teachers regarding cardiopulmonary resuscitation, automated external defibrillation, and foreign body airway obstruction. Are school nurses the key to improve survival after out of hospital cardiac arrest?". Patsaki Anastasia, Pantazopoulos Ioannis, Dontas Ismene, Passali Christine, Papadimitriou Lila, Xanthos Theodoros.
- 2007. European Journal of Cardiovascular Nursing , March 2007 (Vol. 6 Supplement, Page S34), "New therapeutic procedure of atrial fibrillation is the ablation of circumferential pulmonary veins: 3D mapping of the

electrophysiologic substrate using computed tomography pre-acquired image".

Christina Passali, Vassiliki-Maria Prossora, Christina Festeridou

H. Αρθρογραφία σε ελληνικά περιοδικά χωρίς κρίση

- 4/2018-σήμερα αρθρογραφία στην πλήρως προσβάσιμη, κοινωνική πύλη ενημέρωσης meallamatia.gr.
- 9/2015-σήμερα αρθρογραφία στο περιοδικό “Σύγχρονος Νοσηλευτής”.

6. ΒΡΑΒΕΙΑ - ΤΙΜΗΤΙΚΕΣ ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ

A. Τιμητική διάκριση

- 7-8/10/2016 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αναζωογόνησης και Αντιμετώπισης Επείγοντος Περιστατικού για την “Οργάνωση σε Πανελλήνια εμβέλεια του σεμιναρίου Βασικής Καρδιοαναπνευστικής Αναζωογόνησης σε άτομα με οπτική αναπηρία”.

B. Βραβεύσεις

- 13-14/1/2017 Καλύτερης Ελεύθερης Ανακοίνωση στο 29^ο Συνέδριο “Εξελίξεις στην Καρδιολογία” με την εξής εργασία: “Αντιμετώπιση του εμφράγματος στο αιμοδυναμικό”.
- 7-8/10/2016 Καλύτερης Ελεύθερης Ανακοίνωσης στο 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αναζωογόνησης και Αντιμετώπισης Επείγοντος Περιστατικού με την εξής εργασία: “Αξιολόγηση της διδασκαλίας νοσηλευτών στις δεξιότητες υποστήριξης της ζωής, βασισμένη σε αρχές μάθησης ενηλίκων”. Γ.Τσακίριδης, Ε.Γερακάρη, Ε.Μητρογιώργου, **Χ.Πασαλή**, Μ.Κωσταντώνη, Ε.Ρόκα
- 10-13/6/2013 Βραβείο καλύτερης Ελεύθερης Ανακοίνωσης στο 12th FELASA Secal Congress, Ισπανία. για την εργασία με τίτλο “Age related changes of physiological parameters in young adults rats: A non-invasive observational study”. Alexandros Zervas, Pavlos Lelovas, Anastasia Patsaki, **Christina Passali**, Antonios Galanos, Ismene Dontas,

7. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΓΟ

A. Συμμετοχή σε πειραματικά πρωτόκολλα

Στα πλαίσια της επιστημονικής μου συνεργασίας με το Εργαστήριο Έρευνας και Μυοσκελετικών Παθήσεων του Πανεπιστημίου Αθηνών συμμετέχω ενεργά στη δημιουργία και εκπόνηση ποικίλων πειραματικών, ερευνητικών πρωτοκόλλων. Αναλυτικά:

- 2008-σήμερα Κύρια Ερευνήτρια στο πειραματικό πρωτόκολλο "Μελέτη της δράσης των φαινολικών ενώσεων του κρασιού στην πρόληψη της οστεοπόρωσης στο πειραματικό πρότυπο του θήλεος ωθηκεκτομημένου επίμυος" και συμμετοχή σε 6 πειραματικά πρωτόκολλα για την μελέτη της επίδρασης του *Amphimas pterocarpoides*, του ιχθυελαίου, της ελιάς, της γλυκόριζας, της φάβας και της Ίριδας στην πρόληψη της οστεοπόρωσης στο πειραματικό πρότυπο του θήλεος ωθηκεκτομημένου επίμυος, σε συνεργασία με το Τμήμα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Φαρμακευτική Σχολή Ε.Κ.Π.Α. και το Τμήμα Εμβιομηχανικής, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείου (Υπεύθυνη Καθηγήτρια κ. Ι. Δοντά)

B. Διαλέξεις

- 31/10/2014-1/4/2014 2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιοαναπνευστικής Αναζωογόνησης και Αντιμετώπισης Επείγοντος Περιστατικού. "Η παρουσία των συγγενών στην Αναζωογόνηση".
- 14-16/5/2013 40^ο Πανελλήνιο Νοσηλευτικό Συνέδριο του Εθνικού Συνδέσμου Νοσηλευτών Ελλάδος. "Η χρήση της Ενδοοστικής Μεθόδου ως κατάλληλο εργαλείο στην Επείγουσα Νοσηλευτική Φροντίδα".

Γ. Εισηγήσεις

- 8-9/3/2019 CardioAthena 2019 Συνέδριο Καρδιαγγειακής Ιατρικής 2019 με την εισήγηση "Νοσηλευτική φροντίδα ασθενών με ενδοαορτική αντλία".
- 20/12/2018 Πρόγραμμα αγωγής υγείας στην Κοινότητα 2018-2019, με εισήγηση "Παθολογικά Νοσήματα"
- 8/11/2018 12^ο Πανελλήνιου Συνεδρίου της Ελληνική Εταιρείας Χειρουργών Θώρακος Καρδιάς και Αγγείων, με θέμα "Επιπλοκές στο Αιμοδυναμικό Εργαστήριο. Ο ρόλος της εκπαίδευσης στην αντιμετώπιση τους".

- 30-31/5/2018 2^η Διημερίδα Κοινωνικής Νοσηλευτικής - Δημόσιας Υγείας και Πρωτοβάθμιας Φροντίδας Υγείας με θέμα “Πρωτοβάθμια αντιμετώπιση της ανακοπής σε παιδιά και βρέφη”.
- 29-30/6/2018 1^η Διημερίδα Πρωτοβάθμιας Φροντίδας Υγείας και Κοινωνικής Νοσηλευτικής με θέμα “Αναζωογόνηση σε παιδιά και βρέφη στην Π.Φ.Υ.”.
- 27-30/4/2017 10^ο Πανελλήνιο & 9ο Πανευρωπαϊκό Επιστημονικό & Επαγγελματικό Νοσηλευτικό Συνέδριο με την εισήγηση «Εκπαίδευση παιδιών με οπτική αναπηρία στη βασική υποστήριξη της ζωής».
- 2-4/12/2016 17^ο Πανελλήνιο Νοσηλευτικό Συνέδριο με την εισήγηση «Σύγχρονη αντιμετώπιση του Εμφράγματος του Μυοκαρδίου κατά την οξεία φάση».
- 19-22/5/2016 9^ο Πανελλήνιο και 8ο Πανευρωπαϊκό Νοσηλευτικό Συνέδριο με την εισήγηση “Διεπιστημονική συνεργασία σε επείγοντα περιστατικά στο νοσοκομείο”.
- 7-10/5/2015 8^ο Πανελλήνιο και 7ο Πανευρωπαϊκό Επιστημονική και Επαγγελματικό Νοσηλευτικό Συνέδριο με την εισήγηση “Σύνδρομο μετά την αναζωογόνηση: από την έγκαιρη παρέμβαση στην μακροχρόνια επιβίωση”.
- 28-30/9/2012 6^ο Συμπόσιο Τομέα Επείγουσας και Εντατικής Νοσηλευτικής με την εισήγηση «Η δυνατότητα πρωτογενούς αγγειοπλαστικής: Ο ρόλος του Νοσηλευτή».
- 15-18/5/2012 39^ο Πανελλήνιο Νοσηλευτικό Συνέδριο με την εισήγηση «Νοσηλευτική Παρέμβαση μετά την Επιτυχή Αναζωογόνηση».
- 7-9/4/2011 15^ο State of the Art του Τομέα Επείγουσας και Εντατικής Νοσηλευτικής, με την εισήγηση «Αυτόματοι εξωτερικοί απινιδιστές στα γενικά τμήματα του νοσοκομείου». Πατσάκη Αναστασία, **Πασαλή Χριστίνα**.
- 17-19/6/2010 14^ο State of the Art του Τομέα Επείγουσας και Εντατικής Νοσηλευτικής με την εισήγηση «Διερεύνηση γνώσεων ιατρικού και νοσηλευτικού προσωπικού στην Καρδιοαναπνευστική Αναζωογόνηση».
- 2-4/4/2009 13^ο State of the Art του Τομέα Επείγουσας και Εντατικής Νοσηλευτικής με την εισήγηση «Προϋποθέσεις επιτυχίας εξειδικευμένης Καρδιοαναπνευστικής Αναζωογόνησης».
- 25-26/10/2007 13^ο Πανελλήνιο Καρδιολογικό Νοσηλευτικό Συνέδριο με την εισήγηση «Διατροφή».

Δ. Ελεύθερες ανακοινώσεις

- 13-15/12/2016 12^ο Πανελλήνιο Συνέδριο για τη Διοίκηση, τα Οικονομικά και τις Πολιτικές της Υγείας τομέα Οικονομικών της Υγείας με την εργασία: “Διαδικτυακή εκπαίδευση στη Νοσηλευτική”. **Χ.Πασαλή**, Ι.Αποστολάκης.
- 7-8/10/2016 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αναζωογόνησης και Αντιμετώπισης Επείγοντος Περιστατικού με την εξής εργασία: “Αξιολόγηση της διδασκαλίας νοσηλευτών στις δεξιότητες υποστήριξης της ζωής, βασισμένη σε αρχές μάθησης ενηλίκων. Γ.Τσακίριδης, Ε.Γερακάρη, Ε.Μητρογιώργου, **Χ.Πασαλή**, Μ.Κωσταντώνη, Ε.Ρόκα
- 19-22/5/2016 9^ο Πανελλήνιο και 8ο Πανευρωπαϊκό Νοσηλευτικό Συνέδριο με την εργασία “ Σχεδιασμός, Εφαρμογή και Αξιολόγηση Εκπαιδευτικού Προγράμματος Νοσηλευτικής Υπηρεσίας στην Καρδιοαναπνευστική Αναζωογόνηση”. **Χ.Πασαλή**, Γ.Τσακίριδης, Ε.Γερακάρη, Ε.Μητρογιώργου, Μ.Κωνσταντώνη, Ε.Ρόκα.
- 31/10/2014-1/4/2014 2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιοαναπνευστικής Αναζωογόνησης και Αντιμετώπισης Επείγοντος Περιστατικού με την εξής εργασία “Ποια είναι η καλύτερη θεραπεία της καρδιακής ανακοπής κατά την διάρκεια καρδιακού καθετηριασμού: Η στρατηγική του ενός αντί των τριών διαδοχικών απινιδισμών”, **Χ.Πασαλή**, Α.Πατσάκη, Η.Γεωργίου, Γ.Φούντα, Α.Βέρρα, Π.Παπακώστα, Ε.Ζιώβα.
- 10-13/6/2013 12th FELASA Secal Congress, στην Ισπανία για την εργασία με τίτλο “Age related changes of physiological parameters in young adults rats: A noninvasive observational study”. Alexandros Zervas, Pavlos Lelovas, Anastasia Patsaki, **Christina Passali**, Antonios Galanos, Ismene Dontas, για την εργασία με τίτλο “Age related changes of physiological parameters in young adults rats: A noninvasive observational study”.
- 1-2/11/2012 18^ο Πανελλήνιο Καρδιολογικό Νοσηλευτικό Συνέδριο με την εργασία “Ο ενδοαορτικός ασκός στη διαχείριση της οξείας καρδιακής ανεπάρκειας: συνέπειες για τη νοσηλευτική πρακτική” **Χ.Πασαλή**, Α.Πατσάκη.
- 2-3/11/2006 12^ο Πανελλήνιο Καρδιολογικό Νοσηλευτικό Συνέδριο με την εξής εργασία “Νέα εξειδικευμένη θεραπευτική μέθοδος της κολπικής μαρμαρυγής με τριδιάστατη χαρτογράφηση της καρδιάς και κατάλυση περιμετρικά των

πνευμονικών φλεβών-νοσηλευτική παρέμβαση". **Πασαλή Χριστίνα**, Γκούμας Νικόλαος, Φεστερίδου Χριστίνα.

E. Αναρτημένες ανακοινώσεις

- 10-13/5/2017 44^ο Πανελλήνιο Συνέδριο του Εθνικού Συνδέσμου Νοσηλευτών Ελλάδος με την εξής εργασία : "Αποτίμηση εκπαιδευτικού προγράμματος στην βασική καρδιοαναπνευστική αναζωογόνηση". Ε.Γερακάρη, Ε.Μητρογιώργου, **Χ.Πασαλή**, Γ.Τσακιρίδης, Μ.Κωνσταντώνη, Ε.Ρόκα.
- 13-16/6/2017 FELASA 2016 με την εργασία: "Effects of Red Wine Polyphenols on bone mechanical properties in ovariectomized rats". **C.Passali**, P.Lelovas, A.Patsaki, S.Kourkoulis, A.Galanos, M.Makropoulou, N.Aligiannis, N.Papaioannou, A.Skaltsounis, I.Dontas.
- 13-16/6/2017 FELASA 2016 με την εργασία: "Dose-dependent effects of Amphimas pterocarpoides plant extract on bone mineral density and strength in estrogen-deficient ovariectomized Wistar rats". A.Patsaki, J.Tschoumchoua, P.Lelovas, **C.Passali**, G.Kiniklis, S.Kourkoulis, N.Papaioannou, S.Mitakou, M.Halabalaki, I.Dontas.
- 22-23/9/2014 HSBLAS-ESLAV-ECLAM Meeting "Laboratory Animal Science and Medicine in Translational Research: from contribution to completion" με την εργασία: "The effect of natural polyphenol extract of red grape wine in peripheral blood pressure of the ovariectomized rat model of osteoporosis". **C.Passali**, M.Makropoulou, P.Lelovas, A.Patsaki, N.Aligiannis, A.Galanos, N.Papaioannou, A.Skaltsounis, I.Dontas.
- 22-23/9/2014 HSBLAS-ESLAV-ECLAM Meeting "Laboratory Animal Science and Medicine in Translational Research: from contribution to completion" με την εργασία: "Red Wine Polyphenols improve bone mineral density of ovariectomized rats". **C.Passali**, A.Patsaki, P.Lelovas, M.Makropoulou, N.Aligiannis, G.Kiniklis, A.Galanos, N.Papaioannou, A.Skaltsounis, I.Dontas
- 22-23/9/2014 HSBLAS-ESLAV-ECLAM Meeting "Laboratory Animal Science and Medicine in Translational Research: from contribution to completion" με την εργασία: "Changes in the biomechanical properties of the femur in the ovariectomized rat following administration with the extract from the plant Amphimas pterocarpoides". A.Patsaki, J.Tschoumchoua, S.Kourkoulis,

- P.Lelovas, **C.Passali**, A.Galanos, N.Papaioannou, M.Halabalaki, S.Mitakou, I.Dontas
- 22-23/9/2014 HSBLAS-ESLAV-ECLAM Meeting “Laboratory Animal Science and Medicine in Translational Research: from contribution to completion” με την εργασία: “Bone mineral density changes in the ovariectomized rat model of osteoporosis after administration of the extract from the plant *Amphimas pterocarpoides*”. A.Patsaki, **C.Passali**, P.Lelovas, J.Tschoumchoua, A.Galanos, G.Kiniklis, N.Papaioannou, S.Mitakou, M.Halabalaki, I.Dontas
 - 22-23/9/2014 HSBLAS-ESLAV-ECLAM Meeting “Laboratory Animal Science and Medicine in Translational Research: from contribution to completion” με την εργασία: “Age-related changes of haemodynamic parameters in adult female ovariectomized rats; the effect of olive extract administration”. A.Zervas, P.Lelovas, **C.Passali**, A.Patsaki, M.Makropoulou, A.Galanos, A.Skaltsounis, I.Dontas
 - 10-13/6/2013 12th FELASA SECAL Congress ‘Animal Research: Better Science from Fewer Animals’ με την εξής εργασία: “Beneficial effect of a plant extract (*Amphimas pterocarpoides*) administration on the ovariectomized rat model of osteoporosis”. I Dontas, P Lelovas, A Patsaki, **C Passali**, A Galanos, D Njamen, J Tchoumtchoua, AL Skaltsounis, M Halabalaki.
 - 10-13/6/2013 12th FELASA SECAL Congress ‘Animal Research: Better Science from Fewer Animals’ με την εξής εργασία: “Grape extract exerts a protective effect on bone loss of the ovariectomized rat model of osteoporosis”. P Lelovas, I Dontas, **C Passali**, A Patsaki, A Galanos, M Makropoulou, N Aligiannis, S.Mitakou.
 - 5-8/4/2012 12^o Πανελλήνιο Κτηνιατρικό Συνέδριο με την εξής εργασία : "Η Ευεργετική Επίδραση του Ιχθυελαίου σαν Συμπλήρωμα Διατροφής στα Λιπίδια του Αίματος και στους Ανοσολογικούς Δείκτες Θήλεων Επίμυων". A.Τριανταφύλλου, Κ.Βενετσάνου, Π.Λελόβας, **Χρ.Πασαλή**, Α.Πατσάκη, Θ.Ξάνθος, Ι.Δοντά.
 - 13-15/6/2011 3rd East Mediterranean International Council Symposium for Laboratory Animal Science στην Κωνσταντινούπολη, με την εξής εργασία: “Fish oil administration on plasma parameters in mature Female Rats” Dontas Ismene,

Venetsanou Kyriaki, Lelovas Pavlos, **Passali Christine**, Patsaki Anastasia, Triantaphylou Aggeliki.

- 13-15/6/2011 3rd East Mediterranean International Council Symposium for Laboratory Animal Science, με την εξής εργασία: “Preliminary results on the inflammatory- associated markers RANKL and TNF-a after ovariectomy” Dontas Ismene, Venetsanou Kyriaki, Lelovas Pavlos, Patsaki Anastasia, **Passali Christine**, Triantaphylou Aggeliki.
- 1-2/4/2011 11th Spring Annual Meeting on Cardiovascular Nursing 2011, με την εξής εργασία: “Evaluating knowledge and attitudes of a sample of Greek high school teachers regarding cardiopulmonary resuscitation, automated external defibrillation, and foreign body airway obstruction. Are school nurses the key to improve survival after out of hospital cardiac arrest?” Patsaki Anastasia, Pantazopoulos Ioannis, Dontas Ismene, **Passali Christine**, Papadimitriou Lila, Xanthos Theodoros.
- 14-17/6/2010 New Paradigms in Laboratory Animal Science 2010, με την εξής εργασία: “The effect of fish oil consumption on the rat model of osteoporosis” Dontas Ismene, Lelovas Pavlos, Patsaki Anastasia, **Passali Christine**, Xanthos Theodoros, Gallanos Antonis, Papaioannou Nikolaos, Triantaphylou Aggeliki.
- 4-6/12/2008 Ioannina Cardio-Vascular Education 2008, με την εξής εργασία: “The effectiveness of intravenous Amiodarone in Advanced Cardiac Life Support“. **Passali Christina**, Patsaki Anastasia, Xanthos Theodoros.
- 4-6/12/2008 Ioannina Cardio-Vascular Education 2008 με την εξής εργασία: «Importance of hands only (compression only) Cardio Respiratory Resuscitation: A call to action for bystander response” Patsaki Anastasia, **Passali Christina**, Xanthos Theodoros.
- 23-24/3/2007 7th Annual Spring Meeting on Cardiovascular Nursing στο Manchester με την εξής εργασία : “New therapeutic procedure of atrial fibrillation is the ablation of circumferencial pulmonary veins: 3D mapping of the electrophysiologic substrate using computed tomography pre-acquired image.” **Passali Christina**, Prossora Vassiliki Maria, Festeridou Christina.

ΣΤ. Διεπιστημονικές συζητήσεις

- 7-8/10/2016 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αναζωογόνησης και Αντιμετώπισης Επείγοντος Περιστατικού με θέμα “Προοπτικές ατόμων με ειδικές ανάγκες στο σεμινάριο BLS/AED”.

Η. Κλινικά φροντιστήρια

- 7-9/12/2018 19^ο Πανελλήνιο Νοσηλευτικό Συνέδριο, εκπαιδύτρια στο σεμινάριο Βασικής καρδιοαναπνευστικής αναζωογόνησης και χρήση αυτόματου εξωτερικού απινιδιστή.
- 27-30/4/2017 10^ο Πανελλήνιο & 9ο Πανευρωπαϊκό Επιστημονικό & Επαγγελματικό Νοσηλευτικό Συνέδριο. Συντονισμός και εισήγηση στο κλινικό φροντιστήριο “Υποδειγματική επιστημονική παρουσίαση. Μύθος ή πραγματικότητα;”.
- 27-30/4/2017 10^ο Πανελλήνιο & 9ο Πανευρωπαϊκό Επιστημονικό & Επαγγελματικό Νοσηλευτικό Συνέδριο, εισήγηση στο κλινικό φροντιστήριο “Βραδυαρρυθμία: ολοκληρωμένη αντιμετώπιση ασθενούς από το Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών μέχρι την αποκατάσταση”.
- 27-30/4/2017 10^ο Πανελλήνιο & 9ο Πανευρωπαϊκό Επιστημονικό & Επαγγελματικό Νοσηλευτικό Συνέδριο, εισήγηση στο σεμινάριο “Βασικής Υποστήριξης της Ζωής & Αυτόματου Εξωτερικού Απινιδιστή”.
- 2-4/12/2016 17^ο Πανελλήνιο Νοσηλευτικό Συνέδριο, συντονισμός και εισήγηση στο κλινικό φροντιστήριο “Τα μυστικά μιας καλής παρουσίασης”.
- 2-4/12/2016 17^ο Πανελλήνιο Νοσηλευτικό Συνέδριο, συμμετοχή με εισήγηση στο κλινικό φροντιστήριο “Ανάγνωση Βασικού Ηλεκτροκαρδιογραφήματος”.
- 7-8/10/2016 3^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αναζωογόνησης και Αντιμετώπισης Επείγοντος Περιστατικού, συμμετοχή με εισήγηση στο κλινικό φροντιστήριο “Βασικές αρχές ΗΚΓ”.
- 19-22/5/2016 9^ο Πανελλήνιο και 8ο Πανευρωπαϊκό Νοσηλευτικό Συνέδριο, συμμετοχή με εισήγηση στο σεμινάριο “Βασικής Υποστήριξης της Ζωής και Αυτόματου Εξωτερικού Απινιδισμού”.

Θ. *Networking sessions*

- 5-6/10/2018 4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αναζωογόνησης και Αντιμετώπισης Επείγοντος Περιστατικού, Συντονισμός στο networking Επείγουσας Νοσηλευτικής.

8. ΟΡΓΑΝΩΤΙΚΟ-ΔΙΟΙΚΗΤΙΚΟ ΕΡΓΟ

A. *Διοργάνωση συνεδρίων*

- 7-9/12/2018 Συντονιστική Οργανωτική Επιτροπή στο 19^ο Πανελλήνιο Νοσηλευτικό Συνέδριο.
- 5-6/10/2018 Οργανωτική Επιτροπή στο 4^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Αναζωογόνησης και Αντιμετώπισης Επείγοντος Περιστατικού.
- 29-30/6/2018 Οργανωτική επιτροπή στην 1^η Διημερίδα Πρωτοβάθμιας Φροντίδας Υγείας και Κοινωνικής Νοσηλευτικής.
- 18/4/2018 Ομάδα Εργασίας στην Επιστημονική Ημερίδα “Ισότητα στην πρόσβαση στις υπηρεσίες υγείας”.
- 27-30/4/2017 Στην Κεντρική Οργανωτική Επιτροπή του 10^{ου} Πανελληνίου & 9^{ου} Πανευρωπαϊκού Επιστημονικού & Επαγγελματικού Νοσηλευτικού Συνεδρίου.
- 2-4/12/2016 Στην Συντονιστική Οργανωτική Επιτροπή του 17^{ου} Πανελληνίου Νοσηλευτικού Συνεδρίου.
- 7-8/10/2016 Στην Οργανωτική του 3^{ου} Πανελληνίου Συνεδρίου Αναζωογόνησης και Αντιμετώπισης Επείγοντος Περιστατικού.
- 19-22/5/2016 Στην Κεντρική Οργανωτική Επιτροπή του 9^{ου} Πανελληνίου και 8ου Πανευρωπαϊκού Νοσηλευτικού Συνεδρίου.
- 31/10/2014 & 1/4/2014 Στην Οργανωτική του 2^{ου} Πανελληνίου Συνεδρίου Καρδιοαναπνευστικής Αναζωογόνησης και Αντιμετώπισης Επείγοντος Περιστατικού.
- 1/4/2012 Στην Οργανωτική Επιτροπή του 1^{ου} Συνεδρίου Καρδιοαναπνευστικής Αναζωογόνησης.

B. *Επιστημονική επιτροπή*

- 7-9/6/2018 13^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσηλευτών Νεφρολογίας
- 24/4/2018 Διεπιστημονική Ημερίδα “Προκλήσεις στην προαγωγή ενός ασφαλούς και υγιεινού εργασιακού περιβάλλοντος”
- 26/1/2018 Ημερίδα “Δυσεπίλυτα Προβλήματα στον Βαρέως Πάσχοντα”

- 11-13/12/2015 16^ο Πανελλήνιο Νοσηλευτικό Συνέδριο

Γ. Προεδρεία/συντονισμός σε συνέδρια

- 24/4/2018 Διεπιστημονική Ημερίδα “Προκλήσεις στην προαγωγή ενός ασφαλούς και υγιεινού εργασιακού περιβάλλοντος”. Συντονισμός στο στρογγυλό τραπέζι “Προκλήσεις στην προαγωγή ενός ασφαλούς και υγιεινού εργασιακού περιβάλλοντος”
- 27-30/4/2017 10^ο Πανελλήνιο & 9ο Πανευρωπαϊκό Επιστημονικό & Επαγγελματικό Νοσηλευτικό Συνέδριο, συντονισμός στις ελεύθερες ανακοινώσεις “Καρδιολογική/ Καρδιοχειρουργική Νοσηλευτική”.
- 16-18/2/2017 Πανελλήνια Σεμινάρια Ομάδων Εργασίας της Ελληνικής Καρδιολογικής Εταιρείας. Συντονισμός στο Νοσηλευτικό στρογγυλό τραπέζι “Ο ρόλος του νοσηλευτή σε μονάδα υπέρτασης & σε υπερτασικές γυναίκες που εγκυμονούν”
- 7-10/5/2015 8^ο Πανελλήνιο και 7^ο Πανευρωπαϊκό Επιστημονικό Νοσηλευτικό Συνέδριο. Συντονισμός στις Προφορικές Ανακοινώσεις “Καρδιολογική/ Καρδιοχειρουργική Νοσηλευτική II”.
- 31/10/2014 & 1/4/2014 2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιοαναπνευστικής Αναζωογόνησης και Αντιμετώπισης Επείγοντος Περιστατικού. Προεδρείο στις “Ελεύθερες ανακοινώσεις II”.

9. ΔΙΔΑΚΤΙΚΟ ΕΡΓΟ

A. Διδασκαλία σε Μεταπτυχιακό επίπεδο

- 2017-σήμερα Διδασκαλία στο Μ.Π.Σ. “Καρδιοαναπνευστική Αναζωογόνηση” με την εισήγηση “Υποστήριξη των συγγενών στην καθημερινή πράξη”

B. Διδασκαλία σε Μεταδευτεροβάθμιο επίπεδο

- 2012-2014 Εκπαιδύτρια Νοσηλευτικής, “Νοσηλευτική Τραυματολογία” στα Ι.Ε.Κ. Νίκαιας και Κερατσινίου του Υπουργείου Υγείας, (Διάρκεια: 150 ώρες)

Γ. Διδασκαλία σε Κέντρα Διά Βίου Μάθησης

- 2014-2015 Εκπαιδύτρια “Αγωγής Υγείας-Πρώτων Βοηθειών” στα Κ.Δ.Β.Μ. Κερατσινίου και Νίκαιας (Διάρκεια: 50 ώρες)

Δ. Εθελοντική διδασκαλία σε επαγγελματίες υγείας στην Επείγουσα Ιατρική και Νοσηλευτική

- Director και Instructor Trainer Σεμιναρίων Basic Life Support/Automated External Defibrillation European Resuscitation Council. Δεκέμβριος 2006 – σήμερα (12 χρόνια)
- Director και εκπαιδύτρια Advanced Life Support European Resuscitation Council. Απρίλιος 2014 – σήμερα (4 ½ χρόνια)
- Director και εκπαιδύτρια Σεμιναρίων Immediate Life Support European Resuscitation Council. Απρίλιος 2014 – σήμερα (4 ½ χρόνια)
- Director και εκπαιδύτρια eAdvanced Cardiac Life Support American College of Emergency Physicians. Ιανουάριος 2009 – σήμερα (9 χρόνια και 11 μήνες)
- Εκπαιδύτρια Advanced Cardiac Life Support American Heart Association. Σεπτέμβριος 2013 – σήμερα (5 χρόνια και 2 μήνες)
- Εκπαιδύτρια Basic Life Support American Heart Association. Σεπτέμβριος 2013 – σήμερα (5 χρόνια και 2 μήνες)
- Εκπαιδύτρια “ECG & Pharmacology” American Heart Association. Σεπτέμβριος 2013 – σήμερα (5 χρόνια και 2 μήνες)

E. Διδασκαλία σε άτομα με οπτική αναπηρία

- 2015-σήμερα: Διοργάνωση του πρώτου πανευρωπαϊκά πιστοποιημένου από το European Resuscitation Council σεμιναρίου Βασικής Υποστήριξης της Ζωής για

άτομα με οπτική αναπηρία. Έκτοτε έχουν πραγματοποιηθεί 3 σεμινάρια και έχουν εκπαιδευτεί συνολικά 24 άτομα με οπτική αναπηρία.

- 21/4/2018 Υπεύθυνη βιωματικού σεμιναρίου “Πρώτες βοήθειες για άτομα με οπτική αναπηρία” σε συνεργασία με την Επιτροπή Νεολαίας του Πανελληνίου Συνδέσμου Τυφλών, υπό την αιγίδα της Ελληνικής Εταιρείας Καρδιοαναπνευστικής Αναζωογόνησης.

ΣΤ. Εξ’ αποστάσεως διδασκαλία μέσω πλατφόρμας τηλεκπαίδευσης

- 1/1/2018-σήμερα Υπεύθυνη σχεδιασμού, ανάπτυξης και διαχείρισης της πλατφόρμας ασύγχρονης τηλεκπαίδευσης του σεμιναρίου “Πρώτες βοήθειες σε επείγουσες καταστάσεις στο σχολείο” συνολικής διάρκειας 25 ωρών για 140 εκπαιδευτικούς.

Ζ. Ενδονοσοκομειακή διδασκαλία

- 2016- 12/2018 Συμμετοχή στο Εκπαιδευτικό Πρόγραμμα της Νοσηλευτικής Υπηρεσίας του ΓΝΕ “Θριάσιο”, σαν εκπαιδευτρια/εισηγήτρια εκπαιδύοντας συνολικά 180 νοσηλευτές σε ενδονοσοκομειακά μαθήματα Επείγουσας Νοσηλευτικής Φροντίδας και σαν Υπεύθυνη Σεμιναρίων διοργανώνοντας πιστοποιημένα σεμινάρια Βασικής Υποστήριξης της Ζωής για 150 νοσηλευτές και Άμεσης Υποστήριξης της Ζωής για 30 νοσηλευτές.
- 2014-2016 Συμμετοχή με εισηγήσεις στα ενδονοσοκομειακά μαθήματα της Νοσηλευτικής Υπηρεσίας

Η. Διδασκαλία σε προγράμματα αγωγής υγείας στην κοινότητα

- 18/10/2018-20/6/2018 Συμμετοχή στο Πρόγραμμα Αγωγής Υγείας στην Κοινότητα 2018-2019, υπό την αιγίδα του Δήμου Πετρούπολης και της Ένωσης Νοσηλευτών Ελλάδος.
- 1/1/2018-σήμερα εκπαίδευση 100 εκπαιδευτικών της Δυτική Αττικής στις “Πρώτες βοήθειες σε επείγουσες καταστάσεις στο σχολείο” συνολικής διάρκειας 25 ωρών για 100 εκπαιδευτικούς της Πρωτοβάθμιας και Δευτεροβάθμιας Εκπαίδευσης των σχολείων της Δυτικής Αττικής σε συνεργασία τις Διευθύνσεις Πρωτοβάθμιας και Δευτεροβάθμιας Εκπαίδευσης Δυτικής Αττικής, δια των Υπευθύνων Αγωγής Υγείας και την Ενιαία Σχολική Επιτροπή Δευτεροβάθμιας Εκπαίδευσης του Δήμου Ελευσίνας.

- 1/3/2018-2/4/2018 εκπαίδευση 40 εκπαιδευτικών του Κέντρου Εκπαίδευσης και Αποκατάστασης Τυφλών στις “Πρώτες βοήθειες σε επείγουσες καταστάσεις στο σχολείο” συνολικής διάρκειας 25 ωρών, υπό την αιγίδα της Ελληνικής Εταιρείας Καρδιοαναπνευστικής Αναζωογόνησης.

H. Μητρώα εκπαιδευτών

- 19/9/2017-σήμερα Μητρώο Κύριου Διδακτικού Προσωπικού του Εθνικού Κέντρου Δημόσιας Διοίκησης και Αυτοδιοίκησης.

10. ΚΟΙΝΩΝΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

- ❖ Διοργάνωση του σεμιναρίων Βασικής Υποστήριξης της Ζωής και Πρώτων Βοηθειών προσαρμοσμένο σε άτομα με προβλήματα όρασης
- ❖ Διοργάνωση σεμιναρίων Πρώτων Βοηθειών και Βασικής Υποστήριξης της Ζωής σε μαθητές, δασκάλους και καθηγητές
- ❖ Συμμετοχή σε προγράμματα Αγωγής Υγείας στην Κοινότητα.
- ❖ Συμμετοχή στην δράση αξιολόγησης προσβασιμότητας του Τμήματος Πληροφορικής του Πανεπιστημίου Πειραιώς.

11. ΑΛΛΕΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ-ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΑ

Μέλος :

- της Επιτροπής Διασφάλισης Ποιότητας και Εκπαίδευσης της Ελληνικής Εταιρείας Καρδιοαναπνευστικής Αναζωογόνησης
- του Δ.Σ. του Πρωτοβάθμιου Σωματείου της Πανελλήνιας Συνδικαλιστικής Νοσηλευτικής Ομοσπονδίας ΕΣΥ.
- Εθελόντρια της A.M.K.E. Career Sign - εταιρεία συμβουλευτικής σταδιοδρομίας σε άτομα με αναπηρία.
- της Ένωσης Νοσηλευτών Ελλάδος
- του European Resuscitation Council
- της American Heart Association

12. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

A. Ξενόγλωσσες δημοσιεύσεις

- 2018. Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society. “Red wine polyphenols modulate bone loss in the ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis”. **C. Passali**, A. Patsaki, P. Lelovas, N. Aligiannis, M. Makropoulou, S. Kourkoulis, N. Papaioannou, S. Mitakou, A. L. Skaltsounis, I. Dontas. Accepted.

B. Βραβείο

- 10-13/6/2013 12th FELASA Secal Congress, στην Ισπανία για την εργασία με τίτλο “Age related changes of physiological parameters in young adults rats: A non-invasive observational study”. Alexandros Zervas, Pavlos Lelovas, Anastasia Patsaki, **Christina Passali**, Antonios Galanos, Ismene Dontas, για την εργασία με τίτλο “Age related changes of physiological parameters in young adults rats: A non-invasive observational study”.

Γ. Αναρτημένες ανακοινώσεις σε διεθνή συνέδρια

- 13-16/6/2017 Αναρτημένη ανακοίνωση στο FELASA 2016 που πραγματοποιήθηκε στις Βρυξέλλες με την εργασία: “Effects of Red Wine Polyphenols on bone mechanical properties in ovariectomized rats”. **C.Passali**, P.Lelovas, A.Patsaki, S.Kourkoulis, A.Galanos, M.Makropoulou, N.Aligiannis, N.Papaioannou, A.Skaltsounis, I.Dontas.
- 22-23/9/2014 Αναρτημένη ανακοίνωση στο HSBLAS-ESLAV-ECLAM Meeting “Laboratory Animal Science and Medicine in Translational Research: from contribution to completion” που πραγματοποιήθηκε στην Αθينا, με την εργασία: “The effect of natural polyphenol extract of red grape wine in peripheral blood pressure of the ovariectomized rat model of osteoporosis”. **C.Passali**, M.Makropoulou, P.Lelovas, A.Patsaki, N.Aligiannis, A.Galanos, N.Papaioannou, A.Skaltsounis, I.Dontas.
- 22-23/9/2014 Αναρτημένη ανακοίνωση στο HSBLAS-ESLAV-ECLAM Meeting “Laboratory Animal Science and Medicine in Translational Research: from contribution to completion” που πραγματοποιήθηκε στην Αθينا, με την εργασία:

“Red Wine Polyphenols improve bone mineral density of ovariectomized rats”.

C.Passali, A.Patsaki, P.Lelovas, M.Makropoulou, N.Aligiannis, G.Kiniklis, A.Galanos, N.Papaioannou, A.Skaltsounis, I.Dontas.

- 10-13/6/2013 Αναρτημένη ανακοίνωση στο 12th FELASA SECAL Congress ‘Animal Research: Better Science from Fewer Animals’ που πραγματοποιήθηκε στην Βαρκελώνη, με την εξής εργασία: “Grape extract exerts a protective effect on bone loss of the ovariectomized rat model of osteoporosis”. P Lelovas, I Dontas, **C Passali**, A Patsaki, A Galanos, M Makropoulou, N Aligiannis, S.Mitakou.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	6
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	9
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	31
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο	34
ΟΣΤΙΤΗΣ ΙΣΤΟΣ ΚΑΙ ΟΣΤΙΚΟΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ	34
1.1. Φυσιολογία οστίτη ιστού	34
1.2 Φυσιολογία της θεμέλιας ουσίας του οστίτη ιστού	38
1.3 Τύποι οστίτη ιστού	40
1.4 Ανακατασκευή του οστού	41
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο	43
ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗ	43
2.1 Γενικά	43
2.2 Μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση	44
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ^ο	46
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΑ ΜΕΣΑ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗΣ	46
3.1 Γενικά	46
3.2 Μη επεμβατικές μέθοδοι	47
3.2.1 Βιοχημικοί δείκτες	47
3.2.2 Πυκνομετρία	48
3.2.2.1 Απορροφησιμετρία διπλής ενεργειακής δέσμης φωτονίων DEXA	48
3.2.2.2 Αρχή της μεθόδου	48
3.2.2.3 Χρήση ακτίνων-Χ διπλής ενέργειας	51
3.2.2.5 Η χρήση της απορροφησιμετρίας σε Ζώα Εργαστηρίου	52
3.3 Επεμβατικές μέθοδοι	53
3.3.1 Ιστομορφομετρία	53
3.3.2 Μηχανική αντοχή	54
3.3.2.1 Προετοιμασία και διατήρηση παρασκευασμάτων	54
3.3.2.2 Μέθοδος μέτρησης της μηχανικής αντοχής των οστών	57
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ^ο	64
ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ	64
4.1 Πολυφαινόλες οίνου	64
4.2 Κατηγορίες πολυφαινολών	67
4.3 Φλαβονοειδή	68

4.3.1 Κατεχίνες	70
4.3.2 Προανθοκυανιδίνες	70
4.3.3 Ταννίνες	71
4.3.4 Ανθοκυάνες	72
4.3.5 Ανθοκυανιδίνες	72
4.4 Άλλα φαινολικά παράγωγα	73
4.4.1 Ρεσβερατρόλη	74
4.5 Αντιοξειδωτική / Προ-οξειδωτική δράση	76
4.6 Αντιοστεοπορωτική δράση	77
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ^ο	79
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ	79
5.1 Προτερήματα πειραματικών μελετών έναντι των κλινικών μελετών	79
5.2 Ηθικό πλαίσιο	80
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ^ο	83
ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΠΡΟΤΥΠΩΝ	83
6.1 Κριτήρια επιλογής ζωικού προτύπου για τη θεραπεία της οστεοπόρωσης	83
6.2 Πρότυπα πρόκλησης οστεοπόρωσης στον επίμου	85
6.3 Το πρότυπο του ωθηκεκτομημένου επίμου	87
6.4 Οστικές ανατομικές ομοιότητες μεταξύ επίμου - ανθρώπου	89
6.5 Οστικές ανατομικές διαφορές μεταξύ επίμου - ανθρώπου	90
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	92
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ^ο	92
ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	92
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 ^ο	94
ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ	94
8.1 Αρίθμηση επίμων	94
8.2 Ζώα εργαστηρίου	95
8.3 Πειραματικές ομάδες	96
8.4 Βάρος σώματος και πρόσληψη τροφής	97
8.5 Εκχύλισμα	98
8.5.1 Χορήγηση	98
8.5.2 Ανάλυση	99
8.6 Ωθηκεκτομή	101
8.7 Μέτρηση Οστικής Πυκνότητας	102
8.8 Ευθανασία, συλλογή δειγμάτων και εξέταση	104
8.9 Μέτρηση εμβιομηχανικών ιδιοτήτων	105

8.10 Στατιστική ανάλυση	108
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9 ^ο	110
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	110
9.1 Βάρος σώματος και βάρος της μήτρας	110
9.2 Απόλυτες τιμές οστικής πυκνότητας	111
9.3 Ποσοστά (%) μεταβολής της οστικής πυκνότητας	113
9.4 Εμβιομηχανικές ιδιότητες οστών	115
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10 ^ο	117
ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	117
10.1 Συζήτηση	117
10.2 Περιορισμοί	120
10.3 Συμπεράσματα	122
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	123
ABSTRACT	125
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	125

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

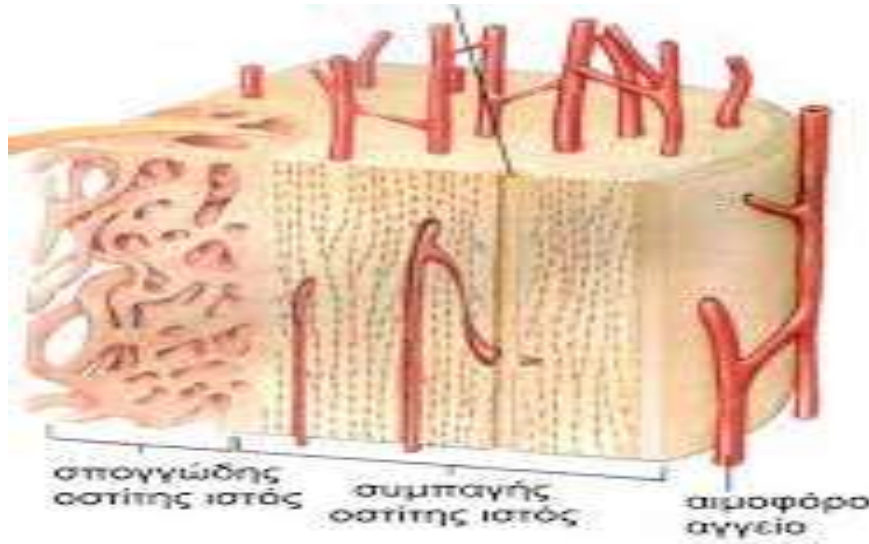
ΟΣΤΙΤΗΣ ΙΣΤΟΣ ΚΑΙ ΟΣΤΙΚΟΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ

1.1. Φυσιολογία οστίτη ιστού

Οι κύριες λειτουργίες των οστών αφορούν τη μηχανική στήριξη, την κίνηση του σώματος αλλά και την παροχή ιόντων Na^+ , Ca^{++} , $(\text{PO}_4)^{3-}$ και Mg^{++} , επιπλέον δε τα οστά συμμετέχουν και στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος.

Τα οστά αποτελούνται από οστίτη ιστό με οστεοκύτταρα και μεσοκυττάρια ουσία. Τα οστεοκύτταρα απαντούν σε κοιλότητες της μεσοκυττάριας ουσίας και παρουσιάζουν πολλές αποφυάδες. Οι αποφυάδες αυτές εκτείνονται εντός μικροσκοπικών αυλών της μεσοκυττάριας ουσίας και συνδέονται με την κυτταρική μεμβράνη των γειτονικών οστεοκυττάρων. Η μεσοκυττάρια ουσία αποτελείται κατά το 1/3 από οργανικά και κατά τα 2/3 από ανόργανα συστατικά. Το οργανικό τμήμα του οστού συνίσταται κυρίως από ινίδια κολλαγόνου, ενώ το ανόργανο από άλατα, κυρίως φωσφορικό ασβέστιο και φωσφορικό μαγνήσιο. Επίσης απαντούν ανθρακικά άλατα ασβεστίου, νατρίου και καλίου. Τα άλατα προσδίδουν σκληρότητα και ανθεκτικότητα στα οστά, ενώ τα ινίδια κολλαγόνου ελαστικότητα και ενισχύουν την αντοχή του οστού.

Ο οστίτης ιστός εμφανίζεται με δύο μορφές, τον συμπαγή και τον σπογγώδη. Στο συμπαγή οστίτη ιστό τα οστεοκύτταρα μαζί με μεσοκυττάρια ουσία διατάσσονται σε ομόκεντρες στιβάδες περίξ ενός αγωγού του σωλήνα του Havers, που μοιάζει με κομμένο κορμό δέντρου, σχηματίζοντας τον οστεώνα ή τα αμβέρσια συστήματα (**Εικόνα 1**).



Εικόνα 1: Οι σωλήνες του Havers (Google images).

Ο σπογγώδης οστίτης ιστός εμφανίζει κοιλότητες, τις μυελοκυψέλες, και αποτελείται επίσης από μεσοκυττάρια ουσία και οστεοκύτταρα. Στερείται οστεώνων (συστημάτων Havers) ενώ οι μυελοκυψέλες πληρούνται από τον ερυθρό μυελό των οστών (αιμοποιητικό όργανο). Η αραιή διάταξη των οστεοκυττάρων και της μεσοκυττάριας ουσίας έχει ως αποτέλεσμα το μειωμένο βάρος του οστού. Στο σπογγώδη ιστό η μεσοκυττάρια ουσία αποτελείται από τρισδιάστατα οστικά πέταλα τις οστεοδοκίδες.

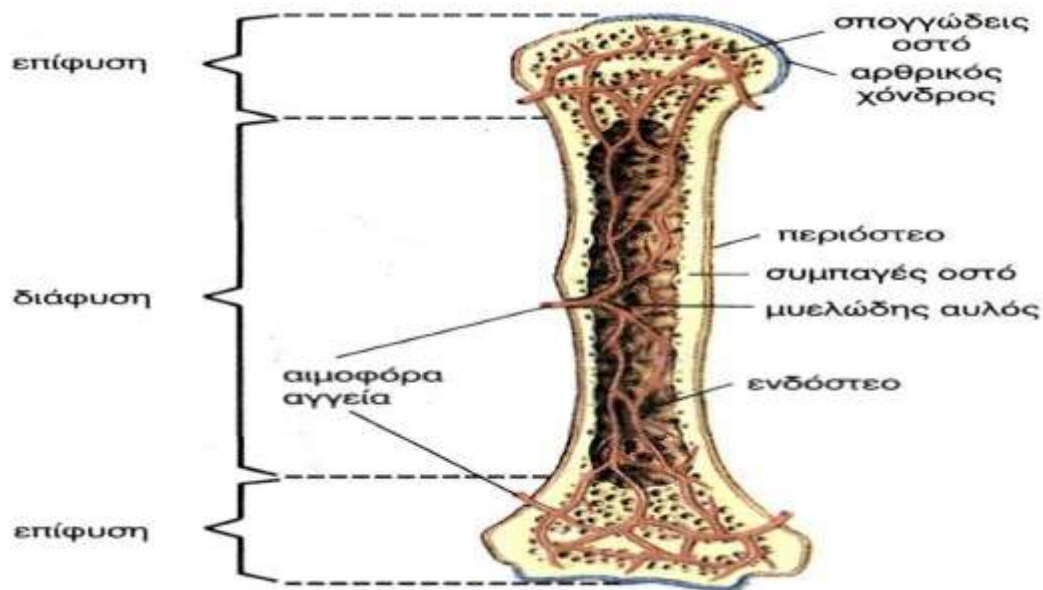
Τα οστά ανάλογα με τη μορφολογία τους διακρίνονται σε μακρά, πλατιά και βραχέα. Τα μακρά οστά απαντούν στα άκρα (βραχιόνιο, μηριαίο), ενώ τα πλατιά οστά σχηματίζουν την κρανιακή κοιλότητα (μετωπιαίο, ινιακό) και τη λεκάνη (ανώνυμα οστά). Τα βραχέα απαντούν στη σπονδυλική στήλη (σπόνδυλοι) και στα άνω και κάτω άκρα. Τα άκρα των επιμήκων οστών συνιστούν τις επιφύσεις, ενώ το μεταξύ τους κυλινδρικό τμήμα τη διάφυση. Η διάφυση των επιμήκων οστών είναι κοίλη και ο μυελώδης αυλός πληρούται από τον μυελό των οστών. Η διάφυση περιβάλλεται, τόσο στην εξωτερική όσο και στην εσωτερική της επιφάνεια, με το περίοστεο και το ενδόστεο

αντίστοιχα, με μεγάλο αριθμό οστεοβλαστών, που παίζουν ρόλο στην κατά πάχος αύξηση του οστού και στην αναγέννησή του επί κατάγματος. Μεταξύ των επιφύσεων και της διάφυσης στα μακρά οστά υπάρχουν οι συζευκτικοί χόνδροι που ευθύνονται για την κατά μήκος αύξηση των οστών. Είναι ενεργοί μέχρι την ήβη, μετά την παρουσία των ορμονών του φύλου οστεοποιούνται και η επιμήκης ανάπτυξη διακόπτεται.

Το περίστεο έχει πολλά αγγεία και νεύρα, συντελεί στη θρέψη του οστού, καθώς και στην πρόσφυση μυών και συνδέσμων. Η αποκόλλησή του σε μεγάλη έκταση προκαλεί νέκρωση του οστού.

Οι επιφύσεις αποτελούνται εξωτερικά από λεπτό στρώμα συμπαγούς οστίτη ιστού και εσωτερικά από σπογγώδη οστίτη ιστό. Οι επιφύσεις δεν περιβάλλονται από περίστεο αλλά από στρώμα χόνδρου, τον αρθρικό χόνδρο .

Τα βραχέα οστά καλύπτονται από περίστεο και έχουν κεντρικό τμήμα με σπογγώδη οστίτη ιστό, που περιβάλλεται από συμπαγή οστίτη ιστό. Τα πλατιά οστά καλύπτονται από περίστεο και αποτελούνται από δύο πλάκες συμπαγούς οστίτη ιστού, μεταξύ των οποίων υπάρχει σπογγώδης ιστός (**Εικόνα 2**).



Εικόνα 2: Μορφολογία οστού (Google images).

Ο μυελός των οστών είναι ειδικός τύπος μαλακού συνδετικού ιστού και διακρίνεται σε ερυθρό και ωχρό. Βρίσκεται στο μυελώδη αυλό των μακρών οστών και στις μυελοκυψέλες της σπογγώδους ουσίας. Ο ερυθρός μυελός των οστών είναι αιμοποιητικό όργανο. Αρχίζει να παράγει ερυθροκύτταρα στο τέλος της εμβρυϊκής ζωής. Μετά τη γέννηση, εκτός από ερυθροκύτταρα παράγει αιμοπετάλια και λευκοκύτταρα. Ο ερυθρός μυελός βρίσκεται σε όλα τα οστά του νεογνού, αλλά από την παιδική ηλικία αρχίζει προοδευτικά να συγκεντρώνει λίπος, γίνεται κίτρινος και χαρακτηρίζεται ως ωχρός μυελός. Στην ηλικία των 20 ετών, περίπου, όλος σχεδόν ο ερυθρός μυελός των διαφύσεων έχει αντικατασταθεί από ωχρό μυελό. Αντίθετα, στις μυελοκυψέλες των σπονδύλων, του στέρνου, των πλευρών, των οστών της λεκάνης, του κρανίου, κλπ. ο ερυθρός μυελός συνεχίζει την αιμοποίηση καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής.^{1,2}

Το οστόν συντίθεται από τους οστεοβλάστες, συντηρείται από τα οστεοκύτταρα και αποδομείται από τις οστεοκλάστες. Πρόκειται για μια σειρά κυττάρων ιδιάζουσας δυναμικότητας που προέρχονται από τον συνδετικό ιστό.

Οι οστεοβλάστες αποτελούν οστεοπαραγωγικά κύτταρα. Η λειτουργία των οστεοβλαστών αφορά: 1) την παραγωγή του οργανικού μέρους της θεμέλιας ουσίας του σκελετού (κολλαγόνο τύπου I, οστεονεκτίνη, οστεοκαλσίνη, γλυκοζαμινογλυκάνες οστεοποντίνη, οστική σιαλοπρωτεΐνη, βιτρονεκτίνη, φμπρονεκτίνη) η οποία οστεοποιούμενη περικλείει μερικούς οστεοβλάστες που μετατρέπονται σε οστεοκύτταρα, 2) την ενασβεστίωση/μετάλλωση του οστού, 3) τη ρύθμιση της γένεσης οστεοκλαστών μέσω παραγωγής των RANKL, OPG και M-CSF, 4) και τέλος αποτελούν πηγή αυξητικών παραγόντων, χημειοκινών και κυτοκινών που δρουν στα αιμοποιητικά κύτταρα και συμμετέχουν στην ανάπτυξη και διατήρηση του μυελού των οστών.

1.2 Φυσιολογία της θεμέλιας ουσίας του οστίτη ιστού

Το 90% της θεμέλιας ουσίας των οστών είναι κολλαγόνο τύπου I. Το κολλαγόνο τύπου I είναι πρωτεΐνη που παράγεται από τους οστεοβλάστες και αποτελείται από δύο α1 και μία α2 αλυσίδες. Το μόριο του κολλαγόνου έχει τρίκλωνη ελικοειδή μορφή μακριά, άκαμπτη όπου, τρεις πεπτιδικές αλυσίδες κολλαγόνου περιελίσσονται η μια γύρω από την άλλη σε σχοινοειδή έλικα. Με τη σειρά τους τα μόρια αυτά συναρμολογούνται σε πολυμερή γνωστά ως ινίδια κολλαγόνου και στη συνέχεια σε ακόμη παχύτερες ίνες κολλαγόνου. Τα κολλαγόνα ινίδια παράγονται από τους οστεοβλάστες και διαφέρουν από τα ινίδια άλλων ιστών δεδομένου ότι επιδέχονται εναπόθεση αλάτων Ca^{++} .

Στη θεμέλια ουσία του οστού καθιζάνουν κρυσταλλικά άλατα με ασβέστιο και φώσφορο. Το κυριότερο κρυσταλλικό άλας είναι ο υδροξυαπατίτης [Ca (PO) (OH)]. Οι κρύσταλλοι υδροξυαπατίτη προσκολλώνται στις κολλαγόνες ίνες και στις μεταξύ τους γλυκοπρωτεΐνες και πρωτεογλυκάνες. Στα οστικά άλατα περιλαμβάνονται επίσης άλατα μαγνησίου, νατρίου, καλίου και ανθρακικά, τα οποία δε, σχηματίζουν σαφείς κρυστάλλους και προσροφώνται στις επιφάνειες των κρυστάλλων του υδροξυαπατίτη. Οι οστεοβλάστες στη συνέχεια μετατρέπονται σε οστεοκύτταρα ή καλυπτήρια κύτταρα ή αποπίπτουν. Η απόπτωση των οστεοβλαστών επάγεται ή αναστέλλεται από διάφορους παράγοντες π.χ. γλυκορτικοειδή, οιστρογόνα, κυτοκίνες TNFα, IL-6 κλπ. Σήμερα οι οστεοβλάστες μπορεί να αποτελέσουν στόχο θεραπευτικών προσεγγίσεων με σκοπό τον περιορισμό της απόπτωσής τους και δυνατότητα παραγωγής νέου οστού.

Οι οστεοκλάστες είναι πολυπύρηννα γιγαντοκύτταρα και στοχεύουν στην απορρόφηση του οστίτη ιστού. Ορμονικοί παράγοντες και κυτοκίνες ρυθμίζουν την παραγωγή των οστεοκλαστών. Η διαφοροποίηση των οστεοκλαστών απαιτεί την στενή επαφή των αδιαφοροποίητων αιμοποιητικών κυττάρων του μυελού των οστών με τους οστεοβλάστες ή με τα κύτταρα του στρώματος του οστού. Βρίσκονται σε θέσεις, όπου γίνεται αποδόμηση του οστίτη ιστού και ενεργοποιούνται ύστερα από δράση της παραθορμόνης. Τα οστεοκύτταρα, φαίνεται να παίζουν ρόλο στη μεταφορά αλάτων από το εσωτερικό του οστού προς την επιφάνεια αύξησης.

Η μεσοκυττάρια ουσία του οστίτη ιστού συνίσταται από οργανική και ανόργανη φάση. Η οργανική φάση ή οστεοειδές αποτελείται από θεμέλια ουσία και κολλαγόνες ίνες σε δεσμίδες από οστέινη ουσία, ενώ η ανόργανη από άλατα. Ca⁺⁺. Η ανόργανη μοίρα των οστών συνίσταται κυρίως από φωσφορικό ασβέστιο (80- 90%) υπό μορφή υπερμικροσκοπικών κρυστάλλων υδροξυαπατίτη, ανθρακικό ασβέστιο (8-10%),

φθοριούχο και χλωριούχο ασβέστιο (0.5%), φωσφορικό μαγνήσιο (1-2%) και αλκαλικά άλατα (2%).

1.3 Τύποι οστίτη ιστού

Ανάλογα με τον τρόπο που διατάσσονται τα κολλαγόνα ινίδια στη μεσοκυττάρια ουσία διακρίνονται δύο μορφές οστίτη ιστού: ο πρωτογενής ή άωρος οστίτης ιστός και ο δευτερογενής ή πεταλιώδης. Ο πρωτογενής ή άωρος οστίτης ιστός είναι κυτταροβριθής με ευρείες στρογγυλές και ακανόνιστα διασπαρμένες οστικές κοιλότητες. Το κολλαγόνο σχηματίζει αδρές δεσμίδες που κατανέμονται τυχαία στο χώρο. Η οργανική μεσοκυττάρια ουσία είναι βασίφιλη, χρωματίζεται ανόμοια και έχει λιγότερο επιμεταλλωμένο περιεχόμενο από το δευτερογενή οστίτη ιστό.

Το άωρο οστόν σχηματίζεται στα εμβρυϊκά κέντρα οστεοποίησης και στην πρωτογενή σπογγώδη ουσία των αναπτυσσόμενων οστών. Είναι επίσης η πρώτη μορφή οστίτη ιστού που σχηματίζεται, στα σημεία επούλωσης των καταγμάτων, σε παθολογικές καταστάσεις, σε κάποιους όγκους οστών και στο φατνιακό οστόν. Το άωρο οστόν μπορεί να βρίσκεται με τη μορφή είτε του σπογγώδους είτε του φλοιώδους. Στα περισσότερα θηλαστικά είναι προσωρινός που αντικαθίσταται από δευτερογενή οστίτη ιστό.^{3,4}

Ο δευτερογενής ή πεταλιώδης οστίτης ιστός έχει λιγότερα κύτταρα σε σχέση με τον άωρο οστίτη ιστό. Οι οστικές του κοιλότητες είναι στενότερες και φακοειδείς ενώ διασπείρονται στη μεσοκυττάρια ουσία με οργανωμένο τρόπο. Οι ίνες του κολλαγόνου διατάσσονται ελικοειδώς στα διαδοχικά οστέινα πετάλια.⁴

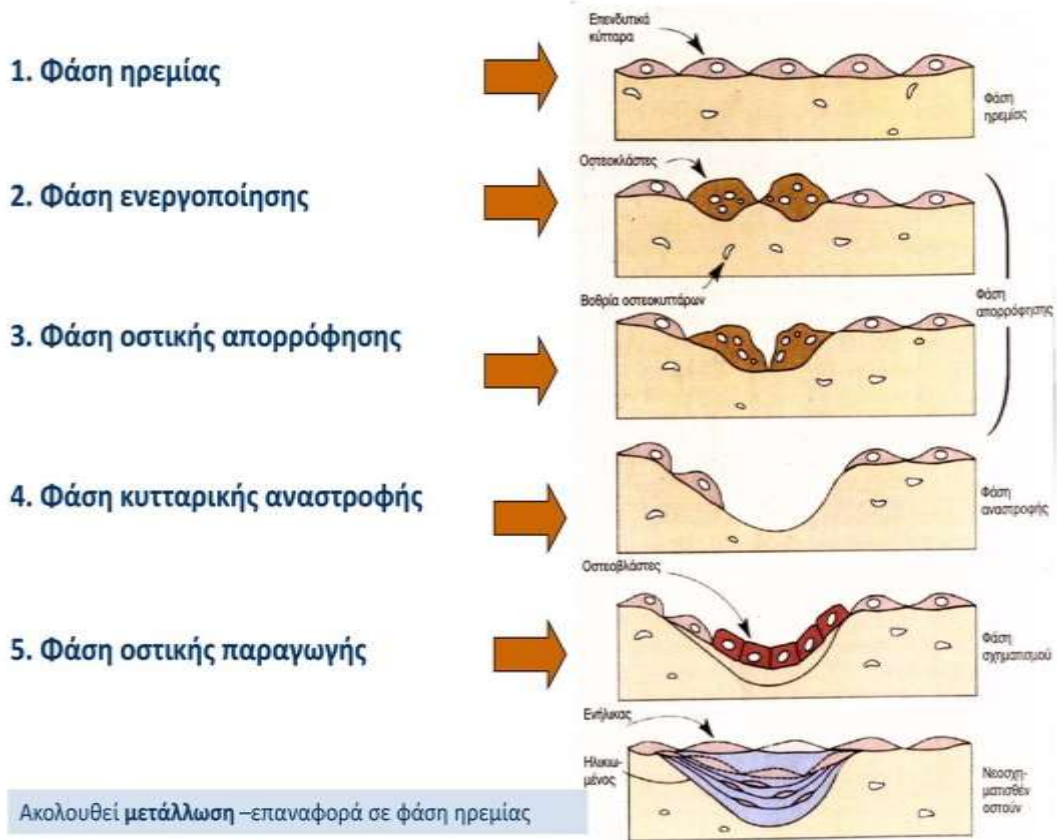
1.4 Ανακατασκευή του οστού

Όπως ήδη αναφέρθηκε τα οστά δεν είναι στατικά όργανα, συνεχώς ανακατασκευάζονται δηλαδή ανανεώνουν τις μικρομονάδες τους, με συνεχή ενεργοποίηση οστεοβλαστών και οστεοκλαστών. Έτσι επιδιορθώνονται μικροκατάγματα των οστικών μικρομονάδων.

Οστική ανακατασκευή είναι η διαδικασία ανανέωσης των μικρομονάδων των οστών, λαμβάνει χώρα σε μικρές περιοχές της επιφάνειας της φλοιώδους και μυελώδους μοίρας, γνωστές ως βασικές πολυκυτταρικές μονάδες (bone multicellular units - BMU), όπου αντικαθίσταται το παλιό οστόν από νέο, ρυθμίζεται η ομοιόσταση του ιονισμένου ασβεστίου του εξωκυττάριου χώρου και προσαρμόζεται ο σκελετός στις μηχανικές πιέσεις που του ασκούνται (**Εικόνα 3**). Η οστεολυτική διεργασία προηγείται της οστεοσυνθετικής. Η απορρόφηση συνιστά ταχεία διαδικασία που ολοκληρώνεται εντός ολίγων ημερών, ενώ η πλήρωση των οστικών κοιλοτήτων από τους οστεοβλάστες επέρχεται βραδέως (διάρκειας 3 - 6 μήνες). Παρόλα αυτά, η εναπόθεση και απορρόφηση επιτελούνται με τον ίδιο ρυθμό, με αποτέλεσμα η ολική μάζα του οστού να διατηρείται σταθερή. Ο σκελετός του ενηλίκου ανανεώνεται πλήρως κάθε 10 χρόνια ενώ ανακατασκευάζεται συνεχώς το 4% της ολικής οστικής επιφάνειας.⁵⁻⁷ Μέχρι την 3η δεκαετία το ισοζύγιο οστεοσύνθεσης είναι θετικό.

Σε παθολογικές καταστάσεις, όπου διαταράσσεται το ισοζύγιο οστεοβλαστικής –οστεοκλαστικής λειτουργίας και η οστική απορρόφηση δεν ακολουθείται από αντίστοιχη οστική παραγωγή, επέρχεται ως άμεση συνέπεια η σημαντική ελάττωση της οστικής πυκνότητας. Παράδειγμα μιας τέτοιας παθολογικής κατάστασης αποτελεί η μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση.

ΚΥΚΛΟΣ ΟΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ



Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου απορρόφησης και παραγωγής του οστού υπό φυσιολογικές συνθήκες (Google images).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗ

2.1 Γενικά

Η οστεοπόρωση είναι μια χρόνια συστηματική νόσος του μεταβολισμού των οστών, κατά την οποία παρατηρείται σταδιακή μείωση της οστικής πυκνότητας και διαταραχή της μικροαρχιτεκτονικής του οστίτη ιστού, με αποτέλεσμα την μειωμένη μηχανική αντοχή των οστών και τον αυξημένο κίνδυνο καταγμάτων.⁸⁻¹⁰ Το Διεθνές Ίδρυμα για την Οστεοπόρωση (International Osteoporosis Foundation) εκτιμά ότι 3.5 εκατομμύρια νέα κατάγματα, λόγω εύθραυστων οστών, συμβαίνουν στην Ευρωπαϊκή Ένωση ετησίως,¹¹ με την συνολική ετήσια εκτίμηση του κόστους της οστεοπόρωσης και των καταγμάτων, να φτάνει τα 37 δισεκατομμύρια ευρώ,¹¹ ενώ αναμένεται να αυξηθεί κατά 25% από το 2010 έως το 2025.¹² Οι ασθενείς με οστεοπόρωση διατρέχουν υψηλό κίνδυνο καταγμάτων που μπορεί να οδηγήσουν σε έντονους πόνους, αναπηρία ή ακόμη και σε αυξημένο κίνδυνο πρόωγου θανάτου.^{9,11,13}

Υπάρχουν δύο κύριες κατηγορίες οστεοπόρωσης, η πρωτογενής και η δευτερογενής οστεοπόρωση. Στην πρωτογενή οστεοπόρωση συμπεριλαμβάνεται η μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση (high-turnover osteoporosis), καθώς και η οστεοπόρωση της γήρανσης (low-turnover osteoporosis). Ως δευτερογενής οστεοπόρωση ορίζονται οι καταστάσεις εκείνες που σχετίζονται με οστεοπόρωση επαγόμενη από φαρμακευτικούς παράγοντες ή είναι απόρροια άλλων παθήσεων. Παρά ταύτα, καθώς η οστική πυκνότητα αποτελεί τον πιο καθοριστικό παράγοντα για μελλοντικό κάταγμα, είτε αυξηθεί η οστική απορρόφηση, είτε μειωθεί η οστική

παραγωγή, το αποτέλεσμα είναι η μείωση της οστικής μάζας και, συνεπώς, η αύξηση των πιθανοτήτων μελλοντικών καταγμάτων.^{14,15}

Η ανεπάρκεια των οιστρογόνων, κυρίως λόγω εμμηνόπαυσης είναι η συχνότερη αιτία οστεοπόρωσης στις γυναίκες. Η θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης (ΘΟΥ) έχει καθιερωθεί ως η μέθοδος εκλογής για την μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση.^{16,17} Η ΘΟΥ έχει αποδειχθεί ότι ελαττώνει τους δείκτες οστικού μεταβολισμού, αυξάνει την οστική πυκνότητα ελαττώνει τον αριθμό των σπονδυλικών και εξωσπονδυλικών καταγμάτων.^{16,18} Η ΘΟΥ επιβραδύνει σημαντικά τον ρυθμό θραύσης αυξάνοντας ταυτόχρονα τον κίνδυνο φλεβικής θρομβοεμβολής, στεφανιαίας νόσου και εγκεφαλικού επεισοδίου.¹⁹⁻²¹ Ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του μαστού αποδείχθηκε ιδιαίτερα αυξημένος με την συνδυασμένη χορήγηση οιστρογόνων και προγεστερόνης.²²⁻²⁵ Οι ερευνητές συμπέραναν πως η μακροχρόνια λήψη ΘΟΥ εμφανίζει περισσότερους κινδύνους από ότι οφέλη, συμπεριλαμβανομένης και της επίδρασης στην υγεία των οστών,^{21,26,27} με αποτέλεσμα οι ασθενείς να εμφανίζουν χαμηλά ποσοστά συμμόρφωσης στην θεραπεία.²⁸

2.2 Μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση

Ως έχει προαναφερθεί, απώλεια οστικής μάζας προκαλείται όταν οι διαδικασίες οστικής απορρόφησης και οστικής παραγωγής απορυθμιστούν, και η οστική ανακατασκευή πραγματοποιείται με μια δυσανάλογη αύξηση στην απορρόφηση οστού. Μια τέτοια εικόνα, ιδιαίτερα αυξημένης οστεοκλαστικής δράσης, εμφανίζεται στη μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση. Ο ακριβής μηχανισμός, με τον οποίο η απώλεια οιστρογόνων προκαλεί οστεοπόρωση δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος. Φαίνεται, όμως, πως ορισμένοι οστεοκλαστογενετικοί παράγοντες, όπως η ιντερλευκίνη 6 (IL-6)

και ο Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF) υπερεκφράζονται, οδηγώντας σε αυξημένη οστεοκλαστική γέννηση και λειτουργία.¹⁴

Σε κυτταρικό επίπεδο, τα οιστρογόνα δεσμεύονται σε πυρηνικούς υποδοχείς παρόντες τόσο σε οστεοβλάστες όσο και σε οστεοκλάστες.²⁹⁻³¹ Τα οιστρογόνα δρουν στους οστεοβλάστες προκαλώντας ένα φάσμα πολλών διαφορετικών αποτελεσμάτων, συμπεριλαμβανομένης της αυξημένης παραγωγής προ-κολλαγόνου και της αυξημένης έκφρασης αλκαλικής φωσφατάσης.³²⁻³⁵ Επιπλέον, τα οιστρογόνα επηρεάζουν τη σύνθεση συγκεκριμένων αυξητικών παραγόντων, καθώς επίσης και κυτοκινών.

Η απώλεια οιστρογόνων έχει ως αποτέλεσμα τον αυξημένο σχηματισμό οστεοκλαστών. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της αυξημένης φωσφορυλίωσης της πυρηνικής πρωτεΐνης Egr-1, γεγονός που προκαλεί την υπερέκφραση του M-CSF, παράγοντα οστεοκλαστικής δημιουργίας.³⁶ Επιπλέον, η παρουσία οιστρογόνων στο βιολογικό σύστημα, αναστέλλει τη μεταγραφή του γονιδίου, υπεύθυνου για τη σύνθεση του οστεοκλαστοπαραγωγικού μορίου Receptor Activator for NFκB-Ligand (RANKL).³⁷ Συνεπώς, επιπρόσθετα στη ρύθμιση μορίων όπως ο M-CSF, η οστεοκαλσίνη, η οστεονεκτίνη και η οστεοποντίνη, τα οιστρογόνα μπορούν άμεσα να καταστείλουν την επαγόμενη από το RANKL οστεοκλαστική διαφοροποίηση, και συνεπώς την οστική απορρόφηση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΑ ΜΕΣΑ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗΣ

3.1 Γενικά

Η διάγνωση της οστεοπόρωσης μπορεί να γίνει κλινικά, ραδιογραφικά, πυκνομετρικά, ενώ υπάρχει και μια πληθώρα βιοχημικών δεικτών του οστικού μεταβολισμού, που χρησιμοποιούνται συνεπικουρικά στις παραπάνω διαγνωστικές μεθόδους.

Η συχνότερη διαγνωστική μέθοδος είναι η απορροφησιμετρία διπλής ενεργειακής δέσμης φωτονίων-X (dual-energy X ray absorptiometry/DEXA). Ο εξοπλισμός DEXA επιτρέπει σάρωση της σπονδυλικής στήλης και του ισχίου, που γενικά θεωρούνται ως τα μεγαλύτερης σπουδαιότητας σημεία μέτρησης, καθώς είναι περιοχές συχνής εμφάνισης καταγμάτων που έχουν σαν αποτέλεσμα μεγάλη θνησιμότητα.³⁸⁻⁴⁰ Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη διέλευση μιας δέσμης φωτονίων από την υπό εξέταση περιοχή. Οι μετρήσεις αφορούν στο άθροισμα φλοιώδους και σπογγώδους οστού, με ποσοστό ακριβείας 1-3%,⁴⁰ ενώ τα επίπεδα ακτινοβολίας είναι πολύ χαμηλότερα από την κλασσική ακτινογραφία.

Εναλλακτική μέθοδο διάγνωσης της οστεοπόρωσης αποτελεί το ποσοτικό υπερηχογράφημα Quantitative Ultrasound (QUS), η οποία χρησιμοποιεί έναν ηχητικό παλμό που εξασθενεί μέσα στο οστό καθώς το σήμα διαδίδεται και απορροφάται από τα σπογγώδη τμήματα του οστού, ενώ, πιο εξελιγμένες μέθοδοι διάγνωσης της οστεοπόρωσης είναι η Lateral Vertebral Assessment (LVA), Magnetic Resonance Imaging (MRI) και micro-Computerized Tomography (μCT). Οι τεχνικές αυτές αναδεικνύουν την πραγματική μορφολογία του οστού, μέσω ψηφιακής εικόνας, ως ένα μέτρο εκτίμησης της ποιότητας του οστού.

3.2 Μη επεμβατικές μέθοδοι

3.2.1 Βιοχημικοί δείκτες

Η ανάλυση της ομοιοστασίας των μεταλλικών στοιχείων και των ιχνοστοιχείων βρίσκει ευκολότερη εφαρμογή στα Ζώα Εργαστηρίου απ' ότι στον άνθρωπο και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμησή των μεθόδων, *in vivo* και *ex vivo*. Τα μέταλλα (Ca, P, Mg) μπορούν να ανιχνευθούν στο αίμα και στα ούρα.⁴¹ Οι βιοχημικοί δείκτες οστικής εναλλαγής περιλαμβάνουν πεπτίδια που προέρχονται από τους οστεοβλάστες ή τους οστεοκλάστες και οργανικές ενώσεις που απελευθερώνονται κατά τη σύνθεση ή την αποδόμηση της θεμέλιας ουσίας. Οι δείκτες εκτιμώνται στο αίμα ή στα ούρα με τη χρήση διαφόρων μεθόδων όπως η υγρή χρωματογραφία, η ανοσοραδιομετρία, ο ανοσοφθορισμός, οι ανοσοενζυμικές μέθοδοι.⁴² Οι δείκτες οστικής εναλλαγής διακρίνονται σε δείκτες οστικής παραγωγής (αλκαλική φωσφατάση, οστεοκαλσίνη) και σε δείκτες οστικής απορρόφησης (πυριδινολίνη, ανθεκτική στο άλας του τρυγικού οξέος όξινη φωσφατάση, καρβοξυτελικό διασταυρούμενο τελοπεπτίδιο του κολλαγόνου τύπου I).⁴³ Η διαθεσιμότητα βιοχημικών δεικτών εξειδικευμένων για Ζώα Εργαστηρίου είναι περιορισμένη. Παρόλο που τα ανθρώπινα αντιδραστήρια για την ανίχνευση βιοχημικών δεικτών μπορούν να τροποποιηθούν για χρήση στα Ζώα Εργαστηρίου, αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την απώλεια της ειδικότητάς τους και της ευαισθησίας τους.¹⁵ Πρέπει να λαμβάνουμε υπόψη ότι οι πρωτεΐνες και τα πεπτίδια που ανιχνεύονται με αυτές τις μεθόδους διαφέρουν στη δομή τους μεταξύ των διαφόρων ζωικών ειδών. Εάν οι προαναφερθέντες δείκτες εκτιμώνται με τη χρήση ανοσοδοκιμών, τότε το αντίσωμα θα πρέπει να αναγνωρίζει επακριβώς τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη ή το πεπτίδιο του ζωικού είδους που αναλύεται.⁴² Άλλα μειονεκτήματα περιορίζουν περαιτέρω την αξία των βιοχημικών δεικτών στην έρευνα της οστεοπόρωσης. Πιο συγκεκριμένα, αντανακλούν αλλαγές που συμβαίνουν σε ολόκληρο το σκελετό, δεν

παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την οστική μάζα και αντοχή, καθώς επίσης δεν μπορούν να διαφοροποιήσουν εάν οι αλλαγές προέρχονται από το σπογγώδες ή το φλοιώδες οστόν. Στα Ζωικά Πρότυπα της οστεοπόρωσης οι αλλαγές είναι συνήθως εντοπισμένες σε ορισμένα σημεία του σκελετού και οι βιοχημικοί δείκτες αδυνατούν να μας πληροφορήσουν για αυτές τις αλλαγές.⁴⁴ Εξαιτίας αυτών των περιορισμών η χρήση των βιοχημικών δεικτών θα πρέπει να γίνεται με εξαιρετική προσοχή και θα πρέπει να είναι συμπληρωματική μιας άλλης μεθόδου που θα εκτιμά άμεσα την οστική μάζα και την εντοπισμένη οστική εναλλαγή.¹⁵ Στον άνθρωπο η συνδυασμένη χρήση των βιοχημικών δεικτών με την απορροφησιομετρία αυξάνει την ειδικότητα της πρόβλεψης για μελλοντικό κάταγμα χωρίς ταυτόχρονα να επηρεάζει αρνητικά την ευαισθησία.⁴⁴

3.2.2 Πυκνομετρία

3.2.2.1 Απορροφησιομετρία διπλής ενεργειακής δέσμης φωτονίων DEXA

Η μέθοδος της απορροφησιομετρίας διπλής δέσμης φωτονίων αναπτύχθηκε αρχικά για τη μελέτη των μεταλλικών αλάτων των οστών, με σκοπό την έγκαιρη διάγνωση και παρακολούθηση ασθενών με οστεοπόρωση. Η μέθοδος μπορεί επίσης να εφαρμοστεί και για τον προσδιορισμό της σύστασης των μαλακών ιστών του σώματος που συναντά η δέσμη των φωτονίων κατά τη διέλευσή από το ανθρώπινο σώμα.⁴⁵⁻⁵¹

3.2.2.2 Αρχή της μεθόδου

Η απορροφησιομετρία διπλής δέσμης φωτονίων είναι μια σχετικά πρόσφατα αναπτυσσόμενη μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό του σκελετού και των μαλακών ιστών του σώματος *in vivo*. Βασική αρχή της μεθόδου αποτελεί η διαφορετική, εκθετική εξασθένηση της προσπίπτουσας δέσμης φωτονίων σε δύο

ενεργειακά επίπεδα. Η επίλυση των δύο αλγεβρικών εξισώσεων που προκύπτουν επιτρέπει τον υπολογισμό των μεταλλικών αλάτων και των μαλακών ιστών του σώματος. Οι τελευταίοι, στη συνέχεια, μπορούν να διαχωριστούν σε λίπος και “μη-σκελετική άνευ λίπους μάζα”, με τη βοήθεια κατάλληλα βαθμονομημένου ομοιώματος (phantom).

Αναλυτικότερα, αν υποτεθεί ότι οι ιστοί του σώματος μπορούν να ταξινομηθούν αρχικά σε δύο διαμερίσματα a και b , τότε η εξασθένηση της δέσμης δίνεται από τις εξισώσεις:

$$I = I_o \exp(-\mu_a m_a - \mu_b m_b), \quad (1)$$

$$I' = I'_o \exp(-\mu'_a m_a - \mu'_b m_b), \quad (2)$$

όπου:

I, I' = ένταση διερχόμενης ακτινοβολίας για τις δύο ενέργειες αντίστοιχα,

I_o, I'_o = ένταση προσπίπτουσας ακτινοβολίας για τις δύο ενέργειες αντίστοιχα,

m_a, m_b = μάζα των διαμερισμάτων a, b αντίστοιχα (g/cm^2),

μ_a, μ'_a = μαζικός συντελεστής εξασθένησης για το διαμέρισμα a , στις δύο ενέργειες (cm^2/g),

μ_b, μ'_b = μαζικός συντελεστής εξασθένησης για το διαμέρισμα b , στις δύο ενέργειες (cm^2/g).

Οι εντάσεις της διχρωματικής δέσμης, καθώς και οι συντελεστές εξασθένησης μπορούν να μετρηθούν απευθείας. Είναι επομένως δυνατή η λύση του προηγούμενου συστήματος εξισώσεων (1 και 2) ως προς τις μάζες m_a και m_b των δύο διαμερισμάτων,

που στην προκειμένη περίπτωση είναι τα μεταλλικά άλατα και οι μαλακοί ιστοί αντίστοιχα.

Αξίζει εδώ να τονιστεί ότι η σύσταση των μεταλλικών αλάτων των οστών παραμένει ουσιαστικά αμετάβλητη, σε αντίθεση με τους μαλακούς ιστούς όπου το λίπος και η μυϊκή μάζα είναι ποσότητες μεταβλητές. Μεταβολές στη σύσταση του λίπους και της μυϊκής μάζας δημιουργούν διαφορές στους μαζικούς συντελεστές εξασθένησης των μαλακών ιστών γενικά και για τις δύο ενέργειες. Συνεπώς, για τον ακριβή υπολογισμό του λίπους και της μυϊκής μάζας με τη μέθοδο αυτή απαιτείται προηγουμένως μία ορθή εκτίμηση της σύστασης των μαλακών ιστών.

Στην πράξη, αντί της επίλυσης του συστήματος των δύο εξισώσεων για κάθε σάρωση, χρησιμοποιείται ο λόγος (R_{st}) του συντελεστή εξασθένησης των μαλακών μορίων για τις δύο ενέργειες της δέσμης, μη τη δημιουργία μιας καμπύλης βαθμονόμησης που συνδέει την ποσότητα αυτή με τη σύσταση του ανθρώπινου σώματος.^{49,52,53} Για παράδειγμα, οι Gotfredsen et al.⁴⁹ χρησιμοποιούν πηγή Gd-153 με κύριες φωτοκορυφές στα 44 και 100 KeV, ενεργότητας Ici. Ο τρόπος σάρωσης είναι ευθύγραμμος και ο συνολικός αριθμός εικονοστοιχείων (pixels) του σώματος είναι περίπου 4000. Τα μισά από αυτά βρίσκονται πάνω από οστά και τα άλλα μισά αντιστοιχούν σε μαλακά μόρια.

Υπολογίζεται για τα εικονοστοιχεία μαλακών μορίων ότι

$$R_{st} = \mu_{st}^{44} / \mu_{st}^{100} = \ln(I_o^{44}/I^{44}) / \ln(I_o^{100}/I^{100}), \quad (3)$$

όπου:

$\mu_{st}^{44}, \mu_{st}^{100}$ = μαζικοί συντελεστές εξασθένησης για τις δύο ενέργειες,

I_o^{44}, I_o^{100} = ρυθμοί κρούσεων στον αέρα,

I^{44}, I^{100} = ρυθμοί κρούσεων μετά από διέλευση της δέσμης.

Στη συνέχεια λαμβάνεται ο μέσος όρος των τιμών R_{st} για ολόκληρο το σώμα και επειδή η τιμή αυτή μεταβάλλεται ανάλογα με το ποσοστό της μυϊκής μάζας, είναι δυνατό να υπολογιστεί η τελευταία εφόσον είναι γνωστές οι τιμές R για το καθαρό λίπος και την καθαρή μάζα αντίστοιχα. Δηλαδή,

$$\text{ποσοστό μυϊκής μάζας} = (R_{st} - R_{fat}) / (R_{lean} - R_{fat}) \quad (4)$$

όπου R_{st} είναι η μικρότερη R τιμή για τους μαλακούς ιστούς και R_{lean} η μεγαλύτερη. Εάν μια τιμή R υπερβαίνει την R_{lean} , τότε το συγκεκριμένο εικονοστοιχείο περιέχει οστό.

3.2.2.3 Χρήση ακτίνων-X διπλής ενέργειας

Μία άλλη παραλλαγή της μεθόδου DEXA, η μέθοδος DPA, έχει εμφανιστεί κάνοντας χρήση των ακτίνων-X διπλής ενέργειας και παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα. Τα πλεονεκτήματα αυτά την καθιστούν αρκετά επιθυμητή και δικαιολογούν κάθε δυσκολία που προκύπτει από την εφαρμογή της.

Ειδικότερα, χρησιμοποιείται μια λυχνία ακτίνων-X που παρέχει μεγαλύτερη ροή φωτονίων (περίπου 500 με 1000 φορές) σε σχέση με την πηγή Gd-153 που χρησιμοποιείται ευρέως με τη μέθοδο DPA. Η υψηλότερη παροχή φωτονίων επιτρέπει τη μικρότερου κατευθυντού ακτινοβολίας (collimator), καθώς και μεγαλύτερη ταχύτητα σάρωσης με περισσότερες σαρώσεις ανά μονάδα επιφάνειας οστού. Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι η βελτίωση της στατιστικής των μετρήσεων και η αύξηση της χωρικής διακριτικής ικανότητας (spatial resolution) του συστήματος.

Επίσης, αποφεύγεται το βασικό μειονέκτημα της φυσικής έκπτωσης (decay) της πηγής, που υποχρεώνει την αντικατάστασή της σε τακτά χρονικά διαστήματα, με

αποτέλεσμα την εμφάνιση προβλημάτων τόσο σταθερότητας του μηχανήματος με την πάροδο του χρόνου, όσο και ακτινοπροστασίας κατά τη μεταφορά, φύλαξη και απομάκρυνση των πηγών μετά το τέλος της ωφέλιμης ζωής της.

Με βάση τη χρήση των ακτίνων-X, υπάρχουν τρία είδη συστημάτων απορροφησιμετρίας που χρησιμοποιούνται ευρέως σήμερα, στην Ευρώπη και στην Αμερική. Κοινά χαρακτηριστικά τους είναι η χρήση μιας πηγής που δημιουργεί ακτίνες-X σε δύο διαφορετικές ενέργειες, ένας ανιχνευτής και ένα υπολογιστικό σύστημα με τα περιφερειακά του για απεικόνιση της περιοχής ενδιαφέροντος, καθώς και τον υπολογισμό τόσο της μάζας των οστικών αλάτων των οστών (Bone Mineral Content, BMC), όσο και της πυκνότητας των αλάτων των οστών (Bone Mineral Density, BMD). Η μέθοδος DEXA επιτρέπει επίσης, την αναίμακτη και άμεση μέτρηση και των άλλων δύο διαμερισμάτων του σώματος, δηλαδή της άνευ λίπους μάζας (LBM ή LEAN) και της λιπώδους μάζας (FBM ή FAT).

Τα τελευταία χρόνια η μέθοδος DEXA έχει γίνει μία διεθνώς αποδεκτή μέθοδος ανάλυσης του σώματος εξαιτίας: α) της ευκολίας στη χρήση, β) της μεγάλης ακρίβειας (accuracy) και της επαναληψιμότητας (precision), γ) της ικανότητας μέτρησης οστικής, λιπώδους και άνευ λίπους μάζας, δ) της δυνατότητας μέτρησης σε οποιαδήποτε θέση του σώματος καθώς και της εκτέλεσης ολόσωμων μετρήσεων, ε) της χαμηλής ακτινοβολήσης του εξεταζόμενου και στ) της αποδέσμευσης από μη αληθείς παραδοχές που χαρακτηρίζουν τις μεθόδους ανάλυσης σώματος.^{45,47-49,51-64}

3.2.2.5 Η χρήση της απορροφησιμετρίας σε Ζώα Εργαστηρίου

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της οστικής μάζας, αρχιτεκτονικής και οστικού μεταβολισμού στα Ζωικά Πρότυπα είναι γενικά οι ίδιες που

χρησιμοποιούνται στον άνθρωπο. Ο πρωταρχικός σκοπός όμως, της χρήσης των Ζωικών Προτύπων είναι η βαθύτερη κατανόηση των διεργασιών που επιτελούνται. Για το λόγο αυτό οι μέθοδοι εκτίμησης της οστεοπενίας στα Ζώα Εργαστηρίου μπορεί να είναι πιο εξειδικευμένες ή και πιο επεμβατικές από αυτές που χρησιμοποιούνται στον άνθρωπο.⁴⁴

Οι μέθοδοι DEXA χρησιμοποιούνται συχνά στα πρωτόκολλα οστεοπόρωσης στα Ζώα Εργαστηρίου, για την εκτίμηση της BMD και της BMC.⁶⁵ Η ανάλυση των μηχανημάτων έχει κατά πολύ βελτιωθεί τα τελευταία χρόνια με αποτέλεσμα να είναι πλέον δυνατόν να εκτιμήσουμε συγκεκριμένα σημεία των οστών Ζωικών Προτύπων, τόσο μικρών όσο ο μυς. Ένας τομέας στον οποίο η χρήση της DEXA έχει βρει μεγάλη εφαρμογή είναι η τμηματική ανάλυση (regional analysis) διαφόρων περιοχών του σώματος. Σε αυτές τις συσκευές παρέχεται η δυνατότητα ορισμού συγκεκριμένων περιοχών (ROI) του οστού με τη χρήση ειδικού λογισμικού.^{57,66}

3.3 Επεμβατικές μέθοδοι

3.3.1 Ιστομορφομετρία

Η μέτρηση της ποσότητας και η εκτίμηση της ποιότητας των οστών μπορεί να γίνει και μετά από οστική βιοψία. Η μέθοδος που ακολουθείται είναι μετρική (οστική ιστομορφομετρία) και βασίζεται στις αρχές που διέπουν την οστική ανακατασκευή. Τα ευρήματα που προκύπτουν από την οστική ιστομορφομετρία είναι αποτέλεσμα διαταραχής των φάσεων της οστικής ανακατασκευής.⁶⁷ Η οστική ιστομορφομετρία εφαρμόζεται, κυρίως, σε οστικές περιοχές όπου υπερισχύει το σπογγώδες οστό, διότι η οστική ανακατασκευή είναι εντονότερη, κι επομένως, εμφανέστερη στις περιοχές αυτές. Όσο επιταχυνόμενη είναι η οστική ανακατασκευή, τόσο περισσότερα είναι τα ευρήματα της οστικής ιστομορφομετρίας.⁶⁸

Στην οστική ιστομορφομετρία η μελέτη του οστού, μπορεί να πραγματοποιηθεί, τόσο στατικά, όσο και δυναμικά σε ιστικό και κυτταρικό επίπεδο. Οι πληροφορίες που συγκεντρώνονται από την οστική ιστομορφομετρία αφορούν σε ποσοτικό και ποιοτικό χαρακτηρισμό του οστού. Η ποσοτική οστική ιστομορφομετρία δύναται να αποδώσει αριθμητικές τιμές σε κυτταρικές και δομικές παραμέτρους του οστού, έτσι ώστε να μπορούν να προσδιοριστούν στατιστικώς, διαφορές ανάμεσα σε ομάδες ασθενών ή ομάδες ζώων σε κλινικές μελέτες αντίστοιχα.⁶⁸

3.3.2 Μηχανική αντοχή

3.3.2.1 Προετοιμασία και διατήρηση παρασκευασμάτων

Παρά την εκτεταμένη χρήση της απορροφησιομετρίας, σαν μέτρο εκτίμησης της ευθραυστότητας των οστών, η άμεση εκτίμηση της μηχανικής αντοχής των οστών παρέχει σίγουρα περισσότερες πληροφορίες για τη μηχανική ακεραιότητα των οστών. Βέβαια, πρέπει να παρατηρηθεί, ότι για ευνόητους λόγους, η μηχανική αντοχή των οστών είναι δυνατόν να εκτιμηθεί μόνον σε πειραματόζωα ή πτωματικά παρασκευάσματα.

Οι μηχανικές ιδιότητες του οστού μπορεί να ποικίλουν σύμφωνα με: α) το είδος του οστού που υποβάλλεται σε δοκιμασία (φλοιώδες ή σπογγώδες), β) την ηλικία του οστού και την ανατομική θέση που υποβάλλεται σε δοκιμασία και γ) διαφορές στις συνθήκες δοκιμασίας. Ενώ ο τύπος του οστού, η ηλικία και η ανατομική θέση όπου γίνεται η δοκιμασία συνήθως καταγράφονται, άλλα σημαντικά στοιχεία που αφορούν στις συνθήκες δοκιμασίας και στη παρασκευή όπως και στη διατήρηση των παρασκευασμάτων, μερικές φορές παραβλέπονται. . Σημαντικοί παράμετροι είναι η διατήρηση και η ενυδάτωση των παρασκευασμάτων, όπως και η θερμοκρασία στην

οποία πραγματοποιείται η δοκιμασία. Η ιστική καταστροφή αρχίζει μέσα σε λίγες ώρες από την απομάκρυνση του οστού από το σώμα και μπορεί να επηρεάσει τις μηχανικές ιδιότητες του οστού.^{69,70} Πρέπει να έχουμε υπόψη μας ότι τα δεδομένα που προέρχονται από τις μηχανικές δοκιμασίες θα είναι μάλλον σχετικά και όχι απόλυτα, εκτός και αν το υλικό υποβληθεί σε δοκιμασία αμέσως μετά την παρασκευή του.⁷¹

Η διατήρηση σε αιθυλική αλκοόλη πριν από τη δοκιμασία προκαλεί πολύ μικρές αλλαγές τις μηχανικές ιδιότητες του οστού. Ο Ashman⁷² ανέφερε ότι η διατήρηση παρασκευασμάτων σε διάλυμα 50% αιθυλικής αλκοόλης/φυσιολογικού ορού έως 90 ημέρες, προκαλεί μείωση του συντελεστή ελαστικότητας του Young της τάξεως του 2%. Οι Sedlin & Hirsch⁶⁹ ανέφεραν ότι η αιθυλική αλκοόλη είναι λιγότερο αποτελεσματική σαν συντηρητικό. Οστικά δείγματα που διατηρήθηκαν σε διάλυμα 40% αιθυλικής αλκοόλης για 5-10 ημέρες παρουσίασαν μείωση του συντελεστή ελαστικότητας του Young της τάξεως του 2.5-4.0%. Συγκριτικά, τα παρασκευάσματα που διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου χωρίς συντηρητικά για 24 ώρες, παρουσιάζουν μείωση του συντελεστή ελαστικότητας του Young της τάξεως του 3%. Τα οστικά παρασκευάσματα που διατηρούνται σε διάλυμα αιθυλικής αλκοόλης αφυδατώνονται λίγο, για αυτό είναι απαραίτητο να παραμείνουν σε ισο-οσμωτικό διάλυμα φυσιολογικού ορού αρκετές ώρες πριν υποβληθούν σε μηχανικές δοκιμασίες, ώστε να επανυδατωθούν (κατά το διάστημα αυτό τα παρασκευάσματα πρέπει να αποψύχονται, σε περίπτωση που έχουν καταψυχθεί).⁷¹ Τα παρασκευάσματα μπορεί να διατηρηθούν σε φορμόλη ή σε γλουταραλδεύδη. Η διατήρηση των παρασκευασμάτων με αυτόν τον τρόπο αυξάνει την συγκέντρωση του κολλαγόνου και επομένως διαφοροποιεί σημαντικά τις ιδιότητες του οστίτη ιστού σε σχέση με τη διατήρηση σε αιθυλική αλκοόλη, για αυτό δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται αυτά τα παρασκευάσματα για να μετρηθούν οι πραγματικές μηχανικές ιδιότητες των οστών.⁷¹ Ο Evans⁷³ ανέφερε

ότι τα παρασκευάσματα που έχουν διατηρηθεί με αυτόν τον τρόπο παρουσίασαν αύξηση του συντελεστή ελαστικότητας του Young και της μέγιστης τάσης ελκυσμού, της τάξεως του 68%. Οι McElhane et al.⁷⁴ ανέφεραν μείωση 1-9% της τάσης ελκυσμού και μείωση 12-18% της τάσης συμπίεσης. Η καλύτερη μέθοδος διατήρησης των παρασκευασμάτων για σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα είναι αναμφισβήτητα η κατάψυξή τους στους -20 °C μέσα σε γάζα εμβαπτισμένη σε φυσιολογικό ορό. Οι Sedlin και Hirsch (1966) έδειξαν ότι η κατάψυξη ανθρώπινου μηριαίου οστού στους -20 °C για 20 ημέρες δεν αλλοίωσε τις ιδιότητες κάμψης του οστού. Ο Ashman⁷² ανέφερε ότι η κατάψυξη στους -20 °C για 30 ημέρες προκάλεσε μείωση μικρότερη του 2% στον συντελεστή ελαστικότητας του Young σε μηριαία οστά σκύλων. Οι Pelker et al.⁷⁵ δεν παρατήρησαν αλλαγές στη τάση ελκυσμού ούτε στη σκληρότητα μηριαίων που καταψύχθηκαν στους -20 °C ή στους -70 °C για 14 ημέρες. Ωστόσο, η τάση συμπίεσης και ο συντελεστής ελαστικότητας σπονδύλων που καταψύχθηκαν σε διάφορες θερμοκρασίες, αυξήθηκαν σημαντικά. Δεν βρέθηκαν διαφορές μεταξύ των παρασκευασμάτων που καταψύχθηκαν στους -20 °C και εκείνων που καταψύχθηκαν στους -70°C. Η διατήρηση σε υγρό άζωτο ελαττώνει τη στροφική αντοχή και αυξάνει την αντοχή στη συμπίεση των σπονδύλων σε σημαντικό βαθμό.⁷¹

Στο στεγνό οστόν, ο συντελεστής ελαστικότητας του Young και η μηχανική αντοχή του αυξάνουν, ενώ η ανθεκτικότητά του μειώνεται.⁷⁶ Η μείωση της ανθεκτικότητας οφείλεται στο γεγονός ότι το στεγνό οστόν είναι πιο εύθραυστο από το υγρό οστόν, έτσι ώστε ενώ η δύναμη που προκαλεί κάταγμα, όταν επιδράσει σε αυτό, είναι μεγαλύτερη, το οστό απορροφά λιγότερη ενέργεια πριν αυτό ραγεί. Οι Evans και Lebow⁷⁷ έδειξαν μία αύξηση του συντελεστή ελαστικότητας του Young της τάξεως του 17% ανθρώπινου στεγνού μηριαίου οστού, αύξηση της τάξεως του 31% της μέγιστης αντοχής σε ελκυσμό και μία μείωση της ανθεκτικότητας της τάξεως του 55%.

Για ακριβή αποτελέσματα εμβιομηχανικών δοκιμασιών, πρέπει το οστόν να υποβάλλεται σε δοκιμασίες σε υγρή κατάσταση. Αυτό μπορεί να γίνει με τη διατήρηση των παρασκευασμάτων σε φυσιολογικό ορό, ή με τη τοποθέτηση του παρασκευάσματος σε γάζα εμποτισμένη με φυσιολογικό ορό κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας.⁷¹

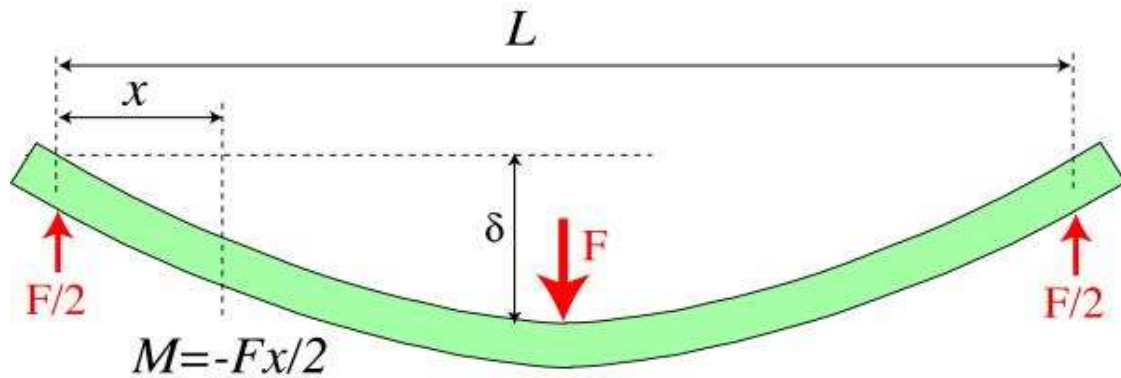
Η θερμοκρασία στην οποία δοκιμάζονται τα παρασκευάσματα είναι ένας ακόμη σημαντικός παράγοντας. Επίσης, σε όλα τα βιολογικά υλικά, έτσι και στο οστόν, οι εμβιομηχανικές ιδιότητες επηρεάζονται από τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Για ακριβή μέτρηση των εμβιομηχανικών ιδιοτήτων, τα οστικά παρασκευάσματα πρέπει να δοκιμάζονται σε θερμοκρασία 37 °C. Όμως αυτό δεν είναι πάντοτε εφικτό. Η δοκιμασία σε θερμοκρασία περιβάλλοντος 23 °C (θερμοκρασία που συνήθως επικρατεί μέσα σε ένα δωμάτιο) αυξάνει το συντελεστή ελαστικότητας του Young περίπου 2-4% σε σχέση με θερμοκρασία περιβάλλοντος 37 °C.⁷⁸⁻⁸⁰ Παρόλο που το σφάλμα σε δοκιμασία θερμοκρασίας δωματίου δεν είναι μεγάλο (εκτός από δοκιμασίες κόπωσης, όπου το δοκιμαζόμενο οστόν σε θερμοκρασία δωματίου αντέχει διπλάσιο αριθμό κύκλων φόρτισης σε σχέση με δοκιμασία σε 37 °C⁸¹), ωστόσο οφείλουμε να αναγνωρίσουμε ότι η θερμοκρασία δωματίου ποικίλει αρκετά. Η ποικιλία των εμβιομηχανικών μετρήσεων θα ήταν μικρότερη εάν ήμασταν περισσότερο προσεκτικοί στον έλεγχο της θερμοκρασίας (για παράδειγμα, τοποθετώντας τα οστικά παρασκευάσματα σε λουτρό φυσιολογικού ορού 37 °C κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας⁸²).

3.3.2.2 Μέθοδος μέτρησης της μηχανικής αντοχής των οστών

Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι εμβιομηχανικών δοκιμασιών. Αυτές είναι η δοκιμασία ελκυσμού (tensile test), η δοκιμασία κάμψης (bending test), οι εμβιομηχανικές μικροδοκιμασίες (microtesting), η δοκιμασία συμπίεσης (compressive

test), η δοκιμασία στρέψης (torsion test), η δοκιμασία διάτμησης (pureshear test), οι ηχητικές δοκιμασίες (ultrasonic test), η ακουστική μικροσκοπία (acoustic microscopy) και οι δοκιμασίες κόπωσης (fatigue tests). Η εφαρμογή της κάθε μεθόδου εξαρτάται από το αντικείμενο έρευνας κάθε μελέτης. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία κάμψης τριών σημείων (3-point bending test).

Οι δοκιμασίες κάμψης χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση των εμβιομηχανικών ιδιοτήτων των επίμυων και άλλων μικρών ζώων. Αυτά τα ζώα έχουν μικρά οστά, τα οποία είναι πολύ δύσκολο να υποβληθούν σε δοκιμασίες ελκυσμού ή συμπίεσης (εκτός από τους σπονδύλους των επίμυων που υποβάλλονται σε δοκιμασία συμπίεσης). Κατά τη δοκιμασία κάμψης ολόκληρο το οστόν υπόκειται σε φόρτιση και κάμπτεται έως ότου υποστεί κάταγμα. Οι τάσεις που αναπτύσσονται μπορούν να υπολογιστούν σύμφωνα με τη σχέση $\sigma = Mc/I$, όπου σ είναι η τάση που αναπτύσσεται στο οστόν, M είναι η ροπή κάμψης, είναι η απόσταση από το κέντρο της μάζας της διατομής του οστού και I είναι η ροπή αδράνειας της διατομής του οστού γύρω από τον άξονα κάμψης. Η κάμψη δημιουργεί τάσεις ελκυσμού στο μία πλευρά του οστού και τάσεις συμπίεσης άλλη πλευρά του (**Εικόνα 4**). Το οστόν είναι ασθενέστερο κατά τον ελκυσμό του σε σχέση με τη συμπίεσή του,⁸³ συνεπώς το κάταγμα επισυμβαίνει στη πλευρά του οστού όπου δημιουργούνται τάσεις ελκυσμού.



Εικόνα 4: Μικτή μορφή καταπόνησης του οστού. Κατά την άνω πλευρά αναπτύχθηκε θλίψη, κατά την κάτω ελκυσμός και κατά μία φανταστική μέση γραμμή διάτμηση.

Η ροπή αδράνειας της διατομής του οστού (cross-sectional moment of inertia) είναι ένα μέτρο της διανομής του υλικού γύρω από έναν δεδομένο άξονα και είναι απαραίτητη για τον υπολογισμό της τάσης κάμψης. Η ροπή αδράνειας της διατομής του οστού μπορεί να εκτιμηθεί για τη διατομή ενός μακρού οστού με τη χρήση σχέσεων που αφορούν σε ιδεώδεις ελλειπτικές διατομές.^{82,84} Για ανώμαλες (μη ιδεώδεις ελλειπτικές) οστικές διατομές, μπορεί να υπολογιστεί χρησιμοποιώντας το θεώρημα του παράλληλου άξονα:

$$I = i_c + Ad^2 \quad (1)$$

όπου i_c και A αντιπροσωπεύουν τη ροπή αδράνειας σε σχέση με τον κεντρικό άξονα και την επιφάνεια θ , αντίστοιχα, για ένα στοιχείο επιφάνειας εντός της διατομής και d είναι η απόσταση από το κέντρο του στοιχείου της επιφάνειας ως προς ένα δεδομένο άξονα επί της διατομής. Ροπές αδράνειας μπορεί να μετρηθούν σχετικά με οποιονδήποτε άξονα εντός της διατομής, αλλά για τη δοκιμασία κάμψης, πρέπει να μετρηθεί ως προς τον άξονα κάμψης που διέρχεται από το κέντρο της μάζας της διατομής. Αυτός ο άξονας καλείται ουδέτερος άξονας και δεν υπόκειται ούτε σε τάση ελκυσμού, ούτε σε τάση συμπίεσης κατά τη κάμψη. Οι τάσεις ελκυσμού και συμπίεσης αυξάνουν γραμμικά με

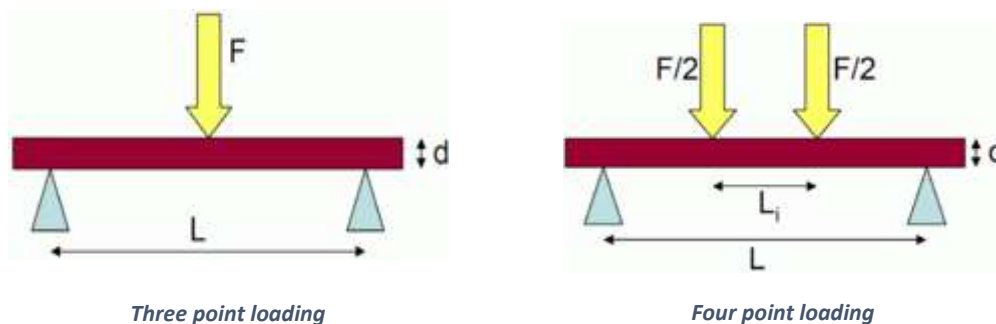
την απόσταση από τον ουδέτερο άξονα (**Εικόνα 4**), έτσι ώστε οι μεγαλύτερες τάσεις παρουσιάζονται στην επιφάνεια του οστού. Για μία οστική διατομή, οι ροπές αδράνειας μπορούν να μετρηθούν χρησιμοποιώντας κάποιο σύστημα ψηφιοποίησης (digitizing system) ή με τεχνικές μέτρησης σημείου (point counting techniques). Ας υποθέσουμε ότι η οστική διατομή αποτελείται από πολλά στοιχεία σχήματος τετραγώνου (pixels) που το καθένα έχει ύψος h και πλάτος w . Στη περίπτωση αυτή η εξίσωση 1 γίνεται:

$$I = \sum_{i=1}^n (wh^3/12 + whd_i^2),$$

όπου $i_c = wh^3/12$, $A = wh$ και d_i είναι η απόσταση από τον ουδέτερο άξονα για το pixel με αριθμό i . Το άθροισμα των συνεισφορών όλων των pixels από το 1 έως το n μας δίνει τη ροπή αδράνειας. Η ροπή αδράνειας της διατομής του οστού μπορεί να μετρηθεί και με μη επεμβατικές μεθόδους όπως η SPA (single photon absorptiometry) ή η μέθοδος DEXA.^{85,86} Τα τελευταία χρόνια υπολογίζεται με την πιο αξιόπιστη μέθοδο pQCT (peripheral quantitative computed tomography).⁸⁷⁻⁸⁹

Ένα οστόν μπορεί να υποβληθεί σε κάμψη μέσω των δοκιμασιών κάμψης τριών ή τεσσάρων σημείων (**Εικόνα 5**). Το μήκος του παρασκευάσματος που υποβάλλεται σε φόρτιση (το μήκος του τμήματος του παρασκευάσματος που βρίσκεται μεταξύ των κατωτέρων σημείων στήριξης και αναφέρεται σαν L στην εικόνα 5, πρέπει να είναι σχετικά μεγάλο, ώστε να εξασφαλιστεί μία ακριβής δοκιμασία. Εάν το μήκος L είναι πολύ μικρό, το μεγαλύτερο μέρος της παραμόρφωσης που προκαλείται από τη φόρτιση θα οφείλεται σε τάσεις διάτμησης και όχι κάμψης. Σε γενικές γραμμές, το μήκος L πρέπει να είναι περίπου 16 φορές μεγαλύτερο από το πάχος του παρασκευάσματος (American Society for Testing & Materials Standard # D 790 M- 82: η οδηγία αναφέρεται σε πλαστικά υλικά αλλά εφαρμόζεται και στα οστά).⁷¹ Δυστυχώς, στις δοκιμασίες κάμψης ολοκλήρων των οστών, σχέση μήκους-πάχους 16:1 δεν μπορεί

να υπάρξει. Για δοκιμασίες μηριαίων ενηλίκων επίμυων, το μήκος L πρέπει να είναι τουλάχιστον 15 mm (θήλυς επίμυες) ή 20 mm (άρρηνες επίμυες), έτσι ώστε, το 85-90% της παραμόρφωσης του οστού να οφείλεται στη κάμψη.⁷¹ Το κύριο πλεονέκτημα της δοκιμασίας κάμψης τριών σημείων είναι η απλότητά της, αλλά έχει και το μειονέκτημα της δημιουργίας ισχυρών τάσεων διάτμησης στο κεντρικό τμήμα του οστού. Η δοκιμασία κάμψης τεσσάρων σημείων παρέχει καθαρή κάμψη μεταξύ των σημείων φόρτισης και μηδενίζει τις διατμητικές τάσεις. Ωστόσο, η δοκιμασία κάμψης τεσσάρων σημείων απαιτεί ακριβώς ίσες δυνάμεις φόρτισης σε κάθε φορτιζόμενο σημείο. Αυτό είναι απλό να γίνει σε ακριβή γεωμετρικά σχήματα, αλλά εξαιρετικά δύσκολο να επιτευχθεί σε ολόκληρα οστά. Για το λόγο αυτό, στα οστά των τρωκτικών εφαρμόζεται συνήθως η δοκιμασία κάμψης τριών σημείων.⁷¹



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση των μεθόδων δοκιμασιών κάμψης τριών και τεσσάρων σημείων σε οστά, όπου F η εφαρμοζόμενη δύναμη και d η προκαλούμενη μετατόπιση.

Η τάση (stress), η σχετική παραμόρφωση (strain) και ο συντελεστής ελαστικότητας του Young μπορούν να υπολογιστούν από την επενεργούσα δύναμη και την μετατόπιση που αυτή προκαλεί. Για τη δοκιμασία κάμψης τριών σημείων ισχύουν οι εξισώσεις:

$$\sigma = FL_c / 4I, \varepsilon = 12cd / L^2 \text{ και } E = (F/d) (L^3 / 48I), (2)$$

και για τη δοκιμασία κάμψης τεσσάρων σημείων:

$$\sigma = F ac / 2I, \varepsilon = 6cd / a(3L-4a) \text{ και } E = (F/d) (a^2/12I) (3L-4a), (3)$$

όπου σ είναι η τάση (stress), ε είναι η σχετική παραμόρφωση (strain), E είναι ο συντελεστής ελαστικότητας του Young, c είναι η απόσταση από το κέντρο της μάζας, F είναι η εφαρμοζόμενη δύναμη, d είναι η παρεκτόπιση, a και L είναι τα μήκη.⁹⁰

Ωστόσο, ο έμμεσος υπολογισμός της σχετικής παραμόρφωσης (strain) δεν είναι ακριβής για δύο λόγους: πρώτον, διότι οι εξισώσεις που αφορούν την σχετική παραμόρφωση ισχύουν μόνο στη προ-διαρροϊκή (pre-yield) περιοχή της καμπύλης τάσης-σχετικής παραμόρφωσης. Από τη στιγμή που ξεπερνάμε το σημείο διαρροής (yield point), η σχετική παραμόρφωση δεν είναι τόσο εύκολο να υπολογιστεί.⁹¹ Δεύτερον, διότι παρατηρείται σημαντική παραμόρφωση του παρασκευάσματος όταν οι φορτιστές (τα σημεία εφαρμογής της δύναμης) έρχονται σε επαφή με το οστόν. Επιπλέον, υπάρχει πάντοτε κάποια παραμόρφωση που οφείλεται στις προκαλούμενες διατμητικές τάσεις (οι τάσεις διάτμησης προκαλούν 10-15% της μετρούμενης παραμόρφωσης στις δοκιμασίες κάμψης ολοκλήρων των οστών των επίμυων). Για τους λόγους αυτούς, η μετρούμενη παραμόρφωση είναι μεγαλύτερη από την πραγματική ελαστική παραμόρφωση του οστού. Αυτό μας οδηγεί σε υπερεκτίμηση της σχετικής παραμόρφωσης και σε υποεκτίμηση του συντελεστή ελαστικότητας του Young.

Η σχετική παραμόρφωση μπορεί να μετρηθεί με μεγαλύτερη ακρίβεια χρησιμοποιώντας σύστημα αντίστασης στην σχετική παραμόρφωση (resistance strain gage) σε απευθείας επαφή με τη διάφυση του παρασκευάσματος που υποβάλλεται σε κάμψη. Με την τεχνική αυτή έχει βρεθεί ότι ο συντελεστής ελαστικότητας του Young στη κνήμη επίμυος είναι 29.4 GPa, ενώ με τη χρήση της εξίσωσης 2, ο ανωτέρω συντελεστής ελαστικότητας βρέθηκε μόνο 7.6 GPa.⁷¹ Το παράδειγμα αυτό καθιστά

σαφές ότι κατά τις εμβιομηχανικές δοκιμασίες μακρών οστών επίμυων, η σχετική παραμόρφωση και ο συντελεστής ελαστικότητας του Young δεν μπορούν να μετρηθούν με ακρίβεια με τη χρήση των εξισώσεων 2 και 3. Ωστόσο, λόγω του ότι αυτή η μέθοδος υπολογισμού των ανωτέρω εμβιομηχανικών μεγεθών εφαρμόζεται σε διάφορες μελέτες, τα αποτελέσματα των μελετών αυτών είναι συγκρίσιμα μεταξύ τους.^{71v} Πρέπει να τονιστεί ότι για τις δοκιμασίες κάμψης, είναι απαραίτητο να γίνεται διαχωρισμός μεταξύ ενδογενούς σκληρότητας (intrinsic stiffness) και εξωγενούς σκληρότητας (extrinsic stiffness) του οστού. Όπως ήδη αναφέρθηκε, η ενδογενής σκληρότητα ισοδυναμεί με το συντελεστή ελαστικότητας του Young (E) και η εξωγενής σκληρότητα ή καμπτική ακαμψία (flexural rigidity) ισοδυναμεί με το γινόμενο EL όπου το I είναι η ροπή αδράνειας της διατομής του οστού.^{71,92}

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΕΣ

4.1 Πολυφαινόλες οίνου

Πληθώρα αντιοξειδωτικών υπάρχει στους ερυθρούς και λευκούς οίνους. Πιο συγκεκριμένα τα σταφύλια και κυρίως τα στέμφυλα περιέχουν σημαντικές ποσότητες πολυφαινολικών ενώσεων που περιέχουν τουλάχιστον έναν αρωματικό δακτύλιο υποκατεστημένο με ένα ή περισσότερα υδροξύλια.

Όσον αφορά στη φυσιολογία του φυτού άμπελου, οι πολυφαινόλες συμβάλλουν στη μορφολογία του φυτού (π.χ. χρωματισμός), εμπλέκονται στην ανάπτυξη και την αναπαραγωγή του, προσφέρουν στα φυτά αντίσταση έναντι των παθογόνων οργανισμών και των ζώων, καθώς επίσης προστατεύουν τις καλλιέργειες από μολύνσεις.⁹³ Μέχρι σήμερα στο φυσικό βασίλειο έχουν ταυτοποιηθεί πολλές χιλιάδες μόρια με πολυφαινολική δομή και συγκεκριμένα πάνω από 8.000. Οι φυτικές πολυφαινόλες μπορούν να ταξινομηθούν σε διαφορετικές κατηγορίες, ανάλογα με τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων που περιέχουν, αλλά και τα δομικά στοιχεία που συνδέουν τους δακτυλίους μεταξύ τους.

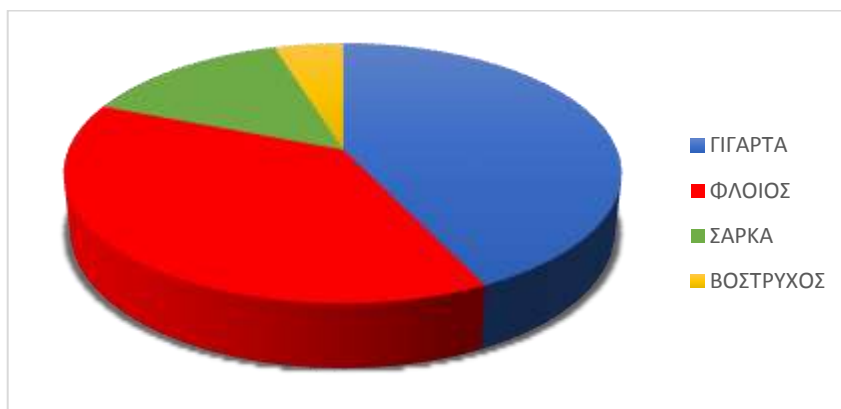
Οι πολυφαινόλες αποτελούν κατηγορία φυσικών αντιοξειδωτικών. Με τον όρο πολυφαινόλες υποδηλώνεται μια μεγάλη ομάδα κυκλικών παραγώγων του βενζολίου που περιέχουν ελεύθερες ομάδες υδροξυλίου στο βενζολικό τους δακτύλιο. Κυριότερη πηγή πολυφαινολών για τον άνθρωπο αποτελεί η διατροφή του, αφού φρούτα όπως μήλα, μούρα, κεράσια αλλά και λαχανικά είναι πλούσια σε πολυφαινόλες. Επίσης, ο ερυθρός οίνος, το πράσινο τσάι και το ελαιόλαδο αποτελούν πηγές πολυφαινολών.

Συγκρίνοντας ερυθρούς και λευκούς οίνους μπορούμε να διαπιστώσουμε ότι κατά τη λευκή οινοποίηση το ποσοστό των πολυφαινολών που εκχυλίζεται είναι μικρό καθώς οι φλοιοί και οι βόστρυχοι απομακρύνονται από το γλεύκος αμέσως, ενώ στην περίπτωση της ερυθρής οινοποίησης το ποσοστό που εκχυλίζεται είναι μεγάλο καθώς η αλκοολική ζύμωση γίνεται παρουσία των φλοιών και των γιγάρτων. Επίσης, η παρουσία της αλκοόλης και η υψηλή θερμοκρασία ζύμωσης στην ερυθρή οινοποίηση βοηθάει περαιτέρω την εκχύλιση αυτών των συστατικών.

Οι συγκεκριμένες ενώσεις ρυθμίζουν το χρώμα του οίνου και πολλές από τις οργανοληπτικές ιδιότητες του οίνου όπως τη στυφάδα του.⁹⁴ Πιο συγκεκριμένα κατά τη διάρκεια της οινοποίησης παράγονται χρωστικές ουσίες οι οποίες προέρχονται από αυτές τις αρχικές ενώσεις είναι όμως πιο σταθερές σε σχέση με την μεταβολή του pH που συμβαίνει κατά την αλκοολική ζύμωση και την προσθήκη διοξειδίου του θείου που ακολουθεί τη διαδικασία της οινοποίησης.⁹⁵ Η περιεκτικότητα του οίνου σε φαινολικά συστατικά εξαρτάται άμεσα από τις τεχνικές οινοποίησης και από την ποιότητα των σταφυλιών που χρησιμοποιήθηκαν.⁹⁶

Πιο συγκεκριμένα παρουσιάζεται μεγάλη ποικιλία στη φαινολική χημική σύνθεση διαφορετικών οίνων. Οι πολυφαινόλες είναι βασικά εντοπισμένες στα στερεά μέρη του καρπού του σταφυλιού και η λήψη τους από αυτά καθορίζεται από τις συνθήκες με τις οποίες φτιάχνεται ο οίνος. Στη συνέχεια, η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων στον καρπό για τους ερυθρούς οίνους ποικίλει ανάλογα με την ποικιλία, την εποχή της συλλογής, τις περιβαλλοντικές συνθήκες και τις οινοποιητικές διαδικασίες. Η ωρίμανση των ερυθρών οίνων είναι μία διαδικασία, η οποία περιλαμβάνει εκτεταμένο μετασχηματισμό των αρχικών πολυφαινολών του καρπού του σταφυλιού και έχει ως αποτέλεσμα ένα πολύπλοκο μίγμα απλών και πολυμερικών μορφών.⁹⁷

Σημαντικό επίσης παράγοντα αποτελούν οι περιβαλλοντικές συνθήκες. Ενδεικτικά αναφέρονται η έκθεση στο φως, ο βαθμός ωρίμανσης και οι συνθήκες αποθήκευσης. Στους παρακάτω πίνακες παρατίθενται η πολυφαινολική σύσταση του σταφυλιού καθώς επίσης και η περιεκτικότητα των πολυφαινολών στον καρπό του σταφυλιού, στον οίνο και στη μύρα (**Πίνακας 1 και Σχήμα 1**).



Σχήμα 1: Ποσοστά φαινολικών ουσιών στα μέρη της σταφύλης

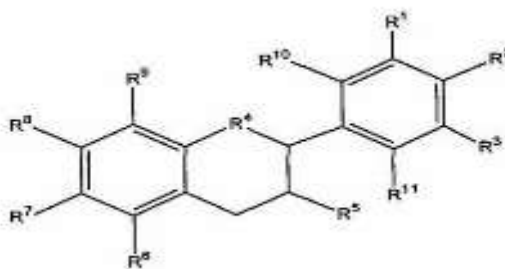
Τρόφιμο / Ποτά	Ολικές πολυφαινόλες
Φρούτα (mg/100g)	
Σταφύλι	50-490
Ποτά (mg/L)	
Λευκός Οίνος	200-300
Ερυθρός Οίνος	1000-4000
Μύρα	60-100

Πίνακας 1: Περιεκτικότητα πολυφαινολών σε οίνους, σταφύλι και μύρα.

Συνεχώς αυξανόμενο είναι το ενδιαφέρον για την εισαγωγή αντιοξειδωτικών ενώσεων φυτικής προέλευσης, όπως οι πολυφαινόλες, αφενός στη διατροφή, αφετέρου σε φαρμακευτικά σκευάσματα, που χρησιμοποιούνται σε ευρεία κλίμακα.⁹⁸ Το ενδιαφέρον αυτό είναι αποτέλεσμα των ενδείξεων για τις ευεργετικές ιδιότητες των φυσικών αυτών αντιοξειδωτικών στην πρόληψη των ασθενειών, όπως ο καρκίνος, τα καρδιαγγειακά νοσήματα και την οστεοπόρωση.^{99,100}

4.2 Κατηγορίες πολυφαινολών

Ο γενικός τύπος των πολυφαινολών φαίνεται στο παρακάτω σχήμα:



Σχήμα 2: Γενικός τύπος πολυφαινολών (Google images).

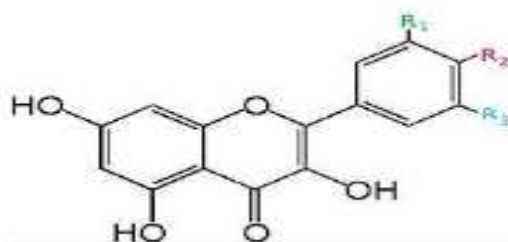
Στις πολυφαινόλες ανήκουν μεταξύ άλλων τα φλαβονοειδή και άλλα φαινολικά παράγωγα όπως για παράδειγμα τα στυλβένια. Πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι ο όρος πολυφαινόλες περιλαμβάνει επίσης και τα παράγωγα των φαινολικών συστατικών (εστέρες, μεθυλεστέρες, γλυκοζίτες κ.α.) που προκύπτουν με τις αντίστοιχες αντιδράσεις.

4.3 Φλαβονοειδή

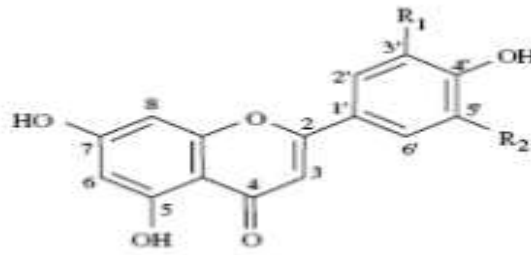
Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι πολυμοριακές φαινόλες και πιο συγκεκριμένα οι φλαβονόλες, φλαβόνες, ισοφλαβόνες, φλαβανόνες, ανθοκυανιδίνες και οι φλαβανόλες. Οι συγκεκριμένες αντιοξειδωτικές ουσίες υπάρχουν σε ποικίλες τροφές πέρα από τον οίνο, όπως τα πορτοκάλια, μήλα, κρεμμύδια, τσάι, σοκολάτα. Ο μεγαλύτερος όγκος της βιβλιογραφίας και ιδιαίτερα οι μελέτες που αναφέρονται στις φυσιολογικές τους επιδράσεις, επικεντρώνονται κυρίως στην κατηγορία των φλαβονοειδών.

Οι φλαβονόλες αποτελούν την ομάδα φλαβονοειδών με την υψηλότερη συγκέντρωση στον οίνο, ενώ οι κυριότερες ενώσεις αυτής της κατηγορίας είναι η κερσετίνη και κεμπφερόλη. Ο ερυθρός οίνος περιέχει πάνω από 45 mg/L. Οι ισοφλαβόνες είναι φλαβονοειδή που έχουν δομικές ομοιότητες ίδιες με τα οιστρογόνα. Οι ισοφλαβόνες βρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά στα όσπρια.¹⁰¹

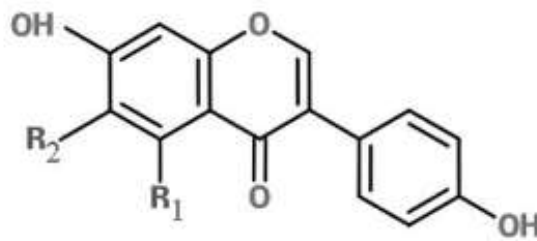
Οι φλαβανόλες απαντώνται τόσο στη μονομερή μορφή τους (κατεχίνες), όσο και ως πολυμερείς ενώσεις (προανθοκυανιδίνες). Στη συνέχεια μελετώνται αναλυτικά συγκεκριμένες κατηγορίες πολυφαινολικών ενώσεων του οίνου.



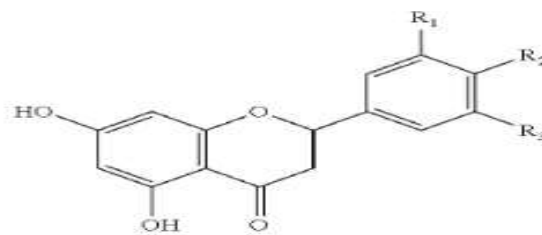
Σχήμα 3: Δομή της φλαβονόλης (Google images).



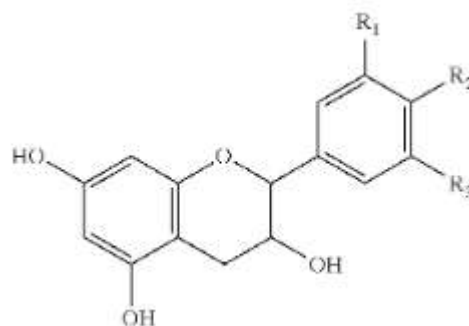
Σχήμα 4: Δομή της φλαβόνης (Google images).



Σχήμα 5: Δομή της ισοφλαβόνης (Google images).



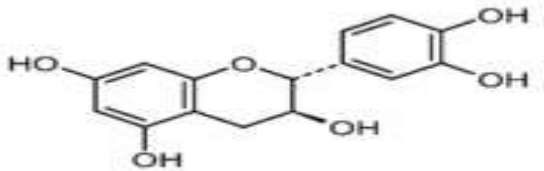
Σχήμα 6: Δομή της φλαβονόνης (Google images).



Σχήμα 7: Δομή της φλαβανόλης (Google images).

4.3.1 Κατεχίνες

Οι ενώσεις αυτές έχουν γενική μορφή που φαίνεται στο παρακάτω σχήμα:



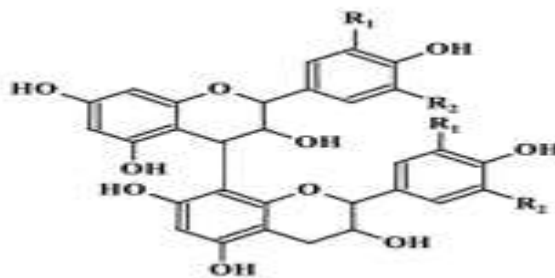
Σχήμα 8: Χημική δομή (+) κατεχίνης (Google images).

Οι κατεχίνες εμφανίζουν οπτική συμμετρία και στη φύση υπάρχουν οι μορφές της (+), (-) κατεχίνης και της (+), (-) επικατεχίνης.

Στους οίνους κυρίως επικρατούν οι μορφές της (+) κατεχίνης και της (-) επικατεχίνης. Οι ενώσεις αυτές απαντούν κυρίως στους φλοιούς και στα γίγαρτα των ραγών. Ως αποτέλεσμα αυτού στους λευκούς οίνους η συγκέντρωσή τους κυμαίνεται μεταξύ 10-50 mg /L , ενώ στους ερυθρούς μπορεί να φτάσει 200 mg /L.¹⁰² Αξίζει να αναφερθεί ότι οι βόστρυχοι περιέχουν σχεδόν αποκλειστικά (+) κατεχίνη ενώ στα γίγαρτα η (-) επικατεχίνη και (+) κατεχίνη βρίσκονται στην ίδια περιεκτικότητα.

4.3.2 Προανθοκυανιδίνες

Οι ενώσεις αυτές βρίσκονται στους φλοιούς, κυρίως όμως στα γίγαρτα των ραγών. Κατά την ωρίμανση και παλαίωση των οίνων, οι προανθοκυανιδίνες ενώνονται μεταξύ τους, καθώς και με άλλα μόρια, προς σχηματισμό πολυμερών μεγαλύτερου μοριακού βάρους (2000-3000), που αντιστοιχούν στις συμπυκνωμένες ταννίνες. Μπορούν όμως να ενωθούν με πολυσακχαρίτες των σταφυλιών και να εκχυλιστούν ως σύμπλοκα κατά την οινοποίηση.¹⁰³



Σχήμα 9: Χημική δομή προανθοκυανιδινών (όπου $R_1, R_2 = H, OH$) (Google images).

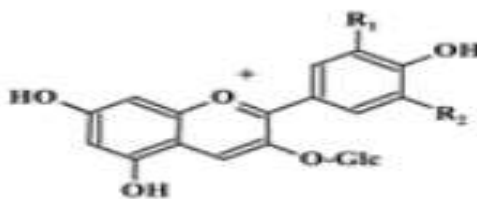
4.3.3 Ταννίνες

Κυρίως βρίσκονται στα στερεά μέρη της σταφυλής (γίγαρτα μέχρι 65%, βόστρυχοι μέχρι 22%, φλοιοί μέχρι 12% και σάρκα 1%). Από χημική άποψη είναι μεγαλομόρια με φαινολικό δακτύλιο, που προκύπτουν από τον πολυμερισμό στοιχειωδών μορίων με φαινολική ομάδα. Είναι ουσίες ικανές να δώσουν σταθερές ενώσεις με πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες. Για να δώσουν σταθερές ενώσεις με τις πρωτεΐνες θα πρέπει να είναι ογκώδεις όχι όμως υπερβολικά, γιατί σε αυτή την περίπτωση ενδέχεται να μη μπορούν να ενωθούν με τις δραστικές θέσεις των πρωτεϊνών. Οι σχετικές μοριακές μάζες των δραστικών ταννινών κυμαίνονται από 600 έως 3.500.¹⁰⁴ Οι ερυθροί οίνοι περιέχουν 1.5 έως 4 g/L ενώ οι λευκοί 40 έως 200 g/L. Στις συγκεκριμένες ενώσεις αποδίδεται η στυφάδα των οίνων.

Οι συμπυκνωμένες ταννίνες προέρχονται κυρίως από τον πολυμερισμό της (+) κατεχίνης και της (-) επικατεχίνης. Οι συμπυκνωμένες ταννίνες προέρχονται κυρίως από τον πολυμερισμό της (+) κατεχίνης και της (-) επικατεχίνης. Οι συμπυκνωμένες ταννίνες αντιπροσωπεύουν το 30-60% των ολικών φαινολικών παραγωγών και μελέτες έχουν δείξει ότι το ποσοστό τους αυξάνεται με την παλαίωση του οίνου σε βαρέλι.

4.3.4 Ανθοκυάνες

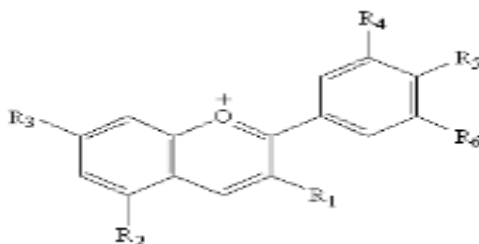
Αποτελούν ίσως τη σημαντικότερη κατηγορία φαινολικών συστατικών της σταφυλής, καθώς είναι οι ερυθρές χρωστικές στις οποίες οφείλουν το πορφυρό ερυθρό, πορτοκαλί, κυανό ή ιώδες χρώμα τους. Απαντούν μόνο στο φλοιό των ραγών των ποικιλιών *vitis vinifera*, πλην των βαφικών ποικιλιών στις οποίες βρίσκονται στη σάρκα των ραγών. Είναι επίσης παρούσες στα φύλλα, κυρίως κατά το τέλος της περιόδου ανάπτυξης, όπου και χρωματίζονται ερυθρά. Στις περισσότερες λευκές ποικιλίες, οι ανθοκυάνες απουσιάζουν τελείως, ενώ σε ορισμένες απαντούν σε ίχνη. Από ποσοτικούς προσδιορισμούς των ολικών ανθοκυανών στους φλοιούς των πιο διαδεδομένων ερυθρών ποικιλιών, προέκυψε ότι αυτές κυμαίνονται από 100 mg μέχρι 1.500 mg/Kg ραγών.¹⁰³



Σχήμα 10: Χημική δομή ανθοκυανών (όπου R₁, R₂ = H, OH, OCH₃) (Google images).

4.3.5 Ανθοκυανιδίνες

Οι ανθοκυανιδίνες διαφέρουν από τις ανθοκυάνες, ως προς τον αριθμό των υποκατάστατων και συγκεκριμένα των ομάδων -OH και -CH₃ που υφίστανται στον πλευρικό δακτύλιο. Η πιο διαδεδομένη στη φύση είναι η κυανιδίνη. Η μαλβιδίνη θεωρείται η βάση τους χρώματος των ερυθρών σταφυλιών και οίνων επικρατεί σε ποσοστό που ανάλογα με την ποικιλία κυμαίνεται από 50% (Sangiovese) μέχρι και 90% (Grenache).¹⁰⁵



Σχήμα 11: Χημική δομή ανθοκυανιδίων (όπου R1, R2 = H, OH, OCH3) (Google images).

4.4 Άλλα φαινολικά παράγωγα

Στη δεύτερη κατηγορία αυτή των άλλων φαινολικών παραγώγων, που είναι ουσιαστικά οι μονομοριακές φαινόλες ανήκουν η ρεσβερατρόλη και διάφορα οξέα του οίνου όπως το βενζοϊκό, το καφεϊκό και το γαλλικό οξύ. Τα συγκεκριμένα οξέα υπάρχουν κυρίως στο φλοιό των σταφυλιών παρά στο χυμό και βρίσκονται κυρίως στους ερυθρούς οίνους, οι οποίοι παλαιώνονται.¹⁰⁶ Πιο συγκεκριμένα η συγκέντρωση των πολυφαινολικών παραγώγων, στους ερυθρούς οίνους κυμαίνονται μεταξύ 100-200 mg/L, ενώ στους λευκούς μεταξύ 10-20 mg/L. Τα μη φλαβονοειδή αποτελούν ενώσεις σημαντικού ενδιαφέροντος, διότι φαίνεται ότι δρουν ευεργετικά για το καρδιαγγειακό σύστημα παρεμποδίζοντας την απόφραξη των στεφανιαίων αρτηριών, όπως έχει αποδειχθεί από μελέτες σε πειραματόζωα.

Αναλύσεις με τεχνικές ηλεκτροφόρησης έχουν δείξει ότι στην περίπτωση των ερυθρών οίνων το γαλλικό οξύ παρουσιάζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε σχέση με τα υπόλοιπα φαινολικά οξέα. Αυτές οι ενώσεις είναι συνδεδεμένες με το συνολικό αντιοξειδωτικό δυναμικό των οίνων.¹⁰⁴

4.4.1 Ρεσβερατρόλη

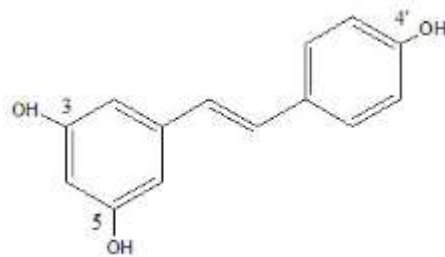
Την πιο σημαντική ίσως ουσία από την κατηγορία των πολυφαινολικών παραγώγων αποτελεί η ρεσβερατρόλη. Η συγκεκριμένη ένωση ανήκει στην κατηγορία των στυλβενίων, ενώσεων με δύο αρωματικούς δακτυλίους και παρουσιάζει αντιοξειδωτικές ιδιότητες, αλλά και προστασία έναντι της επίδρασης των ελευθέρων ριζών σύμφωνα με πειράματα που αρχικά έχουν πραγματοποιηθεί σε Ζώα Εργαστηρίου. Τέτοιες ιδιότητες εμφανίζουν το trans ισομερές της καθώς και το γλυκοζυλιομένο παράγωγό της.¹⁰⁷ Η ρεσβερατρόλη βρίσκεται μόνο στο φλοιό της σταφυλής με αποτέλεσμα να απαντάται στους ερυθρούς κυρίως οίνους σε συγκεντρώσεις από 1 έως 3 mg/L.

Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία η ρεσβερατρόλη είναι ένα από τα σημαντικά φαρμακευτικά σκευάσματα για την προστασία των κυττάρων του ήπατος από την επίδραση των ελεύθερων ριζών, κάτι που μπορεί να οδηγήσει σε περαιτέρω επιπλοκές.¹⁰⁸ Η ρεσβερατρόλη δρα μέσω τροποποίησης των οδών μεταβολισμού, οι οποίοι εξαρτώνται από τις στεροειδείς ορμόνες και παρεμποδίζει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, τόσο σε καλλιέργειες, όσο και σε ξενομοσχεύματα. Σε ορισμένες περιπτώσεις ερευνάται η χρήση της ρεσβερατρόλης σε συνδυασμό με άλλες καρκινικές ουσίες.¹⁰⁹

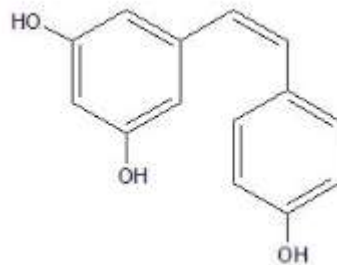
Τα οφέλη της ρεσβερατρόλης επεκτείνονται και στην πρόγνωση νευρολογικών διαταραχών αλλά και αγγειακών εγκεφαλικών επεισοδίων. Επιπλέον, η ρεσβερατρόλη φαίνεται να καθυστερεί την εμφάνιση ορισμένων νόσων ή καταστάσεων που έχουν σχέση με τη γήρανση των οργανισμών.¹¹⁰

Σύμφωνα με διεθνείς αναφορές πειράματα με ρεσβερατρόλη σε Ζώα Εργαστηρίου έδειξαν ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αναστολή διεργασιών σε

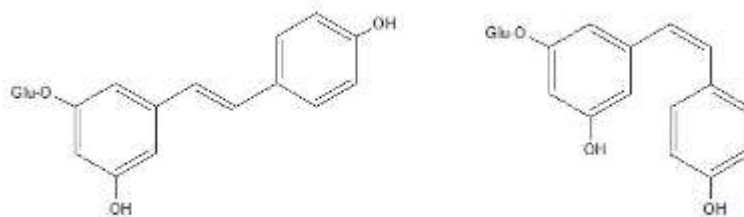
πρώτη φάση, όπως το οξειδωτικό stress και οι φλεγμονώδεις καταστάσεις και σε δεύτερη φάση στην προαγωγή της καρκινογένεσης με συσσώρευση μεταλλάξεων στο DNA. Επίσης, έχει δυνατότητα ακόμη και για παρέμβαση στην έκφραση γονιδίων.¹¹¹ Η χημειοπροστατευτική δράση είναι επίσης μία ακόμη πλευρά της πολύπλευρης δράσης της.¹¹²



Σχήμα 12: *Trans* ισομερές της ρεσβερατρόλης (Google images).



Σχήμα 13: *Cis* ισομερές της ρεσβερατρόλης (Google images).



Σχήμα 14: Χημικός τύπος του *trans* και *cis* γλυκοζυλιωμένου παραγώγου της ρεσβερατρόλης (Google images).

4.5 Αντιοξειδωτική / Προ-οξειδωτική δράση

Η πιο σημαντική ιδιότητα των φυτικών πολυφαινόλων που αφορά την επίδρασή τους στην ανθρώπινη υγεία θεωρείται η αντιοξειδωτική τους δράση, δηλαδή η ικανότητά τους να εξουδετερώνουν ή να παρεμποδίζουν το σχηματισμό Δραστικών Μορφών Οξυγόνου (ΔΜΟ). Οι ΔΜΟ θεωρούνται αιτιολογικός παράγοντας για αρκετές ασθένειες. Οι φυτικές πολυφαινόλες μπορούν να εξουδετερώνουν άμεσα τις ελεύθερες ρίζες δρώντας οι υδροξυλομάδες τους ως δότες ατόμων υδρογόνου (ή ηλεκτρονίων).¹¹³

Μια πολυφαινόλη για να θεωρηθεί ότι έχει αντιοξειδωτική δράση θα πρέπει να πληροί τις εξής προϋποθέσεις: i) όταν βρίσκεται σε μικρή συγκέντρωση σε σχέση με μια άλλη ουσία να μπορεί να αναστείλει ή να καθυστερήσει την οξείδωση αυτής της ουσίας, ii) η πολυφαινολική ρίζα που θα προκύψει μετά την αναστολή της οξείδωσης να είναι σταθερή.⁹⁹

Οι φυτικές πολυφαινόλες εκτός της αντιοξειδωτικής τους δράσης παρουσιάζουν και προ-οξειδωτική δράση, δηλαδή μπορεί να προκαλούν το σχηματισμό ΔΜΟ. Οι φυτικές πολυφαινόλες δρουν ως προ-οξειδωτικά κυρίως παρουσία ιόντων μεταβατικών μετάλλων όπως του Fe και του Cu.^{114,115} Η παραγωγή ΔΜΟ από τις φυτικές πολυφαινόλες πιστεύεται ότι οφείλεται στην ικανότητά τους να ανάγουν το Fe³⁺ ή το Cu²⁺ σε Fe²⁺ και Cu¹⁺ αντίστοιχα.¹¹⁶ Επιπλέον, έχει προταθεί ότι η αντίδραση των

πολυφαινολών με το Fe^{3+} ή το Cu^{2+} μπορεί να προκαλέσει και το σχηματισμό H_2O_2 , το οποίο παίρνει μέρος στην αντίδραση Fenton.¹¹⁷ Αυτή η προ-οξειδωτική δράση των πολυφαινολών είναι πιθανό να οδηγεί σε μεταλλαξιογένεση¹¹⁶ και άρα έχει προκαλέσει αμφιβολίες όσον αφορά τις θετικές επιδράσεις των πολυφαινολών. Από την άλλη πλευρά όμως πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι οι πολυφαινόλες προκαλούν απόπτωση μέσω της προ-οξειδωτικής δράσης σε καρκινικά κύτταρα ενώ δεν επηρεάζουν τα φυσιολογικά.^{118,119}

4.6 Αντιοστεοπορωτική δράση

Τα σταφύλια (*Vitis vinifera*) είναι ένα από τα πιο ευρέως καταναλωθέντα φρούτα παγκοσμίως και είναι πλούσια σε πολυφαινόλες. Παρόλο που ο μηχανισμός των ευεργετικών επιδράσεων των πολυφαινολών των σταφυλιών στην υγεία παραμένει ασαφής, αρκετές ενδείξεις υποδεικνύουν έντονα ότι δεν δρουν μέσω δέσμευσης των υποδοχέων οιστρογόνων.¹²⁰⁻¹²² Οι πολυφαινόλες των σταφυλιών είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά με μεγαλύτερη ισχύ από την βιταμίνη E και C.¹²³ Οι πολυφαινόλες, εκτός από την αντιοξειδωτική δράση, έχουν συνδεθεί επιδημιολογικά με βελτίωση της υγείας των οστών¹²⁴ και δράση ανάλογη των οιστρογόνων.^{101,125,126}

Μία μελέτη που διενεργήθηκε σε Αυστραλούς άνδρες, συσχέτισε θετικά την κατανάλωση ερυθρού οίνου με την αύξηση της BMD στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης, σε διάστημα 2 ετών.¹²⁷ Μία άλλη έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε γυναίκες ηλικίας 18-79 ετών, έδειξε πως η πρόσληψη συνολικών φλαβονοειδών, ανθοκυανινών, φλαβονολών και φλαβονοειδών αύξησε την BMD της σπονδυλικής στήλης, επιπρόσθετα η πρόσληψη ανθοκυανίνης συνδέθηκε θετικά με αύξηση της BMD στο ισχίο.¹²⁸ Ενώ, στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, η πρόσληψη φλαβονολίνης,

κατεχίνης και ολικού φλαβονοειδούς συνδέθηκε με αύξηση της BMD στον αυχένα του μηριαίου οστού.¹²⁹

Η χορήγηση πολυφαινόλων από σταφύλια σε Ζώα Εργαστηρίου ανέδειξε βελτίωση της σκελετικής τους υγείας. Η κερκετίνη,¹³⁰ η καμφερόλη,¹³¹ η ρεσβερατρόλη¹³² και οι κατεχίνες¹³³ προστατεύουν από την απώλεια οστικής μάζας σε πειραματικό πρότυπο ωοθηκεκτομημένου επίμυ. Στους επίμυες με ένδεια ασβεστίου, η προσθήκη εκχυλίσματος προανθοκυανιδίνης από σπόρους σταφυλιού σε μια πλούσια σε ασβέστιο διατροφή, αποκαθιστά την οστική περιεκτικότητα και αντοχή, σε σημαντικά μεγαλύτερο βαθμό σε σύγκριση με την διατροφή πλούσια σε ασβέστιο μόνο.¹³⁴

Οι Muhlbauer et al.¹³⁵ έδειξαν πως η κατανάλωση κρασιού, από το οποίο είχε αφαιρεθεί το αλκοόλ, μειώνει σημαντικά την οστική απορρόφηση σε επίμυες. Οι Hohman και Weaver¹³⁶ μελέτησαν την οστική πυκνότητα (BMD) των επίμυων μετά από 8 εβδομάδες διατροφή πλούσιας σε σταφύλια, και κατέληξαν πως οι επίμυες που έλαβαν την εμπλουτισμένη με σταφύλια διατροφή αύξησαν κατά 44% την διατήρηση ασβεστίου σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Δεν παρουσιάστηκαν όμως διαφορές στην BMC του μηριαίου οστού και στην μικροαρχιτεκτονική του σπογγώδους οστού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

5.1 Προτερήματα πειραματικών μελετών έναντι των κλινικών μελετών

Οι κλινικές μελέτες για την έρευνα της οστεοπόρωσης παρουσιάζουν ορισμένους περιορισμούς. Η συστηματική νόσος εμφανίζεται σε προχωρημένη ηλικία και για την παρακολούθηση των ασθενών που υποβάλλονται σε θεραπεία, καθώς και για την αξιολόγησή της, απαιτείται μακράς διάρκειας χρονική περίοδος. Επιπρόσθετα, κατά τη διάρκεια μακροχρόνιων μελετών αρκετοί ασθενείς αποσύρονται από τη μελέτη για πληθώρα λόγων, όπως π.χ. λόγω παρενεργειών της θεραπείας, λόγω μη συμμόρφωσης προς τη θεραπεία, λόγω αποχώρησης ασθενών χωρίς αναφορά σε συγκεκριμένη αιτία ή λόγω θανάτου, κάνοντας τη μελέτη να τελειώνει με λιγότερους συμμετέχοντες από τους αρχικούς και δημιουργώντας προβλήματα στη στατιστική αξιολόγηση. Είναι σύνηθες, αρκετοί από την αρχική δεξαμενή ασθενών κατά την διάρκεια της ζωής τους να έχουν πολύ διαφορετικό τρόπο ζωής, ο οποίος επηρεάζει τη σκελετική υγεία, όπως για παράδειγμα η διαίτα, η άσκηση και το κάπνισμα, ή τυχόν συνοδά νοσήματα, για τα οποία λαμβάνουν κάποια φαρμακευτική αγωγή, και έτσι να μην πληρούν τα κριτήρια συμμετοχής.⁴¹

Αντίθετα, οι πειραματικές μελέτες σε ζώα πλεονεκτούν στα εξής σημεία: ο κύκλος ζωής τους είναι μικρότερος από τον άνθρωπο και έτσι μπορεί σε σύντομο χρονικό διάστημα να γίνει πειραματική πρόκληση οστεοπόρωσης και να μελετηθεί μια δυναμική θεραπεία. Υπάρχει η δυνατότητα τα ίδια τα ζώα να αποτελέσουν την ομάδα ελέγχου τους, με την παρακολούθησή τους από πριν την έναρξη της θεραπείας μέχρι την ολοκλήρωσή της, μειώνοντας τον αριθμό των ζώων που απαιτούνται. Υπό αυτές τις συνθήκες, είναι εφικτό να διεξαχθεί σε βραχύ χρονικό διάστημα μελέτη, με μικρό αριθμό

ζώων, όπου το αποτέλεσμα της θεραπείας εκτιμάται για τις πιθανές αλλαγές των παραμέτρων μετρούμενες στα ίδια ζώα και εξάγει αξιόπιστα αποτελέσματα.

Επιπλέον, τα Ζώα Εργαστηρίου που εκτρέφονται σκοπό να χρησιμοποιηθούν σε πειραματικές έρευνες αποτελούν ομοιογενή ομάδα με ίδιο γενετικό υπόβαθρο, υπάρχει η δυνατότητα ο ερευνητής να επιλέξει το είδος, τις ηλικίες ή το φύλο που ενδείκνυται για τη συγκεκριμένη μελέτη.^{137,138} Το επίπεδο υγείας τους είναι γνωστό και ελεγχόμενο και να παραμένει σταθερό καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης με τον κατάλληλο εξοπλισμό, είτε τα ζώα είναι π.χ. αζενικά (germ-free), είτε απαλλαγμένα συγκεκριμένων παθογόνων (specific pathogen-free) είτε συμβατικής στέγασης (conventional). Επιπρόσθετα, στα ζώα μπορούν να δοκιμαστούν τολμηρά θεραπευτικά σχήματα ως προς τη δοσολογία και τη διάρκεια χορήγησης των φαρμάκων, τα οποία για ηθικούς και επιστημονικούς λόγους δεν θα μπορούσαν να δοκιμαστούν στον άνθρωπο. Επιπλέον είναι δυνατόν, εκτός της μη επεμβατικής διαχρονικής παρακολούθησης με απεικονιστικές μεθόδους οστικής πυκνομετρίας να ληφθούν οστικά δείγματα *ex vivo* σε κατάλληλα χρονικά διαστήματα ώστε να γίνει και διαχρονική ποιοτική εκτίμηση των οστών με επεμβατικές μεθόδους, όπως είναι η οστική ιστομορφομετρία και η δοκιμή μηχανικής αντοχής.¹³⁹

5.2 Ηθικό πλαίσιο

Όλα τα ερευνητικά πρωτόκολλα θα πρέπει να υπόκειται διαρκώς σε ηθική αξιολόγηση. Η ηθική αξιολόγηση όλων των πειραματισμών με Ζώα Εργαστηρίου είναι υποχρεωτική από την νομοθεσία, καθώς και η λειτουργία της Επιτροπής Ηθικής και Δεοντολογίας σε κάθε εγκατάσταση εκτροφής, προμήθειας και χρήσης Ζώων Εργαστηρίου. Για τη διεξαγωγή πρωτοκόλλων σε Ζώα Εργαστηρίου πρέπει να

λαμβάνονται υπόψη από τον σχεδιασμό του πειράματος, τα παρακάτω στοιχεία με σκοπό την εφαρμογή των αρχών των τριών R (Replacement, Reduction, Refinement).⁴¹

α) η πιθανότητα πως η συγκεκριμένη ερευνητική εργασία μπορεί να διενεργηθεί με τη χρήση εναλλακτικών μεθόδων χωρίς τη χρήση ζωντανών ζώων εργαστηρίου, χρησιμοποιώντας διεθνώς πιστοποιημένες μεθόδους, όπως π.χ. δοκιμές δερματοξικότητας ή παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων με τη χρήση κυτταροκαλλιιεργειών.¹⁴⁰⁻¹⁴³

β) από την σκοπιά του ερευνητή να διερευνάται η ορθή ανάλυση του προβλεπόμενου οφέλους της μελέτης στην υγεία του ανθρώπου, των ζώων ή τους περιβάλλοντος, σε σύγκριση με τις βλάβες που πρόκειται να υποστούν τα ζώα που θα χρησιμοποιηθούν (harm/benefit analysis).¹¹¹⁻¹¹³

γ) αν και σε ποιο βαθμό υπάρχει τεκμηριωμένη πρόβλεψη για τη μελλοντική εφαρμογή των αποτελεσμάτων της έρευνας στην πράξη και τη μέγιστη δυνατή αξιοποίηση αυτών

δ) αν και σε ποιο βαθμό μειώνεται η ταλαιπωρία των ζώων όσο αυτό είναι δυνατό και διασφαλίζεται η ευζωία τους με την εφαρμογή των τριών R (Replacement, Reduction, Refinement), την εξασφάλιση του καλύτερου δυνατού περιβάλλοντος διαβίωσης και φροντίδας των ζώων, και

ε) την επαρκή και αποτελεσματική εκπαίδευση, επίβλεψη και διαχείριση όλων των κατηγοριών του εμπλεκόμενου προσωπικού.¹⁴⁴

Με την εφαρμογή της Οδηγίας 2010/63/ΕΕ θεσμοθετήθηκαν ενιαίες διαδικασίες. Η ηθική αξιολόγηση γίνεται σε πολλά επίπεδα: από τον ίδιο τον ερευνητή στη συγγραφή του πρωτοκόλλου του, από την Επιτροπή Ηθικής Αξιολόγησης της Εγκατάστασης Εκτροφής και της Εγκατάστασης Πειραματισμού, και από την ανωτέρα Κρατική Αρχή

η οποία ελέγχει και αδειοδοτεί τα πρωτόκολλα. Στην πορεία της διεξαγωγής της μελέτης, θα γίνεται και συνεχής επανεκτίμησή της. Ας σημειωθεί ότι όλες οι μελέτες που χρησιμοποιούν πρωτεύοντα και οι μελέτες που περιέχουν διαδικασίες ταξινομημένες ως «βαριές» θα υφίστανται και αναδρομική αξιολόγηση: δηλαδή μετά το πέρας τους, θα αξιολογηθούν αν επιτεύχθηκαν οι στόχοι τους, και ποια τελικά ήταν η βλάβη που προκλήθηκε στα ζώα, συμπεριλαμβανομένου του αριθμού και των ειδών των ζώων που χρησιμοποιήθηκαν και της δριμύτητας των διαδικασιών που έλαβαν χώρα.

Η ηθική αξιολόγηση μιας πειραματικής μελέτης η οποία περιλαμβάνει τη χρήση Ζώων Εργαστηρίου αποτελεί μια δυναμική δραστηριότητα, που θα πρέπει να εφαρμόζεται υπεύθυνα και ευσυνείδητα σε όλη τη διάρκεια της μελέτης, τόσο από τους ερευνητές και τους φροντιστές των ζώων, όσο και από τον Υπεύθυνο Κτηνίατρο και τις ελεγκτικές αρχές, για την προστασία της ευζωίας των ζώων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΠΡΟΤΥΠΩΝ

6.1 Κριτήρια επιλογής ζωικού προτύπου για τη θεραπεία της οστεοπόρωσης

Πολλά από τα επιστημονικά επιτεύγματα που έχουν πραγματοποιηθεί στη θεραπεία της οστεοπόρωσης και έχουν εισαχθεί στην κλινική πρακτική αφού προηγουμένως έχουν μελετηθεί σε διάφορα Ζωικά Πρότυπα ανθρώπινων νοσημάτων.^{41,145} Τα Ζωικά Πρότυπα παρέχουν μεγαλύτερη ομοιογένεια από τους ανθρώπους και τη δυνατότητα για εκτεταμένες δοκιμές σε πιθανές θεραπείες. Για την επιλογή του κατάλληλου Ζωικού Προτύπου λαμβάνονται υπόψη κάποιες βασικές προϋποθέσεις: θα πρέπει να αναπαράγουν με αξιοπιστία το νόσημα, να είναι εύκολα διαθέσιμα στα ερευνητικά κέντρα, να είναι ευάγωγα και προσαρμόσιμα στους πειραματικούς χειρισμούς, το κόστος απόκτησης και συντήρησης να είναι εύλογα χαμηλό. Το μέγεθος των Ζωικών Προτύπων είναι ένας σημαντικός παράγοντας στο σχεδιασμό και στην εκτέλεση των πειραματικών μελετών.

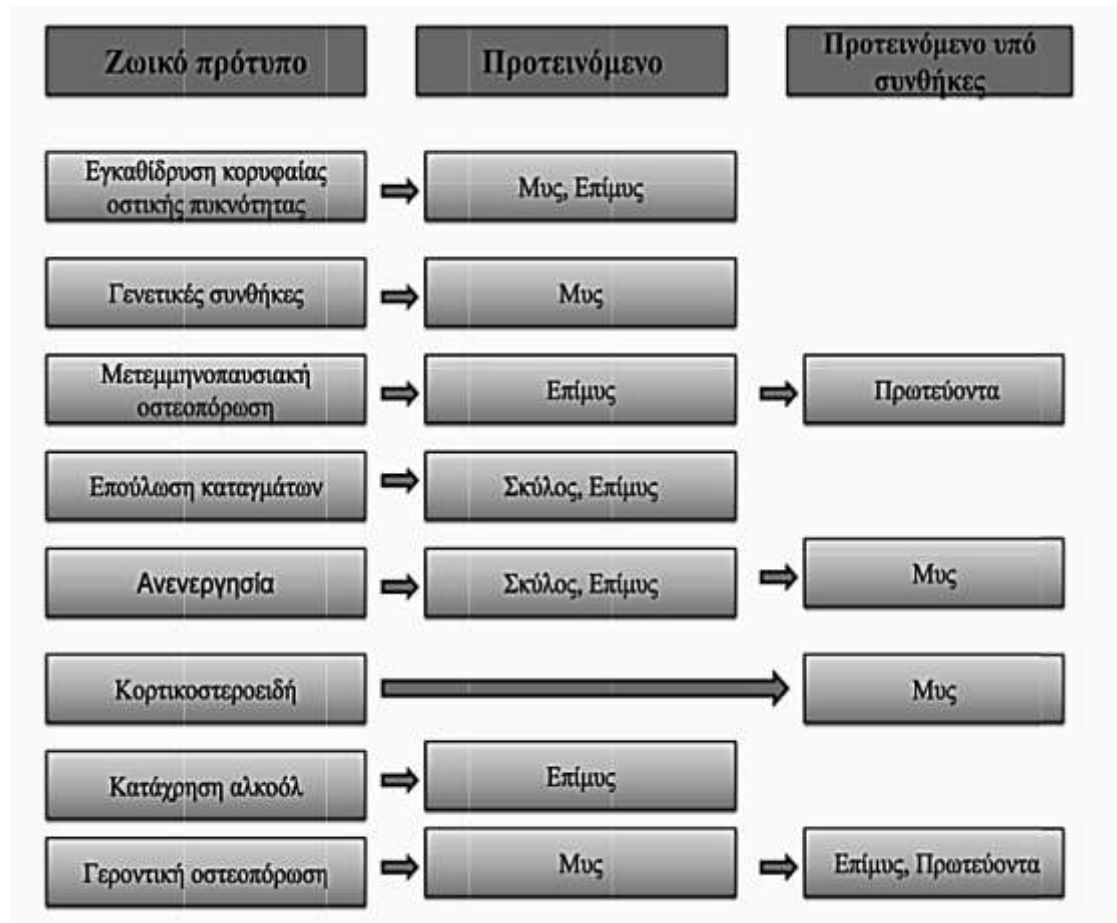
Τα μικρόσωμα ζώα επιτρέπουν μεγαλύτερη ευελιξία όσον αφορά στην στέγασή τους, γιατί μπορούν να συστεγαστούν πολλά μαζί και να σχηματίσουν ομάδες από τις οποίες να εξαχθούν στατιστικά ισχυρά και σημαντικά ευρήματα. Τα μεγαλόσωμα Ζωικά Πρότυπα, έχουν εξίσου ισχυρά πλεονεκτήματα, όπως η ευκολία λήψης βιολογικού υλικού (αίμα, ούρα, οστικές βιοψίες) καθώς και η μεγαλύτερη ευχέρεια πραγματοποίησης χειρουργικών παρεμβάσεων.

Μια σημαντική ηθική παράμετρος που θα οφείλουμε να εξετάσουμε είναι η κοινωνική αποδοχή των πειραματικών πρωτοκόλλων, τόσο ως προς τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται, όσο και ως προς το ζωικό είδος στο οποίο εφαρμόζονται.¹³⁹ Όσον αφορά στην αξιόπιστη αναπαραγωγή της οστεοπόρωσης στα Ζωικά Πρότυπα, θα πρέπει να γνωρίζουμε, για το κάθε ζωικό είδος ξεχωριστά, τις ακόλουθες ιδιαιτερότητες του σκελετού του: 1) το ορμονικό προφίλ του οιστρικού κύκλου 2) την ηλικία απόκτησης κορυφαίας οστικής πυκνότητας 3) την ύπαρξη ή μη ηλικιοεξαρτώμενης οστικής απώλειας 4) την ύπαρξη ή μη οιστρογονοεξαρτώμενης οστικής απώλειας και αντιστροφής της με τη χορήγηση οιστρογόνων 5) την ύπαρξη ή μη αυθόρμητων ή χαμηλής έντασης καταγμάτων 6) την ύπαρξη επιπλεκόντων παραγόντων που έπονται της ωοθηκεκτομής (αυξημένη όρεξη, πρόσληψη βάρους).

Το σημαντικότερο μειονέκτημα στην πλειοψηφία των Ζωικών Προτύπων που χρησιμοποιούνται για την έρευνα της οστεοπόρωσης είναι η αδυναμία πρόκλησης αυθόρμητων ή χαμηλής έντασης καταγμάτων. Θα ήταν προτιμότερο να αναφερόμαστε σε Ζωικά Πρότυπα αναπαραγωγής οστεοπενίας και όχι οστεοπόρωσης. Παρόλα αυτά αν λάβουμε υπόψιν τον ορισμό του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας ότι η οστεοπόρωση είναι παρούσα σε άτομα των οποίων η οστική πυκνότητα είναι μικρότερη των 2.5 μονάδων σταθερής απόκλισης από τον μέσο όρο υγιών ενήλικων ατόμων, τότε αυτή είναι μια συνθήκη η οποία μπορεί να προκληθεί με πειραματικούς χειρισμούς στα Ζωικά Πρότυπα. Ζωικά είδη που έχουν χρησιμοποιηθεί στην έρευνα της οστεοπόρωσης είναι τα πρωτεύοντα, τα πρόβατα, οι χοίροι, οι σκύλοι, οι κόνικλοι, οι επίμυες και οι μύες.¹³⁹

Η επιλογή του κατάλληλου ζωικού είδους εξαρτάται τόσο από το πρωτόκολλο πρόκλησης της οστεοπόρωσης, όσο και από τα ζωοτεχνικά χαρακτηριστικά του κάθε είδους.⁴¹ Στην **Εικόνα 6** παρουσιάζεται ο αλγόριθμος με τα προτεινόμενα και τα υπό

συνθήκες προτεινόμενα Ζωικά Πρότυπα που χρησιμοποιούνται στην έρευνα της οστεοπόρωσης.

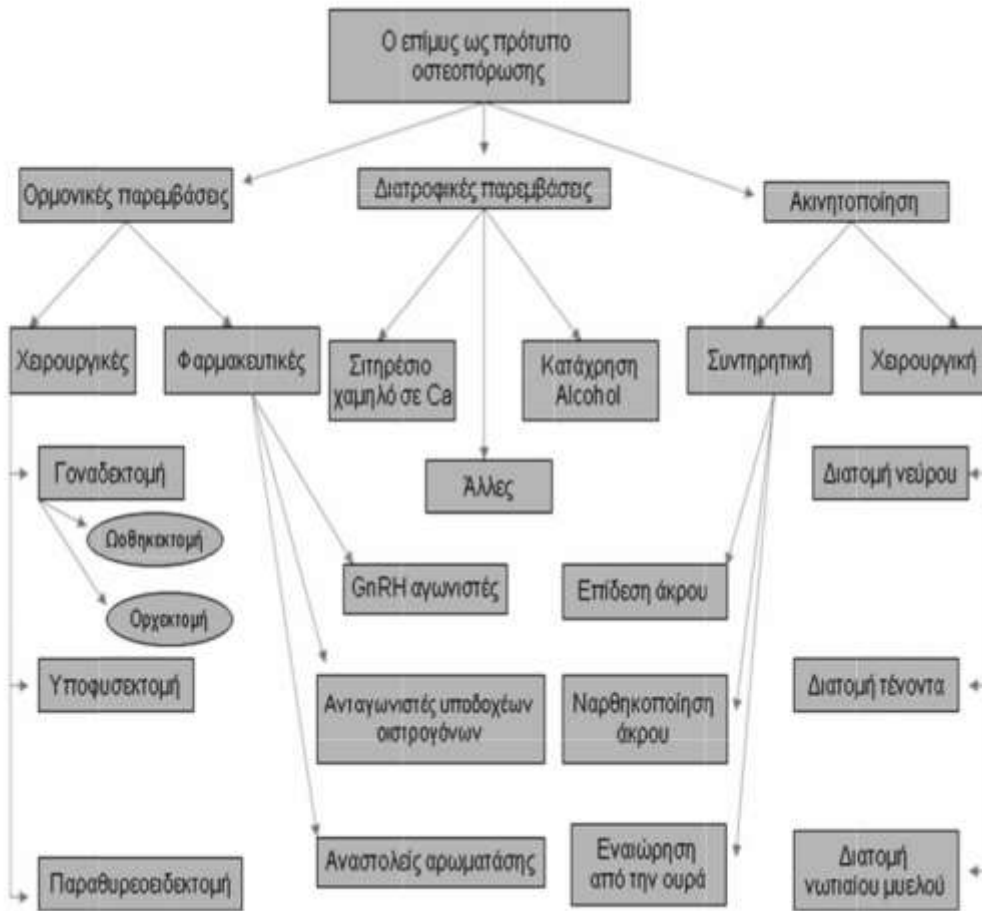


Εικόνα 6: Αλγόριθμος των προτεινόμενων και υπό συνθήκες προτεινόμενων Ζωικών Προτύπων στην έρευνα της οστεοπόρωσης (Τροποποιημένη από τους Lelovas et al., 2008).

6.2 Πρότυπα πρόκλησης οστεοπόρωσης στον επίμυ

Η πρόκληση οστεοπενίας στον επίμυ έχει επιτευχθεί με διάφορες πειραματικές παρεμβάσεις (Εικόνα 7). Ο ρυθμός οστικής απώλειας στον αρσενικό και στο θηλυκό επίμυ είναι στενά εξαρτημένος από τη μέθοδο που χρησιμοποιείται για να προκληθεί οστεοπόρωση, από τα σημεία των οστών που θα εκτιμηθούν καθώς και από το αν η απώλεια οστικής μάζας αφορά το σπογγώδες ή το φλοιώδες οστό.¹⁴⁵ Όλα τα πειραματικά

πρωτόκολλα πρόκλησης οστεοπόρωσης μπορεί να εφαρμοστούν είτε σε σκελετικά ώριμους είτε σε σκελετικά ανώριμους επίμυες.¹⁴⁶ Παρόλο που οι επίμυες φτάνουν σε σεξουαλική ωριμότητα στην ηλικία των 2.5 μηνών, θεωρούνται σκελετικά ώριμοι μετά την ηλικία των 10 μηνών.^{41,145}



Εικόνα 7: Αλγόριθμος των πειραματικών παρεμβάσεων που χρησιμοποιούνται για την εγκατάσταση οστεοπενίας/οστεοπόρωσης στον επίμυ (Τροποποιημένη από τους Lelovas et al., 2008).

Σε περίπτωση που τα πρωτόκολλα πρόκλησης οστεοπόρωσης εφαρμοστούν σε σκελετικά ανώριμους επίμυες, τότε ελέγχονται οι συνθήκες που θεωρούνται ότι αποτελούν παράγοντες υψηλού κινδύνου για εκδήλωση οστεοπορωτικών καταγμάτων στον άνθρωπο, δηλαδή οι συνθήκες εκείνες που εμπλέκονται στην απόκτηση κορυφαίας

οστικής πυκνότητας. Αυτή η ιδιότητα κάνει τον σκελετικά ανώριμο επίμυ κατάλληλο πρότυπο για την έρευνα των ενδοκρινικών, περιβαλλοντικών και διατροφικών παραγόντων που μπορεί να εμπλέκονται στην απόκτηση κορυφαίας οστικής πυκνότητας. Αντίθετα, κατάλληλο πρότυπο για τη μελέτη της μετεμμηνοπαυσιακής και της οστεοπόρωσης από ανενεργησία είναι ο σκελετικά ώριμος επίμυ.⁴¹

6.3 Το πρότυπο του ωοθηκεκτομημένου επίμυος

Σχεδόν αμέσως μετά την ωοθηκεκτομή, ο επίμυ παρουσιάζει ταχύτατη απώλεια οστικής μάζας και αντοχής του σπογγώδους οστού, η οποία στη συνέχεια ακολουθείται από μικρότερο ρυθμό οστικής απώλειας.¹⁴⁷⁻¹⁵⁰ Τα οστά του, παρουσιάζουν αυξημένο ρυθμό οστικής ανακατασκευής, ο οποίος είναι διαφορετικός σε συγκεκριμένα σημεία των οστών.¹⁴⁵ Τα χαρακτηριστικά αυτής της οστικής απώλειας προσομοιάζουν με τις οστικές αλλαγές που παρατηρούνται στον άνθρωπο μετά από ωοθηκεκτομή ή μετά την εμμηνόπαυση.¹⁵¹ Ο χρόνος που απαιτείται για να παρατηρηθεί στατιστικά σημαντική απώλεια στο σπογγώδες οστό είναι για την εγγύς μετάφυση της κνήμης 14 ημέρες, για τους οσφυϊκούς σπονδύλους 60 ημέρες και για τον αυχένα του μηριαίου 30 ημέρες. Ο χρόνος που απαιτείται για το σπογγώδες οστό να ισορροπήσει από τον οστικό σχηματισμό, είναι για την εγγύς μετάφυση της κνήμης 90 ημέρες ενώ για τους οσφυϊκούς σπονδύλους και για τον αυχένα του μηριαίου 270 ημέρες.^{149,150} Αντίθετα η ωοθηκεκτομή δεν προκαλεί οστική απώλεια στο σπογγώδες οστό των επιφύσεων των μακρών οστών, στην άπω μετάφυση της κνήμης και στους κοκκυγικούς σπονδύλους.^{152,153} Σε αντίθεση με το φλοιώδες οστό των διαφύσεων των μακρών οστών, η ωοθηκεκτομή διεγείρει την περιοστική ανάπτυξη.¹⁵⁴ Ταυτόχρονα όμως στην ενδοοστική επιφάνεια των διαφύσεων των μακρών οστών του ωοθηκεκτομημένου επίμυος παρατηρείται αυξημένη οστική απορρόφηση, η οποία οδηγεί στη διεύρυνση του μεγέθους της μυελικής κοιλότητας.¹⁵⁴⁻

¹⁵⁷ Οι αντίρροπες αυτές δράσεις έχουν σαν συνέπεια οι αλλαγές να επέρχονται αργά στο φλοιώδες οστόν, έτσι ώστε στη διάφυση του μηριαίου να μη παρατηρούνται αλλαγές στη BMC ακόμη και μετά την πάροδο 540 ημερών μετά την ωθηκεκτομή.¹⁴⁷ Αυτό συμβαίνει γιατί η οστική απώλεια στην ενδοοστική επιφάνεια αντισταθμίζεται από σχηματισμό οστού περιοστικά. Συνεπώς ένας ευαίσθητος δείκτης για την εκτίμηση της οστικής απώλειας θα ήταν η εκτίμηση του πάχους του έσω 1/2 ή 1/3 του παρακείμενου προς τον μυελό φλοιού.^{156,157}

Οι Danielsen et al. πρότειναν τη διαίρεση της διάφυσης των μακρών οστών του επίμυος σε 2 ζώνες.¹⁵⁷ Οι Danielsen et al. ανέφεραν πως η μείωση στο πάχος της έσω ζώνης της μηριαίας διάφυσης (έσω μισό του μέσου της διάφυσης) στους 3 μήνες μετά την ωθηκεκτομή. Οι πρωιμότερες αναφερόμενες αλλαγές στο εύρος του φλοιώδους οστού και της μυελικής κοιλότητας είναι μεταξύ 90-120 ημερών ενώ η επίτευξη σταθερής κατάστασης επέρχεται μετά από πάροδο 180 ημερών ή και παραπάνω.¹⁵⁷

Όπως προαναφέρθηκε ο επίμυος, όπως άλλωστε και τα περισσότερα Ζωικά Πρότυπα οστεοπενίας/οστεοπόρωσης, δεν παρουσιάζει αυτόματα ή χαμηλής έντασης κατάγματα. Αυτό το μειονέκτημα μπορεί να υπερκερασθεί με τις μηχανικές δοκιμές των οστών, που επιθυμούμε να εκτιμήσουμε με την μηχανική τους αντοχή, όπως η διάφυση του μηριαίου, οι οσφυϊκοί σπόνδυλοι και ο αυχέννας του μηριαίου.

Σημαντικές αλλαγές στη μηχανική αντοχή του σπογγώδους οστού των οσφυϊκών σπονδύλων επέρχονται το 3^ο μήνα μετά την ωθηκεκτομή, ενώ στο φλοιώδες οστόν της διάφυσης του μηριαίου μετά τους 9 μήνες. Αντίθετα, για το φλοιώδες οστόν του αυχένα του μηριαίου οι αλλαγές αυτές γίνονται εμφανείς από τον 3^ο μήνα μετά την ωθηκεκτομή.^{158,159}

Εναλλακτικές μέθοδοι της ωοθηκεκτομής που οδηγούν σε απώλεια οστικής μάζας είναι η χορήγηση φαρμακευτικών παραγόντων όπως αγωνιστές της απελευθερωτικής ορμόνης των γοναδοτροπινών¹⁶⁰ ανταγωνιστές των υποδοχέων οιστρογόνων¹⁶¹ και αναστολείς της αρωματάσης¹⁶² τα αποτελέσματα των οποίων, στην οστική πυκνότητα, είναι αναστρέψιμα μετά το πέρας της χορήγησής τους.⁴¹ Αυτοί οι φαρμακευτικοί παράγοντες, οι οποίοι χρησιμοποιούνται στον άνθρωπο για τη θεραπεία της ενδομητρίωσης και του καρκίνου του μαστού, σχετίζονται με αυξημένη οστική απώλεια. Η χορήγηση αγωνιστών της απελευθερωτικής ορμόνης των γοναδοτροπινών δημιουργεί ένα υπογοναδοτροφικό-υπογοναδικό πρότυπο, ενώ η χορήγηση ανταγωνιστών των υποδοχέων οιστρογόνων και των αναστολέων της αρωματάσης ένα υπεργοναδοτροφικό-υπογοναδικό πρότυπο οστεοπόρωσης.¹⁶³ Ο επίμυς έχει επίσης χρησιμοποιηθεί και σαν πρότυπο για τη μελέτη της οστεοπόρωσης που προκαλείται μετά από χορήγηση γλυκοκορτικοειδών με αντικρουόμενα όμως αποτελέσματα. Κάποιες μελέτες αδυνατούσαν να ανιχνεύσουν οστική απώλεια σε σκελετικά ώριμους επίμυες μετά τη χορήγηση γλυκοκορτικοειδών, ενώ σε άλλες διαπιστώθηκε δόσοεξαρτώμενη οστική απώλεια. Δεν υπάρχουν μέχρι σήμερα επαρκείς ενδείξεις ότι ο επίμυς είναι ένα κατάλληλο πρότυπο για την ακριβή αναπαραγωγή της προκαλούμενης από γλυκοκορτικοειδή οστεοπενίας στον άνθρωπο.^{41,145}

6.4 Οστικές ανατομικές ομοιότητες μεταξύ επίμυ - ανθρώπου

Η ιστολογία και η ανατομία του σκελετού του επίμυ παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με το σκελετό του ανθρώπου. Τα μακρά οστά στον άνθρωπο και στον επίμυ επιμηκύνονται με επιφυσιακή ανάπτυξη (ενδοχόνδρια οστεοποίηση - endochondral ossification) και αυξάνονται εγκάρσια με περιοστική ανάπτυξη (δευτερογενής

ενδομεμβρανική οστεοποίηση - secondary intramembranous ossification). Η αξονική ανάπτυξη τόσο στον άνθρωπο όσο και στους επίμυες επιβραδύνεται στην ενήλικη ζωή.

Η οστική ανακατασκευή της σπογγώδους ουσίας στους επίμυες ομοιάζει με εκείνη του ανθρώπου. Οι ωοθηκεκτομηθέντες επίμυες παρουσιάζουν τις ίδιες μεταβολές στη σπογγώδη ουσία, όμοιες με εκείνες των γυναικών σε εμμηνόπαυση ή σε γήρας. Η οστική απώλεια του επίμου σε έλλειψη οιστρογόνων είναι όμοια με εκείνη του ανθρώπου. Παρατηρείται αυξημένος ρυθμός οστικής ανακατασκευής. Η οστική απορρόφηση υπερέχει της οστικής παραγωγής ενώ παράλληλα εμφανίζεται σημαντική απώλεια της μάζας και της συνεκτικότητας του σπογγώδους οστού σε σχέση με το φλοιώδες.¹⁶⁴

6.5 Οστικές ανατομικές διαφορές μεταξύ επίμου - ανθρώπου

Οι βασικές διαφορές στη μορφολογία των οστών των επίμων είναι η παρουσία ανοικτών επιφύσεων ακόμη και σε προχωρημένη ηλικία (12-24 μήνες). Παρατηρείται περιορισμένη ενδοφλοιϊκή οστική ανακατασκευή. Ωστόσο ο ρυθμός οστικής ανακατασκευής είναι μεγαλύτερος στον επίμου λόγω παρουσίας αιμοποιητικού μυελού των οστών στις περισσότερες σκελετικές θέσεις καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής των επίμων.

Η αυξητική πλάκα στην επίφυση της κνήμης αρσενικών επίμων συγκλίνει με οστική γεφύρωση τον 8^ο μήνα ζωής, ενώ των θηλυκών τον 10^ο.¹⁶⁵ Επιπλέον η κατά μήκος γεφύρωση της αυξητικής πλάκας δεν επιτρέπει την περαιτέρω αύξηση του οστού.¹⁶⁶

Ενδοκρινείς παράγοντες του μικροπεριβάλλοντος του οστού ρυθμίζουν την εξελικτική πορεία σύγκλισης της αυξητικής πλάκας. Οι επίμυες στερούνται αβερσιανών συστημάτων γεγονός που καθιστά αδύνατη την μελέτη της επίδρασης της ωοθηκεκτομής στη φλοιώδη μοίρα του οστού.¹⁶⁶⁻¹⁶⁸

Με την αναστολή της οστεοκλαστικής φάσης των βασικών πολυκύτταρων μονάδων (BMUs) εξασφαλίζεται η αναδιαμόρφωση του οστού, ενώ αντιεπαναρροφητικοί παράγοντες μειώνουν τη συχνότητα της ενεργοποίησης των νέων μονάδων οστεογένεσης, δηλαδή αυξάνουν τον χρόνο κατά τον οποίον βασικές δομικές οστικές μονάδες μπορούν να υποβάλλονται σε δευτερογενή ασβεστοποίηση. Έτσι, αυτά τα φάρμακα ενεργούν κυρίως για τη σταθεροποίηση της οστικής μάζας και δεν έχουν σημαντικές επιπτώσεις στο σχηματισμό οστού.¹⁶⁴

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο

ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η προληπτική θεραπεία της οστεοπόρωσης στοχεύει στην αναστολή της οστικής απορρόφησης ή διέγερση της οστικής αναδόμησης.¹² Τα τελευταία χρόνια υπάρχει συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις πολυφαινόλες, λόγω της αντιοξειδωτικής και της ήπιας οιστρογονικής τους δράσης.^{125,169} Οι αντιοξειδωτικές ουσίες μειώνουν τη φλεγμονή και ρυθμίζουν την οστεοβλαστογένεση, την οστεοκλαστογένεση και την οστεοανοσολογική δραστηριότητα.^{170,171}

Προηγούμενες μελέτες εστιάστηκαν στην επίδραση της σόγιας στην θεραπεία της οστεοπόρωσης λόγω ένδειας οιστρογόνων.^{126,172,173} Νεότερες έρευνες μελέτησαν την αντιοστεοπορωτική δραστηριότητα του πράσινου τσαγιού,^{174–176} του δαμάσκηνου^{173,177–181} και του μύρτιλου.^{182–184}

Κι ενώ έχει πραγματοποιηθεί αξιοσημείωτη έρευνα για την πιθανή ευεργετική επίδραση στην οστεοπόρωση ορισμένων φρούτων και λαχανικών, όπως το δαμάσκηνο, η σόγια και το μύρτιλο, τα συστατικά του σταφυλιού δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς.^{128,135,185,186} Τρεις μελέτες έχουν δείξει ότι τα εκχυλίσματα σταφυλιών είναι πολλά υποσχόμενα για τη διατήρηση ή την ενίσχυση της κατακράτησης ασβεστίου στα οστά,^{134,187,188} κάποιες άλλες έχουν δείξει οφέλη μειώνοντας τον κύκλο της οστικής ανακατασκευής, αλλά η επίδραση της κατανάλωσης σταφυλιών στην υγεία των οστών δεν έχει προσδιοριστεί πλήρως.^{134,189} Μέχρι στιγμής, δεν υπάρχουν στοιχεία που να υποστηρίζουν την προστατευτική επίδραση της κατανάλωσης κόκκινου σταφυλιού στην οστική πυκνότητα, παρά την αντιοξειδωτική τους σύνθεση. Σκοπός αυτής της μελέτης

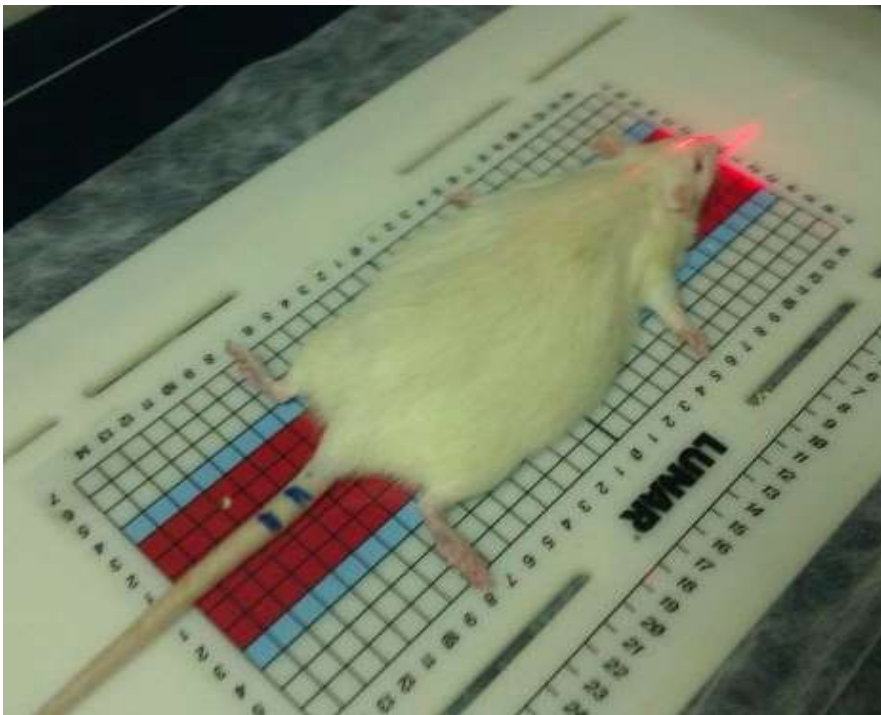
ήταν να εξετάσει την επίδραση του εκχυλίσματος πολυφαινολών του κόκκινου κρασιού (RWPs) στην οστική πυκνότητα και αντοχή σε πειραματικό πρότυπο ωοθηκεκτομημένου επίμυος, το οποίο είναι διεθνώς αποδεκτό πρότυπο για την μελέτη της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης.¹³⁹

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

8.1 Αρίθμηση επίμυων

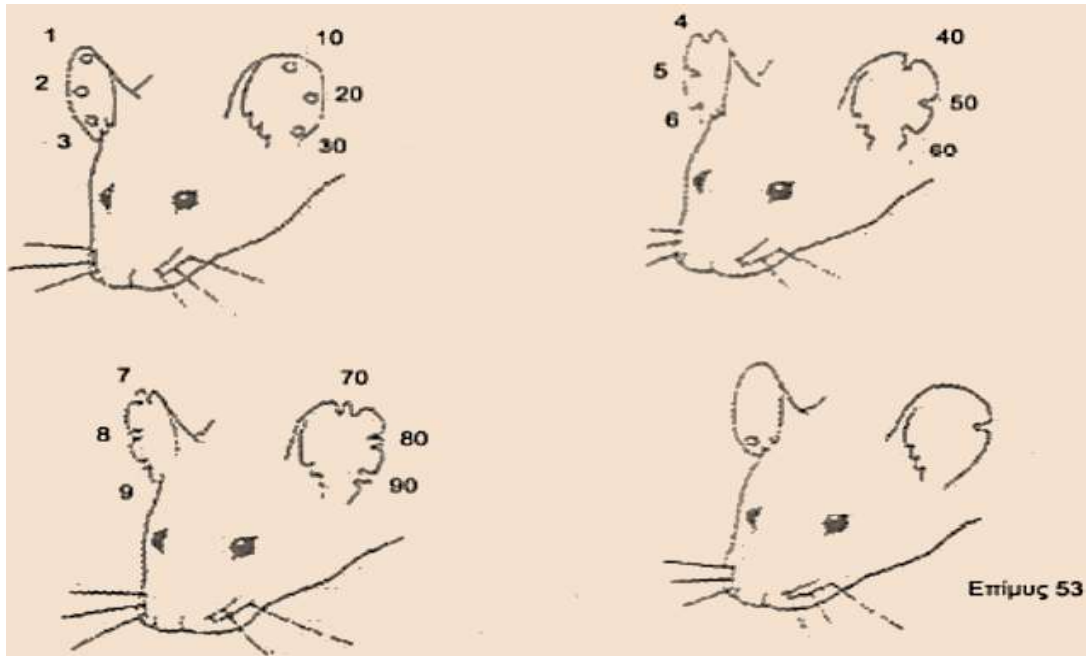
Πριν την έναρξη του πειράματος οι επίμυες αριθμήθηκαν προσωρινά. Η προσωρινή σήμανση διενεργήθηκε στις ουρές των ζώων. Στη βάση της ουράς οι γραμμές σήμανσης αντιπροσωπεύουν τις μονάδες, ενώ οι γραμμές στην άκρη, τις πεντάδες (**Εικόνα 8**).



Εικόνα 8: Μέθοδος προσωρινής αρίθμησης και ταυτοποίησης των επίμυων.

Κατά την πρώτη μέτρηση οστικής πυκνότητας και υπό αναισθησία πραγματοποιήθηκε η μόνιμη αρίθμηση των επίμυων. Για την αρίθμηση και την

ταυτοποίηση των ζώων, επιλέχθηκαν τα αυτιά των επίμυων. Η σήμανση των μονάδων διενεργήθηκε στο δεξί αυτί ενώ των πεντάδων στο αριστερό (εικόνα 9).



Εικόνα 9: Μέθοδος μόνιμης αρίθμησης και ταυτοποίησης των επίμυων.

8.2 Ζώα εργαστηρίου

Πενήντα ενήλικοι θηλυκοί επίμυες της φυλής Wistar ηλικίας δέκα μηνών αποκτήθηκαν από την Μονάδα Αναπαραγωγής, Εκτροφής και Πειραματισμού του Τμήματος Ζωικών Προτύπων Βιοϊατρικής Έρευνας του Ελληνικού Ινστιτούτου Pasteur (Αθήνα, Ελλάδα). Φιλοξενήθηκαν σε ειδικούς κλωβούς διαβίωσης επίμυων στο Εργαστήριο Έρευνας Παθήσεων Μυοσκελετικού Συστήματος Ιατρικής Σχολής του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Το πειραματικό πρωτόκολλο εγκρίθηκε από τη Γενική Διεύθυνση Κτηνιατρικών Υπηρεσιών της Νομαρχίας Αθηνών, με αριθμό πρωτοκόλλου 262/13-1-2011, σύμφωνα με την Ελληνική Νομοθεσία (Προεδρικό Διάταγμα 160/1991, σύμφωνα με την ισχύουσα τότε Οδηγία 86/609/ΕΟΚ).

Το σωματικό βάρος των επίμυων κυμαινόταν από 260 έως 330 g. Η στέγαση των επίμυων έγινε σε συνθήκες περιβάλλοντος που είναι σύμφωνες με τις προδιαγραφές που προβλέπονται από την Ευρωπαϊκή και Εθνική νομοθεσία καθώς και τις κατευθυντήριες γραμμές διεθνών οργανισμών όπως η Ευρωπαϊκή Ομοσπονδία των Εταιρειών που ασχολούνται με τα Ζώα Εργαστηρίου (FELASA) και το Διεθνές Συμβούλιο για την Επιστήμη των Ζώων Εργαστηρίου (ICLAS).

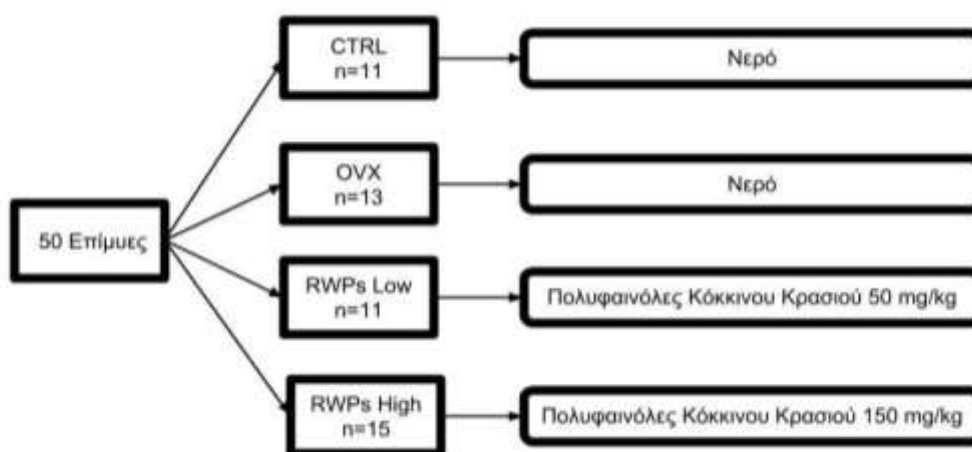
Ειδικότερα, οι επίμυες τοποθετήθηκαν ανά τέσσερις σε ειδικούς αεριζόμενους κλωβούς ανοιχτού τύπου (διαφανές πολυκαρβονικό 45 x 30 x 20 cm) στρωμένη από πριονίδι ξύλου. Συγκεκριμένα τα ζώα διατηρήθηκαν σε φωτοπερίοδο, 12 ώρες φως/ 12 ώρες σκοτάδι, σχετική υγρασία 55-65%, θερμοκρασία 19-22 °C και 15 αλλαγές αέρα ανά ώρα.

Το Εργαστήριο Έρευνας Παθήσεων Μυοσκελετικού Συστήματος της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, πληροί όλες τις σχετικές προδιαγραφές της Νομοθεσίας περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για πειραματικούς και άλλους επιστημονικούς σκοπούς (Προεδρικό Διάταγμα 160/91 σε εναρμόνιση με την Ευρωπαϊκή Οδηγία 86/609) καταχωρημένο με άδεια λειτουργίας EL 25 BIO 018.

8.3 Πειραματικές ομάδες

Οι επίμυες εγκλιματίστηκαν στο εργαστηριακό περιβάλλον για 1 μήνα πριν αρχίσει οποιαδήποτε εξέταση, παρέμβαση ή θεραπεία. Μετά την περίοδο προσαρμογής, χρησιμοποιώντας τυχαιοποιημένη δειγματοληψία, τα ηλικίας των 11 μηνών ζώα ταξινομήθηκαν σε τέσσερις ομάδες (**Σχήμα 15**). Έντεκα από τους 50 επίμυες αποτελούσαν την μη-ωοθηκεκτομημένη ομάδα ελέγχου (CTRL, n = 11). Σαράντα

επίμυες υποβλήθηκαν σε αμφίπλευρη ωθηκεκτομή. Από αυτούς, οι 13 επίμυες αποτελούσαν την ωθηκεκτομημένη ομάδα που δεν έλαβε θεραπεία (OVX, n = 13), οι 11 υποβλήθηκαν σε αγωγή με εκχύλισμα RWP σε συγκέντρωση 50 mg/kg (RWP Low, n = 11) και οι 15 έλαβαν το φυτικό εκχύλισμα RWP σε συγκέντρωση 150 mg/kg (RWP High, n = 15). Το μέγεθος του δείγματος προσδιορίστηκε με ειδικό λογισμικό (power analysis), χρησιμοποιώντας δεδομένα από προηγούμενες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας, που διερευνούσε την προστατευτική επίδραση των διαιτητικών παρεμβάσεων, στην επαγόμενη από την ωθηκεκτομή, οστεοπόρωση σε επίμυες.^{190,191}



Σχήμα 15: Σχεδιασμός Πειράματος.

8.4 Βάρος σώματος και πρόσληψη τροφής

Μετά την ωθηκεκτομή, όλοι οι επίμυες είχαν πρόσβαση *ad libitum* σε κυλινδροποιημένη στερεά τροφή χωρίς προσθήκη σόγιας/χαμηλή σε φυτοοιστρογόνα (pellet, τύπου 4RF21 GLP, Mucedola, Milanese, Italy). Η συγκεκριμένη δίαιτα χρησιμοποιήθηκε για την αποτροπή συγχύσεως από τις υπολειμματικές ισοφλαβόνες.¹⁷³

Δύο φορές την εβδομάδα προσδιοριζόταν η μέση ημερήσια πρόσληψη τροφής της

ομάδας CTRL. Η πρόσληψη τροφής της ομάδας CTRL τέθηκε σαν οδηγός και για την διατροφή των ωθηκεκτομημένων επίμυων. Οι ωθηκεκτομημένοι επίμυες τρέφονταν σύμφωνα με την μέση ημερήσια πρόσληψη τροφής της ομάδας CTRL, προκειμένου να αποφευχθεί η επαγόμενη από την ωθηκεκτομή παχυσαρκία και οι σχετικές με την παχυσαρκία μεταβολές της πυκνότητας του οστού.

Το σωματικό βάρος των ζώων καταγραφόταν εβδομαδιαία καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος των 6 μηνών. Οι μέσες τιμές \pm τυπική απόκλιση με του τελικού σωματικού βάρους των ζώων παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2**.

Ομάδα	CTRL ^a Mean (SD)	OVX ^b Mean (SD)	RWPs Low ^c Mean (SD)	RWPs High ^d Mean (SD)	P Anova
Σωματικό βάρος, g	330.90 (33.33) ^{bc,d}	377.07 (35,83) ^a	372.90 (17.43) ^a	380.26 (52.07) ^a	0.010
Λίπος, g	22.94 (5.19)	29.72 (7.74)	29.75 (5.67)	30.41 (12.17)	0.134
Μήτρα, g	0.41 (0.09) ^{bc,d}	0.14 (0.03) ^a	0.21 (0.29) ^a	0.13 (0.03) ^a	0.000

Σημείωση: οι εκθέτες (a, b, c, d) υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικά διαφορά (P < 0.05) μετά την διόρθωση κατά Bonferroni.

Ομάδες: a: Ελέγχου (CTRL), b: Ωθηκεκτομής (OVX), c: Ωθηκεκτομής που χορηγήθηκε εκχύλισμα RWPs 50 mg/kg (RWPs Low), d: Ωθηκεκτομής που χορηγήθηκε εκχύλισμα RWPs 150 mg/kg (RWPs High)

Πίνακας 2: Σωματικό βάρος, λίπος και βάρος μήτρας.

8.5 Εκχύλισμα

8.5.1 Χορήγηση

Οι επίμυες των ομάδων CTRL και OVX είχαν *ad libitum* πρόσβαση σε πόσιμο νερό βρύσης μέσω ειδικής φιάλης νερού. Το εκχύλισμα RWPs χορηγήθηκε στις ομάδες RWPs Low και RWPs High μέσω του πόσιμου νερού (δόση 50 και 150 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα, αντίστοιχα), αμέσως μετά την διενέργεια της ωθηκεκτομής.

Η θεραπεία συνεχίστηκε για 6 μήνες. Η κατανάλωση ύδατος και εκχυλίσματος καταγραφόταν δύο φορές την εβδομάδα σε όλους τους κλωβούς των επίμυων. Οι φιάλες με το εκχύλισμα RWP αναταράζονταν δύο φορές την ημέρα για την αποφυγή δημιουργίας ιζήματος.

8.5.2 Ανάλυση

Τα είδη *Vitis vinifera* περιλαμβάνουν πολλές ποικιλίες και το Μοσχάτο είναι μία από τις παλαιότερες και πιο διαδεδομένες στον κόσμο. Στην παρούσα μελέτη, ο κόκκινος οίνος παράχθηκε από την ποικιλία Μοσχάτο Αμβούργου (Muscat Hamburg - MHW). Η ποικιλία του Μοσχάτου Αμβούργου παρήχθη από τον Αγροτικό Οινοποιητικό Συνεταιρισμό Τυρνάβου (Θεσσαλία, Ελλάδα).

Αρχικά η επεξεργασία του οίνου πραγματοποιήθηκε με την παρασκευή ενός εκχυλίσματος πλούσιου σε πολυφαινόλες με τη χρήση ρητίνης τύπου XAD-4, με σκοπό την απομάκρυνση των σακχάρων, τα οποία είναι σε γενικές γραμμές αδρανείς, πρωτογενείς μεταβολίτες, και την παραλαβή των δραστικών φαινολικών ενώσεων του κρασιού. Το ξηρό υπόλειμμα, μετά από συμπύκνωση υπό συνθήκες ελαττωμένης πίεσης (υπό κενό), υπολογίστηκε σε 2.54 g ανά 100 ml οίνου.

Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές διαδικασίες για την ανάκτηση του εκχυλίσματος MHW εμπλουτισμένο σε πολυφαινόλες (MHWPE).

1. **Μέθοδος στήλης:** χρησιμοποιήθηκε γυάλινη στήλη 40 × 3 cm γεμάτη με 50 mL ρητίνη XAD-4. Το MHW (400 ml) διοχετεύθηκε μέσω της στήλης με ρυθμό ροής 2 ml/λεπτό. Η συνολική διάρκεια του σταδίου προσρόφησης ήταν 200 λεπτά και η διάρκεια εκρόφησης 45 λεπτά. Η θερμοκρασία ήταν 20 °C σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες. Μετά την επίτευξη ισορροπίας προσρόφησης, η στήλη ρητίνης πρώτα

πλύθηκε με H₂O και στη συνέχεια απορροφήθηκε με 100 ml EtOH 95°. Μετά την εκρόφηση, το αλκοολικό διάλυμα με υψηλή περιεκτικότητα σε πολυφαινολικές ενώσεις συμπυκνώθηκε για να απομακρυνθεί το EtOH. Τέλος, το ακατέργαστο εκχύλισμα ελήφθη με ξήρανση στους 40 °C για να επιτευχθεί ένα σταθερό βάρος (3.11 g). Ως εκ τούτου, το ποσοστό του ανακτηθέντος πολυφαινολικού κλάσματος (MHWPECM) υπολογίστηκε σε 0.78 g/100 ml MHW.

2. **Μέθοδος λουτρού:** 400 ml MHW και 50 ml ρητίνης XAD-4 τοποθετήθηκαν σε φιάλη 250 ml και αναδεύτηκαν για 12 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από διήθηση, η ρητίνη πλύθηκε με νερό και το πολυφαινολικό κλάσμα ανακτήθηκε χρησιμοποιώντας 100 ml EtOH 95°. Τέλος, ελήφθησαν 1.93 g ακατέργαστου εκχυλίσματος (MHWPEBM) μετά την απομάκρυνση του διαλύτη σε απόδοση 0.48 g/100 ml MHW.

Η περιεκτικότητα σε πολυφαινολικές ενώσεις, που παρελήφθη από το MHW, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της στήλης (MHWPECM) και του λουτρού (MHWPEBM) υπολογίστηκε με την μέθοδο Folin-Ciocalteu και απέδωσαν 92.5 και 88.6 mg GAE/g εκχυλίσματος, αντίστοιχα. Καταλήγοντας πως η μέθοδος της στήλης ήταν πιο αποδοτική για την ανάκτηση των πολυφαινολικών ενώσεων από το εκχύλισμα MHW και αυτή η διαδικασία χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του MHWPE σε πιλοτική εφαρμογή.

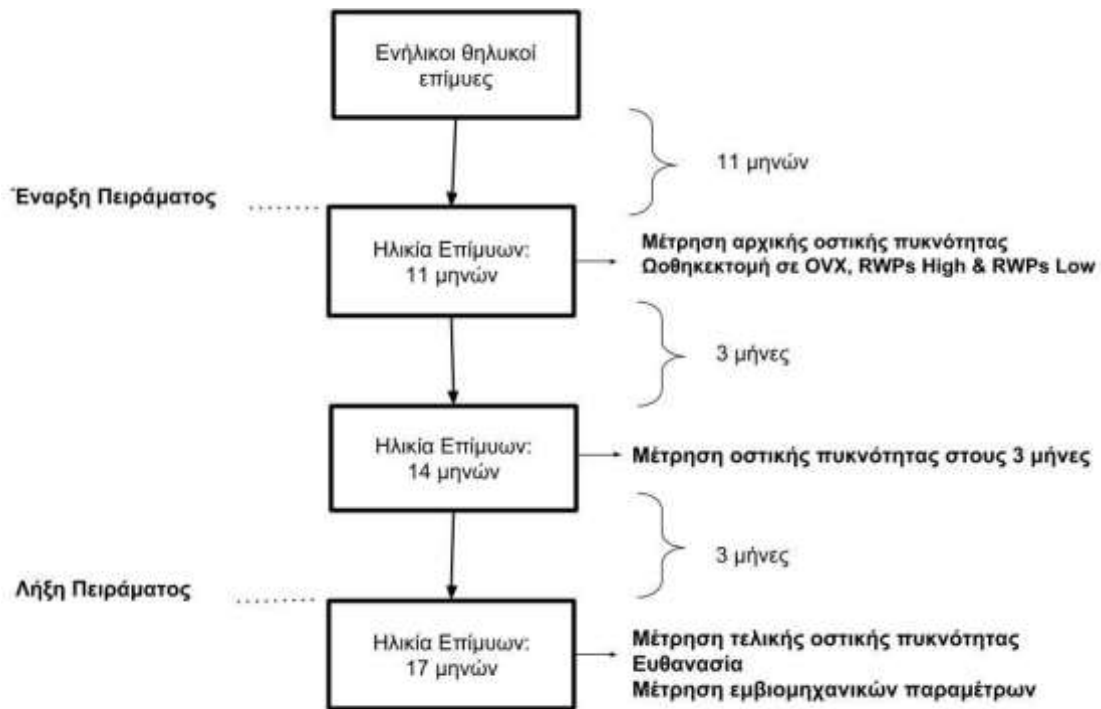
Κατά την πιλοτική εφαρμογή, χρησιμοποιήθηκε στήλη 150 χ 38 cm γεμάτη με 125 L ρητίνη XAD-4. Το εκχύλισμα MHW (300 L) τροφοδοτήθηκε στη ρητίνη μέσω ενός σωλήνα PVC διαμέτρου 0.5 ιντσών χρησιμοποιώντας μια διαφραγματική αντλία Wilden. Ο ρυθμός ροής ήταν 2500 ml/min (150 L/h) και η συνολική διάρκεια της διαδικασίας προσρόφησης-εκρόφησης ήταν 180 λεπτά. Τελικά, τα 150 L EtOH εξατμίστηκαν υπό κενό σε γυάλινο σωλήνα QVF 200 L και σε περιστροφικό εξατμιστήρα Buchi 20 L. Το ξηρό εκχύλισμα MHWPECM (2.25 Kg) χρησιμοποιήθηκε

για την *in vivo* αξιολόγηση της επίδρασής του, στην πρόληψη της οστεοπόρωσης. Το ξηρό εκχύλισμα MHWPECM αραιώθηκε με απεσταγμένο νερό για να προκύψει τελικό διάλυμα με συγκέντρωση 0.6 g/L, όπου διατηρήθηκε στους 4 °C.

8.6 Ωοθηκεκτομή

Όλα τα ζώα πλην της ομάδας CTRL υποβλήθηκαν σε ωοθηκεκτομή. Η αμφίπλευρη αφαίρεση των ωοθηκών με λαπαροτομία στην μέση τομή του κοιλιακού τοιχώματος διενεργήθηκε όταν οι επίμυες ήταν 11 μηνών. Στους επίμυες χορηγήθηκε αναισθησία (0.25 mg/kg δεξμεδετομιδίνης και 50 mg/kg υδροχλωρικής κεταμίνης, ενδομυϊκά), αναλγησία (4 mg/kg καρπροφένης, υποδόρια) και χημειοπροφύλαξη (10 mg/kg ενροφλοξασίνης, υποδόρια). Μετά την προετοιμασία του χειρουργικό πεδίου, πραγματοποιήθηκε τομή του δέρματος στη μέση γραμμή του κοιλιακού τοιχώματος και σε μήκος ίσο με το μισό της απόστασης από τον ομφαλό ως την ηβοϊσχιακή σύμφυση. Με κυρτό ψαλίδι αποχωρίστηκε ο υποδόριος ιστός και αποκαλύφθηκε η λευκή γραμμή. Η τομή ακολούθησε την λευκή γραμμή για την είσοδο στην περιτοναϊκή κοιλότητα. Μετά την ανεύρεση της αριστερής ωοθήκης διαχωρίστηκε ο πλατύς σύνδεσμος στην περιοχή όπου δεν υπάρχουν αγγεία. Στη συνέχεια και με απορροφήσιμο ράμμα 4-0 έγιναν δύο απολινώσεις. Η πρώτη στο ύψος του μητροωοθηκικού συνδέσμου της ωοθήκης και η δεύτερη κεφαλικά της ωοθήκης στον κρεμαστήρα σύνδεσμο. Επαναλήφθηκε η ίδια διαδικασία για τη δεξιά ωοθήκη. Η σύγκλιση των κοιλιακών τοιχωμάτων με απλές χωριστές ραφές εφαρμόστηκε απορροφήσιμο ράμμα 4-0. Για την σύγκλιση του δέρματος χρησιμοποιήθηκε μη απορροφήσιμο ράμμα 4-0, με Π οριζόντιες ραφές.

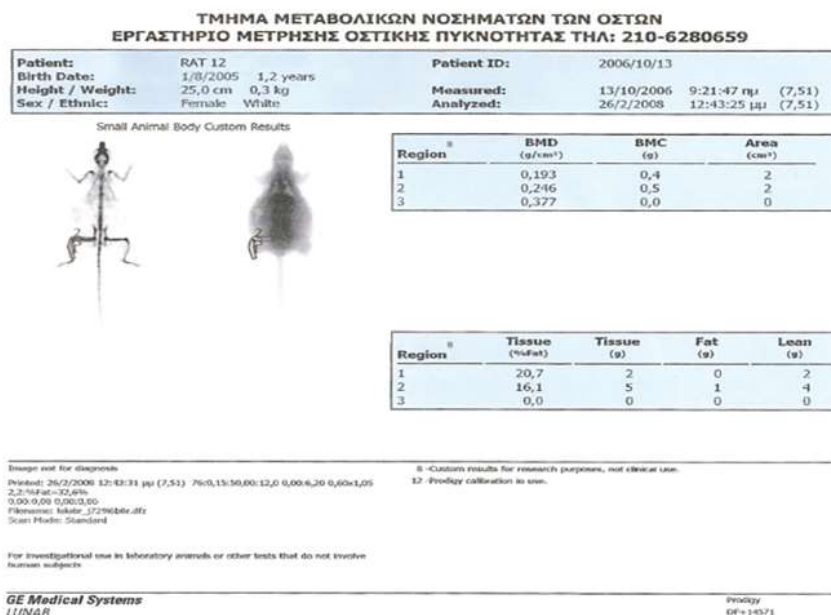
Το διάγραμμα ροής του πειραματικού πρωτοκόλλου φαίνεται στο **Σχήμα 16**.



Σχήμα 16: Διάγραμμα ροής πειραματικού πρωτοκόλλου.

8.7 Μέτρηση Οστικής Πυκνότητας

Πριν από τη χειρουργική επέμβαση, ελήφθη η αρχική μέτρηση οστικής πυκνότητας (BMD) όλων των επίμυων. Οι μετρήσεις BMD ολόκληρης και της εγγύς κνήμης διεξήχθησαν επίσης στους 3 και 6 μήνες μετά την ωθηκεκτομή. Οι μετρήσεις BMD διενεργήθηκαν με τη χρήση Απορροφησιομετρίας Ακτίνων Χ Διπλής Ενέργειας (DEXA, Lunar DPX-NT, General Electric, Madison, WI, USA) χρησιμοποιώντας το λογισμικό που συστήνει ο κατασκευαστής για την αξιολόγηση της οστικής πυκνότητας σε μικρά ζώα εργαστηρίου (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Οι μετρήσεις BMD διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό που συστήνει ο κατασκευαστής για την αξιολόγηση της οστικής πυκνότητας σε μικρά ζώα εργαστηρίου.

Η μέτρηση της BMD των επίμων διεξήχθη υπό σύντομη γενική αναισθησία (δεξμεδετομιδίνη και υδροχλωρική κεταμίνη ενδομυϊκά) (**Εικόνα 11**). Μετρήθηκαν δύο περιοχές ενδιαφέροντος (ROIs) στην κνήμη, η πρώτη περιοχή περιελάμβανε ολόκληρη την κνήμη (T-BMD), ενώ η δεύτερη περιλάμβανε την περιοχή της εγγύς μετάφυσης της κνήμης (M-BMD). Η ROI M-BMD ορίζεται ως η περιοχή ύψους 2 mm και πλάτους 2 mm, η οποία ξεκινά 3 mm κάτω από το κνημιαίο πλατώ. Η βαθμονόμηση (calibration) του συστήματος διενεργήθηκε πριν την έναρξη των μετρήσεων κάθε ομάδας. Ο συντελεστής μεταβλητότητας του συστήματος για την μέτρηση της BMD της κνήμης ήταν 0.5%. Όλες οι αναλύσεις διεξήχθησαν από τον ίδιο τεχνικό και όλα τα ζώα σαρώθηκαν την ίδια ημέρα. Ακολουθήθηκε η τεχνική που ορίστηκε από τους Patsaki et al^{192,193} και Dontas et al.^{190,191}



Εικόνα 11: Οι μετρήσεις της BMD των επίμυων διεξήχθη υπό σύντομη γενική αναισθησία.

8.8 Ευθανασία, συλλογή δειγμάτων και εξέταση

Μετά το πέρας του πειράματος, τα ζώα ευθανατώθηκαν με υπερδοσολογία αναισθησίας (3 mg/kg ξυλαζίνης και 100 mg/kg υδροχλωρικής κεταμίνης, ενδομυϊκά) και αφαίμαξη από την οπίσθια κοίλη φλέβα. Κατά την νεκροτομική εξέταση ελέγχθηκε η κοιλιακή κοιλότητα των ζώων για κακοήθεια ή οποιαδήποτε ανωμαλία και στις ωοθηκεκτομημένες ομάδες για την επιβεβαίωση της επιτυχημένης αφαίρεσης των ωοθηκών. Τα όργανα και οι ιστοί ζυγίστηκαν άμεσα με μικροζυγό ακριβείας (Sartorius handy microbalance H60) και αποθηκεύτηκαν στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Οι μήτρες απομακρύνθηκαν προσεκτικά, αφαιρέθηκαν οι περιβάλλοντες ιστοί και μετρήθηκε αμέσως το νωπό βάρος τους. Ο κοιλιακός και ο περινεφρικός λιπώδης ιστός επίσης απομακρύνθηκε και ζυγίστηκε αμέσως. Για να προσδιοριστούν οι εμβιομηχανικές ιδιότητες των οστών, οι μηροί αποκόπηκαν από τα ζώα, απομακρύνθηκε οι μαλακοί ιστοί και αποθηκεύτηκαν στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, θερμοκρασία που όπως έχει αποδειχθεί δεν επιφέρει σημαντικές αλλοιώσεις στα μηχανικά χαρακτηριστικά των δοκιμίων.¹⁹⁴

8.9 Μέτρηση εμβιομηχανικών ιδιοτήτων

Πριν από την εμβιομηχανική δοκιμή, οι κατεψυγμένοι μηροί αποψύχθηκαν για 1 ώρα πριν την μέτρηση και επαναενυδατώθηκαν με φυσιολογικό ορό. Το μήκος των μηριαίων μετρήθηκε με ένα μικρόμετρο και σηματοδεύτηκε η μέση γραμμή της διάφυσης (**Εικόνα 12**).



Εικόνα 12: Μέτρηση του μήκους των μηριαίων οστών με μικρόμετρο και ορισμός της μέσης γραμμής της διάφυσης.

Το μηριαίο οστό τοποθετήθηκε στις θέσεις φόρτισης του πλαίσιο φόρτισης MTS INSIGHT 1kN (MTS, Eden Prairie) σε δύο στρογγυλεμένες αρπαγές οι οποίες απείχαν 20 mm μεταξύ τους (**Εικόνα 13**). Οι δοκιμές έγιναν υπό “οιονεί στατικές” συνθήκες (quasi-static loading conditions) με ρυθμό μετατόπισης 1 mm/min. Η φόρτιση εφαρμόστηκε στο κέντρο της διάφυσης του οστού στο προσθιο-οπίσθιο επίπεδο, μέχρι να προκληθεί θραύση του οστού. Κατά τη φόρτιση καταγράφηκε η δύναμη και η

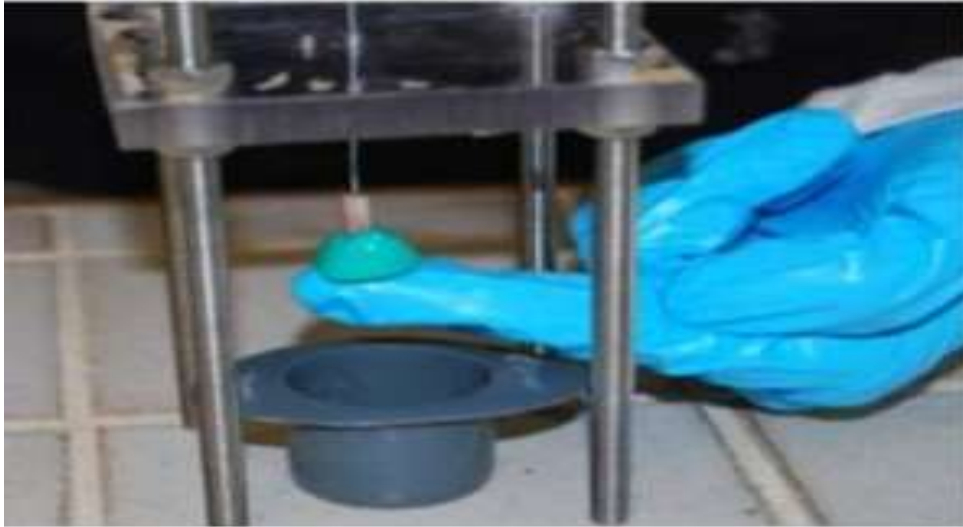
εκτροπή. Για την καταγραφή χρησιμοποιήθηκε το Video Extensometer RTSS_HR (Limes, Krefeld, Γερμανία) και το λογισμικό TestWorks 4 (WR Medical Electronics CO, Maplewood, USA).



Εικόνα 13: Το μηριαίο οστό τοποθετημένο σε δύο στρογγυλεμένες αρπαγές που απέχουν 20 mm μεταξύ τους.

Από την καμπύλη φόρτισης-παραμόρφωσης προσδιορίστηκαν οι μηριαίες εμβιομηχανικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένης της μέγιστης δύναμης (F_{max}), της ακαμψίας, της ενέργειας απορρόφησης (W_{abs}).

Προκειμένου να υπολογιστεί η τάση θραύσης, σ_{max} , ανεξάρτητα από τον προσδιορισμό της γεωμετρίας του δείγματος, πρέπει να προσδιοριστούν τα χαρακτηριστικά της διατομής των οστών. Σε αυτό το πλαίσιο, το μισό εγγύς τμήμα του σπασμένου μηριαίου εμποτίστηκε σε ειδικά σχεδιασμένα πλαστικά κύπελλα που περιείχαν οδοντική ρητίνη (Εικόνα 14).



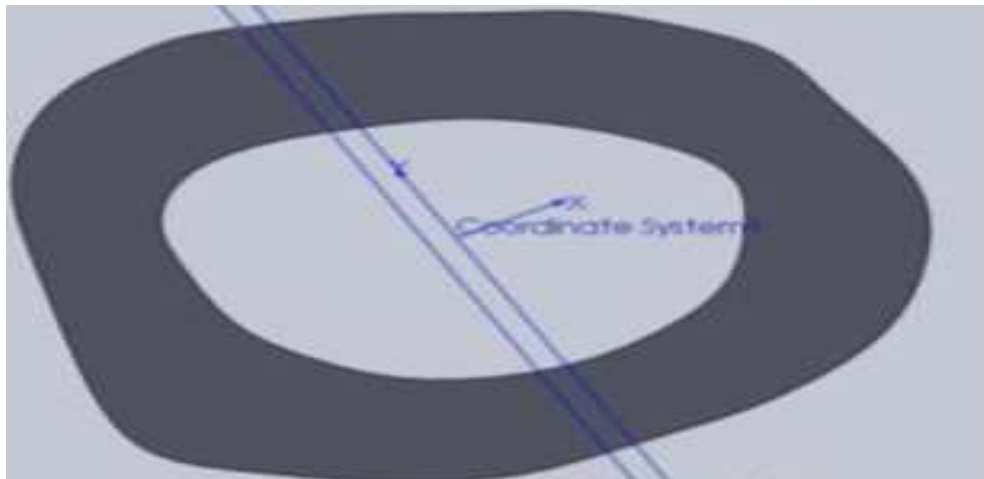
Εικόνα 14: Εμποτισμός του μισού τμήματος του σπασμένου μηριαίου σε ειδικό πλαστικό κύπελλο που περιείχε οδοντική ρητίνη.

Το σύμπλοκο οστού-οδοντικής ρητίνης γυαλίστηκε χρησιμοποιώντας LaboPol 5 (Struers), έτσι ώστε να ανιχνευθεί το πλήρες σχήμα της εγκάρσιας τομής (**Εικόνα 15**). Μετά τη λείανση με τη χρήση του λογισμικού επεξεργασίας Image-Pro Plus, τα δοκίμια φωτογραφήθηκαν χρησιμοποιώντας το αρθρωτό στερεοσκοπικό μικροσκόπιο LEICA MZ6.



Εικόνα 15: Φωτογραφία της εγκάρσιας τομής του οστού.

Η επεξεργασία των εικόνων έγινε με το στερεοσκόπιο χρησιμοποιώντας το λογισμικό SolidWorks, επιτρέποντας τον προσδιορισμό: του γεωμετρικού κέντρου της διατομής, του άξονα φόρτισης και της εκκεντρότητας του ως προς το γεωμετρικό κέντρο, το εμβαδόν της διατομής αστοχίας, της εσωτερικής και εξωτερικής ακτίνας, του μέσου και ελάχιστου πάχους της διατομής, τις επιφανειακές ροπές δευτέρας τάξης του κύριου συστήματος, τον ουδέτερο άξονα και το σημείου αστοχίας του υλικού (**Εικόνα 16**). Χρησιμοποιώντας αυτά τα χαρακτηριστικά, κατέστη δυνατός ο υπολογισμός της ακριβούς τάσης αστοχίας των οστών (σ_{max}) προσδιορίστηκε εφαρμόζοντας τη θεωρία τεχνικής κάμψης Bernoulli-Euler.



Εικόνα 16: Προσδιορισμός της γεωμετρίας του δείγματος και της διατομής των οστών.

8.10 Στατιστική ανάλυση

Οι τιμές των μεταβλητών παρουσιάζονται χρησιμοποιώντας τον αριθμό των συμμετεχόντων (n), τις μέσες τιμές (μ), τις τυπικές αποκλίσεις (τ). Στις κατηγορικές μεταβλητές χρησιμοποιούμε τις συχνότητες (n) και τα αντίστοιχα ποσοστά (%).

Ο έλεγχος της κανονικότητας της κατανομής των μετρήσεων θα γίνει χρησιμοποιώντας το Kolmogorov-Smirnov test και το normal probability plot. Οι

συγκρίσεις των απόλυτων τιμών των μεταβλητών ανάμεσα στις 4 ομάδες θα πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας το μοντέλο της ανάλυσης διακύμανσης κατά ένα παράγοντα χωρίς επαναληπτικές μετρήσεις (One way ANOVA). Οι συγκρίσεις κατά ζεύγη θα πραγματοποιηθούν χρησιμοποιώντας το Bonferroni τεστ.

Για την διαχρονική σύγκριση των μεταβλητών ανά ομάδα (baseline vs 3 μήνες, vs 6 μήνες) θα χρησιμοποιήσουμε το μοντέλο της ανάλυσης διακύμανσης κατά ένα παράγοντα με επαναληπτικές μετρήσεις (One factor Repeated Measures ANOVA). Για να αναλύσουμε τις διαφορές που υπάρχουν ανάμεσα στις ομάδες διαχρονικά, υπολογίζουμε τις ποσοστιαίες μεταβολές των μεταβλητών από το baseline στις 3 και 6 μήνες αντίστοιχα.

Οι συγκρίσεις των ποσοστιαίων αυτών μεταβολών των μεταβλητών ανάμεσα στις ομάδες θα πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας το μοντέλο της ανάλυσης διακύμανσης κατά ένα παράγοντα χωρίς επαναληπτικές μετρήσεις (One way ANOVA). Οι συγκρίσεις κατά ζεύγη θα πραγματοποιηθούν χρησιμοποιώντας το Bonferroni τεστ. Σε περίπτωση που δεν ικανοποιήθηκαν οι προϋποθέσεις της κανονικής κατανομής των δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν τα μη παραμετρικά τεστ Kruskal-Wallis και Mann-Whitney test για την ανάλυση των δεδομένων μας. Οι συσχετίσεις μεταξύ των συνεχών μεταβλητών θα εκτιμηθούν χρησιμοποιώντας τον συντελεστή συσχέτισης του Pearson ή του Spearman.

Όλα τα τεστ είναι διπλής κατεύθυνσης (two-sided). Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το στατιστικό πακέτο SPSS, version 17.00 (SPSS Inc, Chicago, IL). Η τιμή P-value < 0.05 καθορίστηκε σαν επίπεδο στατιστικά σημαντικής διαφοράς, επίσης θα καταγραφούν και οι οριακές στατιστικά σημαντικές διαφορές (0.05 < P < 0.1).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9^ο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

9.1 Βάρος σώματος και βάρος της μήτρας

Η χορήγηση του φυτικού εκχυλίσματος δεν παρουσίασε δυσμενή επίδραση στα ζώα που υποβλήθηκαν σε αγωγή, όπως παρατηρήθηκε παρακολουθώντας τα σωματικά βάρη, την κατανάλωση υγρών και τροφής. Η σύγκριση των μέσων όρων των σωματικών βαρών των ζώων στο τέλος του πειράματος έδειξε σημαντική αύξηση βάρους των ωοθηκεκτομημένων ζώων. Αυτό οδήγησε σε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας OVX και CTRL ($P = 0.031$), καθώς και μεταξύ RWPs High και CTRL ($P = 0.013$), ενώ δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ωοθηκεκτομημένων ζώων.

Οι μήτρες των ωοθηκεκτομημένων ζώων ήταν μακροσκοπικά ορατά ατροφικές και ο μέσος όρος του βάρους τους ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερος σε σύγκριση με την ομάδα CTRL ($P = 0.000$). Το μέσο βάρος της μήτρας των υπό θεραπεία ζώων, RWPs Low και RWPs High ήταν ταυτόσημο με αυτό των OVX και σημαντικά χαμηλότερο σε σύγκριση με το CTRL ($P = 0.013$ και $P = 0.000$, αντίστοιχα).

Η σύγκριση των μέσων όρων του βάρους του λίπους των ζώων στο τέλος του πειράματος, έδειξε αύξηση του βάρους των ωοθηκεκτομημένων ομάδων σε σύγκριση με την ομάδα CTRL χωρίς όμως να προκύψει στατιστική σημαντική διαφορά μεταξύ τους (Πίνακας 2).

9.2 Απόλυτες τιμές οστικής πυκνότητας

Η σύγκριση των απόλυτων τιμών της BMD ολόκληρης της κνήμης των τεσσάρων ομάδων, κατά τη διάρκεια της μελέτης, παρουσιάζεται στον **Πίνακα 3**. Οι τιμές είναι σε γραμμάρια ανά τετραγωνικό εκατοστό.

Ομάδες	BMD ολόκληρης της κνήμης							
	Αρχική μέτρηση	3 μήνες*	6 μήνες**	Μεταβολή % στους 3 μήνες*	Μεταβολή % στους 6 μήνες**	p*** Αρχική έναντι 3 μήνες	p*** Αρχική έναντι 6 μήνες	p*** 3 μήνες έναντι 6 μήνες
	Μέση τιμή (SD) (g/cm ²)	Μέση τιμή (SD) (g/cm ²)	Μέση τιμή (SD) (g/cm ²)	Μέση τιμή (SD) (g/cm ²)	Μέση τιμή (SD) (g/cm ²)			
Control	0.213 (0.011)	0.215 (0.012)	0.217 (0.011)	1.043 (2.876)	1.684 (3.447)	0.614	0.401	0.692
OVX	0.213 (0.009)	0.200 (0.006)	0.190 (0.007)	-6.016 (2.646)	-10.727 (3.720)	0.000	0.000	0.000
RWPs Low	0.213 (0.012)	0.204 (0.013)	0.192 (0.009)	-4.064 (2.897)	-9.593 (4.972)	0.002	0.000	0.007
RWPs High	0.213 (0.008)	0.209 (0.009)	0.205 (0.008)	-1.624 (3.305)	-3.861 (3.272)	0.202	0.001	0.062

Ομάδες: Ελέγχου (CTRL), Ωσθηκετομής (OVX), Ωσθηκετομής που χορηγήθηκε εκχύλισμα RWPs 50 mg/kg (RWPs Low), Ωσθηκετομής που χορηγήθηκε εκχύλισμα RWPs 150 mg/kg (RWPs High)

SD: Τυπική απόκλιση (standard deviation)

* Όλες οι διαφορές μεταξύ των ομάδων είναι στατιστικά σημαντικές $P < 0.05$ εκτός από CTRL έναντι RWPs High, OVX έναντι RWPs Low και RWPs Low έναντι RWPs High.

** Όλες οι διαφορές μεταξύ των ομάδων είναι στατιστικά σημαντικές $P < 0.05$ εκτός από OVX έναντι RWPs Low.

*** Διαφορές στη μεταβολή από τη μία μέτρηση στην άλλη, μεταξύ των ομάδων.

Πίνακας 3: Σύγκριση των απόλυτων τιμών και των μέσων ποσοστιαίων μεταβολών (σε g/cm²) της οστικής πυκνότητας (BMD) ολόκληρης της κνήμης.

Κατά την αρχική μέτρηση του πειράματος, δεν βρέθηκε σημαντική διαφορά κατά την σύγκριση των απόλυτων τιμών της BMD και στις δύο θέσεις ενδιαφέροντος που εξετάστηκαν (εγγύς και ολόκληρη κνήμη) ανάμεσα στις ομάδες.

Στις μετρήσεις που διενεργήθηκαν 3 μήνες μετά την έναρξη του πειράματος, η BMD ολόκληρης της κνήμης των CTRL επίμυων είχε σημαντικά υψηλότερη μέση τιμή

από τους επίμυες των ομάδων OVX και RWPs Low ($P < 0.05$). Μεταξύ των ωοθηκεκτομημένων ομάδων, προέκυψε σημαντική διαφορά μεταξύ των OVX και RWPs High ($P < 0.05$). Στους 6 μήνες από την έναρξη της έρευνας, υπήρξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ όλων των ομάδων, εκτός από την ομάδα OVX έναντι της ομάδας RWPs Low.

Η διαχρονική στατιστική σύγκριση των απόλυτων τιμών της BMD ολόκληρης της κνήμης κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου, έδειξε σημαντική μείωση των μέσων τιμών των ομάδων OVX και RWPs Low, τόσο από την αρχική μέτρηση στους 3 και 6 μήνες όσο και από τους 3 έως τους 6 μήνες. Σε αντίθεση με την ομάδα RWPs High, που παρουσίασε σημαντική μείωση μόνο από την αρχική μέτρηση στους 6 μήνες, ενώ στην ομάδα CTRL δεν υπήρχε σημαντική διαφορά διαχρονικά.

Από τα δεδομένα του **Πίνακα 4**, είναι προφανές ότι η σύγκριση των απόλυτων τιμών της BMD στην εγγύς μετάφυση κνήμης, κατά τη διάρκεια του πειράματος, έδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ των τεσσάρων ομάδων.

Η διαχρονική σύγκριση των απόλυτων τιμών της BMD στην μετάφυση της εγγύς κνήμης, αυξήθηκαν ελαφρώς στην ομάδα ελέγχου, ενώ σε αμφοτέρες τις ομάδες OVX, RWPs Low και RWPs High μειώθηκαν σημαντικά από την αρχική μέτρηση στους 3 μήνες, από την αρχική μέτρηση στους 6 μήνες και από 3 στους 6 μήνες αντίστοιχα. Δεν αναδείχθηκε σημαντική διαφορά στις ομάδες CTRL και RWPs High από τους 3 στους 6 μήνες.

BMD στην εγγύς μετάφωση της κνήμης								
Ομάδες	Αρχική μέτρηση	3 μήνες*	6 μήνες**	Μεταβολή % στους 3 μήνες*	Μεταβολή % στους 6 μήνες**	p*** Αρχική έναντι 3 μήνες	p*** Αρχική έναντι 6 μήνες	p*** 3 μήνες έναντι 6 μήνες
	Μέση τιμή (SD) (g/cm ²)	Μέση τιμή (SD) (g/cm ²)	Μέση τιμή (SD) (g/cm ²)	Μέση τιμή (SD) (g/cm ²)	Μέση τιμή (SD) (g/cm ²)			
Control	0.331 (0.022)	0.351 (0.018)	0.357 (0.017)	6.254 (3.392)	8.108 (3.125)	0.000	0.000	0.185
OVX	0.330 (0.023)	0.258 (0.031)	0.224 (0.024)	-21.822 (7.035)	-32.134 (5.905)	0.000	0.000	0.000
RWPs Low	0.351 (0.025)	0.318 (0.022)	0.285 (0.023)	-9.491 (4.905)	-18.569 (7.800)	0.000	0.000	0.001
RWPs High	0.355 (0.028)	0.333 (0.022)	0.328 (0.015)	-6.040 (4.373)	-7.273 (5.698)	0.000	0.001	0.642

Ομάδες: Ελέγχου (CTRL), Ωσθηκεκτομής (OVX), Ωσθηκεκτομής που χορηγήθηκε εκχύλισμα RWPs 50 mg/kg (RWPs Low), Ωσθηκεκτομής που χορηγήθηκε εκχύλισμα RWPs 150 mg/kg (RWPs High).

SD: Τυπική απόκλιση (standard deviation)

* Όλες οι διαφορές μεταξύ των ομάδων είναι στατιστικά σημαντικές $P < 0.05$ εκτός RWPs High έναντι RWPs Low.

** Όλες οι διαφορές μεταξύ των ομάδων είναι στατιστικά σημαντικές $P < 0.05$.

*** Διαφορές στη μεταβολή από τη μία μέτρηση στην άλλη μεταξύ των ομάδων.

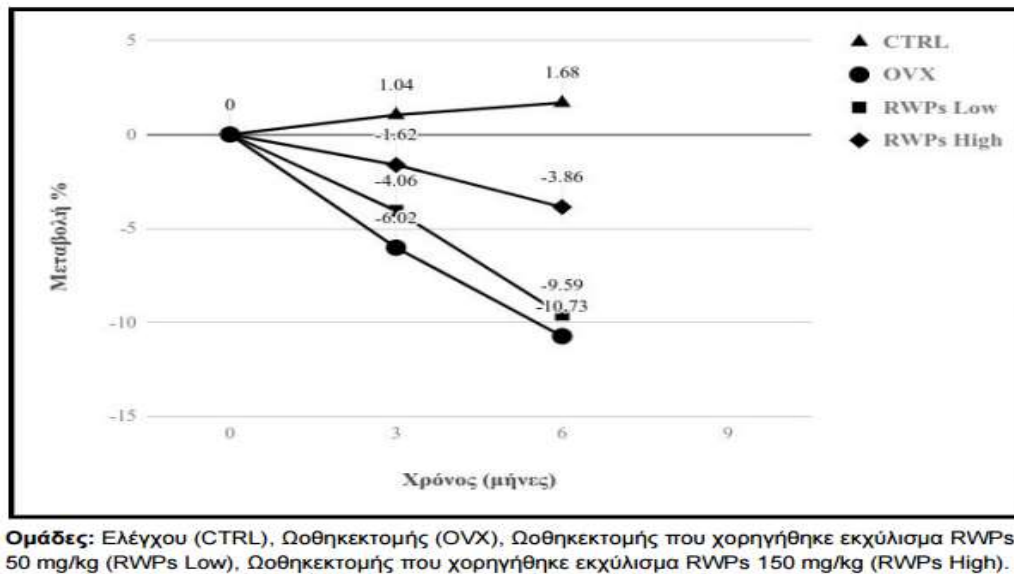
Πίνακας 4: Σύγκριση των απόλυτων τιμών και των μέσων ποσοστιαίων μεταβολών (σε g/cm²) της οστικής πυκνότητας (BMD) στην εγγύς μετάφωση της κνήμης.

Οι επίμυες που είχαν λάβει θεραπεία (RWPs Low και RWPs High) είχαν σημαντικά υψηλότερες τιμές BMD από τους OVX επίμυες, με επίπεδο σημαντικότητας $P < 0.05$ στην εγγύς μετάφωση της κνήμης στους 3 και 6 μήνες. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι η πρόσληψη RWPs εμπόδισε την επαγόμενη από την ωσθηκεκτομή, μείωση της οστικής πυκνότητας.

9.3 Ποσοστιαία μεταβολή της οστικής πυκνότητας

Η σύγκριση των ποσοστιαίων μεταβολών της ολικής κνήμης, 3 μήνες μετά την έναρξη της παρέμβασης μεταξύ CTRL και OVX και CTRL και RWPs Low ήταν σημαντική, όπως επίσης και μεταξύ των ομάδων OVX και RWPs High ($P = 0.000$, $P = 0.001$ και $P = 0.002$, αντίστοιχα). Στις μετρήσεις 6 μήνες μετά την ωσθηκεκτομή όλες οι ομάδες διέφεραν στατιστικά μεταξύ τους, εκτός από τις ομάδες OVX και RWPs Low ($P < 0.05$). Ειδικά μεταξύ των ομάδων OVX και των ομάδων που έλαβαν το πολυφαινολικό

εκχύλισμα (RWP_s Low και RWP_s High) προέκυψαν ισχυρά στατιστικά σημαντικά ευρήματα ($P = 0.002$), όπως και στους 3 μήνες. Στις ποσοστιαίες μεταβολές ολόκληρης της κνήμης η θεραπεία με εκχύλισμα 150 mg/kg (RWP_s High) είχε ισχυρή ευεργετική επίδραση στην οστική απώλεια λόγω ένδειας οιστρογόνων (Σχήμα 17).

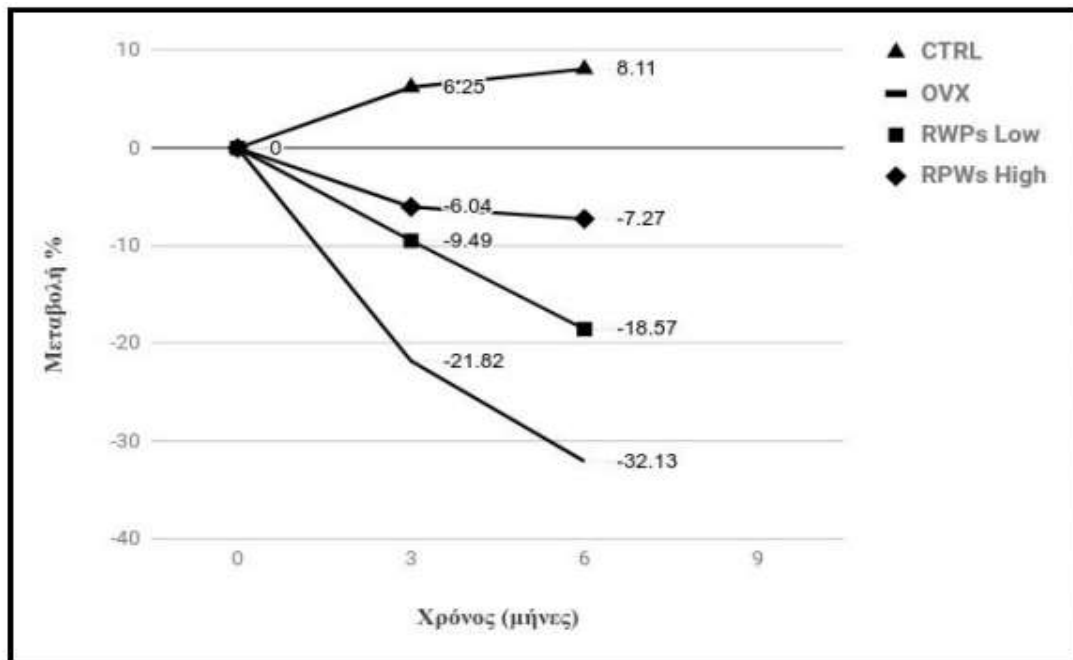


Σχήμα 17: Σύγκριση των μέσων τιμών των ποσοστιαίων μεταβολών (σε g/cm²) της οστικής πυκνότητας (BMD) ολόκληρης της κνήμης μεταξύ των ομάδων.

Για την εγγύς μετάφυση της κνήμης, η σύγκριση αποκάλυψε στατιστικά σημαντικές διαφορές (δοκιμή Mann-Whitney) μεταξύ όλων των ομάδων σε 3 και 6 μήνες (Σχήμα 18). Στους 3 μήνες, η διαφορά μεταξύ OVX και των ωσθηκεκτομημένων ομάδων που έλαβαν θεραπεία με εκχύλισμα RWP_s και στις δύο συγκεντρώσεις, ήταν εξαιρετικά σημαντική (OVX vs RWP_s Low, $P = 0.000$ και OVX vs RWP_s High, $P = 0.000$). Ενώ δεν προέκυψε σημαντική διαφορά μεταξύ των ωσθηκεκτομημένων ομάδων που έλαβαν θεραπεία (RWP_s Low vs RWP_s High).

Στους 6 μήνες μετά την έναρξη της θεραπείας με εκχύλισμα πολυφαινολών όλες οι ομάδες μεταξύ τους είχαν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα

($P = 0.000$). Η σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας OVX και των δύο ομάδων που έλαβαν θεραπεία αναδείχθηκε από τους 3 μήνες και διατηρήθηκε στις μετρήσεις των 6 μηνών, υποδεικνύοντας ένα ιδιαίτερα προστατευτικό αποτέλεσμα στην οστική πυκνότητα των ζώων που υποβλήθηκαν σε θεραπεία.



Ομάδες: Ελέγχου (CTRL), Ωοθηκεκτομής (OVX), Ωοθηκεκτομής που χορηγήθηκε εκχύλισμα RWPs 50 mg/kg (RWPs Low), Ωοθηκεκτομής που χορηγήθηκε εκχύλισμα RWPs 150 mg/kg (RWPs High).

Σχήμα 18: Σύγκριση των μέσων τιμών των ποσοστιαίων μεταβολών (σε g/cm²) της οστικής πυκνότητας (BMD) στην εγγύς μετάφωση της κνήμης μεταξύ των ομάδων.

9.4 Εμβιομηχανικές ιδιότητες οστών

Ο Πίνακας 5 παρουσιάζει τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τις εμβιομηχανικές παραμέτρους των τεσσάρων ομάδων. Η κάμψη τριών σημείων (3PB) αποκάλυψε ότι η F_{max} ήταν χαμηλότερη στην ομάδα OVX σε αντίθεση με τις ομάδες CTRL και RWPs Low, χωρίς να αναδειχθεί όμως στατιστική σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Αξίζει να σημειωθεί ότι η F_{max} στην ομάδα RWPs Low ήταν εφάμιλλη με την CTRL.

Η W_{abs} ήταν σημαντικά μειωμένη στην ομάδα OVX σε σύγκριση με την ομάδα CTRL ($P = 0.015$), την ομάδα RWPs Low ($P = 0.007$) και την ομάδα RWPs High ($P = 0.033$). Οι τιμές της W_{abs} των ομάδων παρέμβασης, ήταν παρόμοιες με τις τιμές της ομάδας CTRL.

Η σ_{max} ήταν υψηλότερη στις ομάδες που υποβλήθηκαν σε αγωγή με εκχύλισμα RWPs, σε σύγκριση με την ομάδα OVX. Στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα προέκυψαν μεταξύ των ομάδων RWPs Low και OVX ($P = 0.016$). Οι μετρήσεις της ομάδας παρέμβασης με την υψηλή συγκέντρωση εκχυλίσματος (RWPs High) ήταν υψηλότερες από την ωθηκετομημένη ομάδα, και παραπλήσιες με της ομάδας CTRL, παρόλα αυτά δεν αναδείχτηκαν στατιστικά σημαντικά ευρήματα. Επιπλέον, η σύγκριση των μέσων τιμών σ_{max} μεταξύ OVX και CTRL ήταν σημαντική ($P = 0,048$), ωστόσο μεταξύ της ομάδας CTRL και των ομάδων παρέμβασης δεν προέκυψε καμία στατιστική διαφορά μιας και οι τιμές ήταν παρόμοιες.

Group	CTRL ^a Μέση τιμή (SD)	OVX ^b Μέση τιμή (SD)	RWPs Low ^c Μέση τιμή (SD)	RWPs High ^d Μέση τιμή (SD)	P Anova
F_{max} (N)	118.90 (19.00)	100.90 (16.60)	117.59 (17.87)	111.89 (18.13)	0.056
W_{abs} (mJ)	19.25 (2.91) ^b	12.95 (2.09) ^{a,c,d}	19.60 (6.58) ^b	18.15 (5.73) ^b	0.004
σ_{max} (MPa)	173.83 (20.57)	158.48 (13.78) ^c	194.34 (49.64) ^b	184.80 (27.03)	0.018

Σημείωση: οι εκθέτες (a, b, c, d) υποδεικνύουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$) μετά την διόρθωση κατά Bonferroni.

Ομάδες: a: Ελέγχου (CTRL), b: Ωθηκετομής (OVX), c: Ωθηκετομής που χορηγήθηκε εκχύλισμα RWPs 50 mg/kg (RWPs Low), d: Ωθηκετομής που χορηγήθηκε εκχύλισμα RWPs 150 mg/kg (RWPs High)

SD: Τυπική απόκλιση (standard deviation)

Πίνακας 5: Σύγκριση εμβιομηχανικών ιδιοτήτων μεταξύ των ομάδων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10^ο

ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

10.1 Συζήτηση

Η θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης έχει χρησιμοποιηθεί για την πρόληψη και τη θεραπεία της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης, αλλά μπορεί να προκαλέσει σοβαρές παρενέργειες.¹⁸⁴ Τα αποτελέσματα της μελέτης της Πρωτοβουλίας για την Υγεία των Γυναικών (Women's Health Initiative Study) ότι η ΘΟΥ αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού, καρκίνου των ωοθηκών, καρδιακής προσβολής, εγκεφαλικού επεισοδίου, θρομβοεμβολισμού και ασθένειας Alzheimer.^{195,196}

Έχουν πραγματοποιηθεί έρευνες για την αντιοστεοπωρωτική δράση των πολυφαινολικών ενώσεων, λόγω των οιστρογονικών και αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων. Ορισμένες μελέτες έδειξαν ότι το εκχύλισμα σταφυλιών είναι πολλά υποσχόμενο για τη διατήρηση ή την ενίσχυση της οστικής πυκνότητας.^{134,189} Ερευνήσαμε την επίδραση της χορήγησης εκχυλίσματος RWP ως εναλλακτική θεραπεία στην μακροχρόνια ΘΟΥ που χρησιμοποιείται συνήθως από τις οστεοπορωτικές γυναίκες.

Το σωματικό βάρος των επίμυων που υποβλήθηκαν σε ωθηκεκτομή αυξήθηκε σταθερά καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης, παρόλο που όλα τα ζώα είχαν την ίδια ημερήσια πρόσληψη τροφής. Αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με αυτά άλλων μελετών που έδειξαν ότι οι OVX επίμυες είχαν σημαντικά υψηλότερο σωματικό βάρος σε σύγκριση με τους CTRL, λόγω της εναπόθεσης του λίπους που προκλήθηκε λόγω της ανεπάρκειας οιστρογόνων.¹⁹⁰⁻¹⁹³ Όπως επίσης υποδεικνύεται και από τους Dontas et

al,^{190,191} οι μήτρες των OVX ζώων ήταν μακροσκοπικά ορατά ατροφικές και το μέσο βάρος της μήτρας ήταν σημαντικά χαμηλότερο σε σύγκριση με το CTRL (P = 0.002).

Αν και ο μηχανισμός των ωφέλιμων επιδράσεων του εκχυλίσματος RWP στην υγεία παραμένει ασαφής, αρκετές μελέτες υποδεικνύουν έντονα ότι δεν δρουν μέσω δέσμευσης του υποδοχέα οιστρογόνων.^{121,122,197} Παρομοίως, σε αυτή τη μελέτη η χορήγηση του εκχυλίσματος RWP δεν ήταν ικανή να τροποποιήσει την μετεμμηνοπαυσιακή λιπώδη κατάσταση.

Η απώλεια οστικής μάζας αυξάνει σημαντικά την ενεργοποίηση της αναγέννησης του Αβέρσειου συστήματος στους ανθρώπους.¹³⁹ Ωστόσο, το φλοιώδες οστό των επίμων παρουσιάζει χαμηλό ποσοστό αναγέννησης του Αβέρσειου συστήματος, παρά τους αυξημένους ενδοστικούς οστεοβλάστες και δεν θεωρείται πρακτική η χρήση του φλοιώδους οστού στις μελέτες απώλειας οστικής πυκνότητας.¹⁴⁵ Οι προηγούμενες μελέτες της ομάδας μας, σε αρμονία με τις προηγούμενες αναφορές, έδειξαν ότι η επίδραση της ωθηκεκτομής στην BMD στο φλοιώδες οστό είναι χαμηλότερη από ότι στο σπογγώδες οστό.¹⁹⁰⁻¹⁹³ Η ποσοστιαία μείωση της οστικής πυκνότητας ολόκληρης της κνήμης για την ομάδα OVX ανήλθε στο -6.02% στους 3 μήνες και στο -10.73% στους 6 μήνες. Περισσότερο αξιοσημείωτη ήταν η ποσοστιαία μείωση της BMD στην εγγύς μετάφυση της κνήμης που μετρήθηκε στο -21.82% και στο -32.13%, στους 3 και 6 μήνες αντίστοιχα, που ερμηνεύεται καθώς οι μεταφύσεις είναι πλούσιες σε σπογγώδες οστόν το οποίο υφίσταται άμεση απώλεια οστικής πυκνότητας.

Στην περίοδο μετά την ωθηκεκτομή, το σπογγώδες οστό παρουσιάζει ταχεία ποσοτική απώλεια οστικής μάζας, παρόμοια με τον αυξημένο κίνδυνο καταγμάτων στην ανθρώπινη μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση λόγω της ένδειας των ενδογενών οιστρογόνων. Η σοβαρή μείωση της σπογγώδους οστικής πυκνότητας στις μεταφύσεις των οστών μετά από την ωθηκεκτομή ήταν παρόμοια με τις προηγούμενες αναφορές.¹⁴⁵

Η στατιστική σύγκριση των απόλυτων τιμών της BMD στην εγγύς μετάφυση της κνήμης, κατά τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου, έδειξε μια στατιστικά σημαντική αύξηση των απόλυτων τιμών στις ομάδες των ωοθηκεκτομημένων επίμυων που υποβλήθηκαν σε αγωγή σε σχέση με την ομάδα OVX που δεν έλαβαν θεραπεία, στους 3 και 6 μήνες. Επιπρόσθετα, η σύγκριση κατά ζεύγη (pairwise comparison) των ποσοστιαίων μεταβολών της BMD από την αρχική τιμή σε 3 μήνες και 6 μήνες και από 3 έως 6 μήνες, αποκάλυψε εξαιρετικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων OVX και RWPs Low και RWPs High.

Τα αποτελέσματα της οστικής πυκνότητας στην παρούσα μελέτη, που αντικατοπτρίζει την οστική ποσότητα, είναι σε συμφωνία με την υπό διερεύνηση οστική ποιότητα, όσον αφορά την μέγιστη φόρτιση, την απορρόφηση ενέργειας και τη μέγιστη τάση, που διεξάγεται με *ex vivo* 3PB του μηριαίου οστού. Η ωοθηκεκτομή προκάλεσε σημαντική μείωση των εμβιομηχανικών παραμέτρων όπως αναμενόταν, ενώ οι ομάδα OVX που υποβλήθηκαν σε αγωγή με RWPs έδειξαν σημαντική αύξηση σε σύγκριση με την OVX ομάδα που δεν έλαβε θεραπεία. Αξίζει να σημειωθεί ότι η F_{max} , η W_{abs} και η σ_{max} στα ζώα υπό θεραπεία ζώα ήταν παρόμοια με τους CTRL επίμυες. Παρόμοιες μελέτες διατροφικής πρόσληψης εκχυλίσματος σταφυλιού σε επίμυες, βελτίωσε την οστική αντοχή του μηριαίου οστού.^{134,189} Η αντοχή των οστών είναι η σημαντικότερη μεταβλητή που προσδιορίζεται, καθώς εκφράζει άμεσα την αντοχή ολόκληρου του οστού σε θραύση, ενσωματώνοντας τόσο την ελαστική όσο και την πλαστική συμπεριφορά του. Ιδιαίτερα στην κλινική πράξη, η αντοχή των οστών είναι ο απώτερος στόχος των αντι-οστεοπορωτικών θεραπειών.

10.2 Περιορισμοί

Τα πλέον αξιόπιστα αποτελέσματα στην έρευνα της οστεοπόρωσης λαμβάνονται από μελέτες σε ανθρώπους. Ωστόσο, είναι σαφές πως λόγω ηθικών και άλλων περιορισμών, αν οι έρευνες βασίζονταν μόνο σε ανθρώπους, τότε δεν θα υπήρχε η δυνατότητα να ελεγχθούν νέες υποθέσεις και να εκτιμηθούν νέες πιθανές θεραπείες. Η ανάπτυξη και εφαρμογή κατάλληλων ζωικών προτύπων για την μελέτη της οστικής απώλειας στους ανθρώπους αποτελούν επομένως, νόμιμα εργαλεία στην προσπάθεια των ερευνητών να κατανοήσουν, να διαχειριστούν και πιθανώς να αποτρέψουν την εμφάνιση της οστεοπόρωσης στο μέλλον. Λαμβάνοντας υπόψη τον υψηλό βαθμό γενετικής ομοιότητας μεταξύ των θηλαστικών, φαίνεται λογικό ότι τα ζωικά πρότυπα μπορούν να παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες για την αιτιολογία και την παθογένεια του γηράσκοντος σκελετού.^{155,198}

Εξάλλου και η εξαγωγή συμπερασμάτων από τις κλινικές έρευνες σε παγκόσμιο επίπεδο είναι έως και αδύνατη, καθώς οι ερευνητές χρησιμοποιούν διαφορετικά μεταξύ τους συστήματα μέτρησης και αναφοράς. Το αποτέλεσμα είναι ότι δεν μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα καθολικής βαρύτητας.¹⁶⁷ Η χρήση πειραματικών προτύπων ζώων στην έρευνα της αιτιολογίας και της θεραπείας της οστεοπόρωσης έχει διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην εκτίμηση της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας νέων θεραπευτικών στόχων για την πρόληψη του κινδύνου κατάγματος και τη διαφύλαξη της οστικής αντοχής.^{41,139}

Για τους λόγους αυτούς στην παρούσα έρευνα, προτείνεται το πειραματικό πρότυπο ώριμων ωθηκεκτομημένων επίμυων για την μελέτη της επίδρασης των φαινολικών ενώσεων του κρασιού,¹⁶³ οι οποίοι και δεν πρόκειται να υποβληθούν σε οποιασδήποτε μορφής βασανισμό. Παρά το γεγονός, ότι το συγκεκριμένο πειραματικό

πρότυπο αποτελεί την ιδανική επιλογή συγκριτικά με τα υπόλοιπα ζωικά πρότυπα, δεν παύει να έχει διαφορές από τον άνθρωπο.

Επιπρόσθετα, ο αριθμός των ζώων που χρησιμοποιήθηκε ήταν περιορισμένος, δεδομένου του νομικού και ηθικού πλαισίου που διέπει τις πειραματικές μελέτες, ο αριθμός των ζώων που χρησιμοποιούνται θα πρέπει να περιορίζεται στο ελάχιστο δυνατό. Παρά το γεγονός ότι το δείγμα είναι διαχειριστικά μικρό για τους λόγους που προαναφέρθηκαν, αναδείχθηκαν στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα, χαρακτηριστικό της πραγματικής ύπαρξης επίδρασης από τη χορήγηση του φυτικού εκχυλίσματος RWP.

Το πειραματικό πρότυπο του επίμυος δεν παρουσιάζει αυτόματα ή χαμηλής εντάσεως κατάγματα όπως άλλωστε και τα περισσότερα ζωικά πρότυπα της οστεοπόρωσης, γεγονός που θα αποτελούσε έναν επιπλέον περιορισμό της έρευνας εάν δεν μπορούσε να υπερκερασθεί με την μελέτη των μηχανικών δοκιμών των οστών.^{71,199}

Τέλος, η ιδανική χορηγούμενη δόση του εκχυλίσματος για την πρόληψη της οστεοπόρωσης λόγω ένδειας οιστρογόνων, είναι ένα ερώτημα που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Στην παρούσα πειραματική έρευνα επιλέχθηκε η χορήγηση 2 διαφορετικών συγκεντρώσεων (50 mg/kg και 150 mg/kg) αμέσως μετά την ωοθηκεκτομή πριν την ωοθηκεκτομή και την έναρξη της ταχείας απώλειας του σπογγώδους οστού. Επιπρόσθετα, έως σήμερα δεν υπάρχει δημοσιευμένη έρευνα που να μελετά την επίδραση της μακροχρόνιας πρόσληψης εκχυλίσματος κόκκινου κρασιού στην μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση. Μία έρευνα διερεύνησε την 8 εβδομάδων πρόσληψη εκχυλίσματος σταφυλιού στην απορρόφηση ασβεστίου και στο φλοιώδες οστό των επίμυων²⁰⁰ ενώ μία άλλη μελέτησε την επίδραση της δίμηνης πρόσληψης εκχυλίσματος σταφυλιού και κόκκινου κρασιού, σε συνδυασμό με υπερλιπιδαιμική διαίτα και σωματική άσκηση σε επίμυς.²⁰¹ Κατά συνέπεια, κανένα σχόλιο δεν είναι

εφικτό να γίνει σε σχέση με το εάν διαφορετικές δόσεις του φαρμάκου επιδείκνυαν ή όχι καλύτερα αποτελέσματα διαχρονικά. Επομένως, η επίδραση του φυτικού πολυφαινολικού εκχυλίσματος του κόκκινου κρασιού σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, θα μπορούσε να αποτελέσει την ερευνητική υπόθεση μελλοντικών μελετών.

10.3 Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, η 6μηνη διατροφική πρόσληψη εκχυλίσματος κόκκινου κρασιού, προκάλεσε αξιοσημείωτη επίδραση στην πρόληψη της οστεοπενίας και της αντοχής των οστών, στους επίμυες με οστεοπόρωση λόγω ένδειας οιστρογόνων, χωρίς υπερτροφική επίδραση στη μήτρα. Το εκχύλισμα RWP's θα μπορούσε να θεωρηθεί ως μια ελκυστική, φυσική εναλλακτική αντι-οστεοπορωτική βοτανοθεραπεία, λόγω της πρόσθετης ευεργετικής δράσης των διαφόρων ουσιών του εκχυλίσματος, όπως οι πολυφαινόλες. Απαιτούνται περισσότερες πειραματικές μελέτες για την αποσαφήνιση του ακριβούς μηχανισμού δράσης των RWP's, καθώς και μια προοπτική κλινική μελέτη σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με απώλεια οστικής μάζας, πριν γίνουν κλινικές συστάσεις.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να εξεταστεί η επίδραση του εκχύλισματος πολυφαινολών του κόκκινου κρασιού (RWP) στην οστική πυκνότητα (BMD) σε πρότυπο ωοθηκεκτομημένων επίμυων.

Έντεκα από τους 50 επίμυες αποτελούσαν την μη-ωοθηκεκτομημένη ομάδα ελέγχου (CTRL, n = 11). Σαράντα επίμυες υποβλήθηκαν σε αμφίπλευρη ωοθηκεκτομή. Από αυτούς, οι 13 επίμυες αποτελούνταν την ωοθηκεκτομημένη ομάδα που δεν έλαβε θεραπεία (OVX, n = 13), οι 11 υποβλήθηκαν σε αγωγή με εκχύλισμα RWP σε συγκέντρωση 50 mg/kg (RWP Low, n = 11) και οι 15 έλαβαν το φυτικό εκχύλισμα RWP σε συγκέντρωση 150 mg/kg (RWP High, n = 15), ξεκινώντας αμέσως μετά από την ωοθηκεκτομή για 6 μήνες. Προσδιορίστηκε η οστική πυκνότητα πριν από οποιαδήποτε παρέμβαση, στους 3 και 6 μήνες. Οι επίμυες ευθανατώθηκαν και τα μηριαία οστά εξετάστηκαν με την δοκιμασία κάμψης τριών σημείων. Κατά την σύγκριση των τιμών οστικής πυκνότητας στην εγγύς μετάφυση της κνήμης μεταξύ των ομάδων, οι επίμυες που είχαν λάβει θεραπεία (RWP Low και RWP High) είχαν σημαντικά υψηλότερες τιμές BMD από τους OVX επίμυες. Συγκεκριμένα, στους 3 μήνες και 6 μήνες, προέκυψε εξαιρετικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας OVX και των ομάδων RWP Low (P = 0.000 και P = 0.000, αντίστοιχα) και RWP High (P = 0.000 και P = 0.000, αντίστοιχα) ενώ δεν προέκυψε σημαντική διαφορά μεταξύ των ωοθηκεκτομημένων ομάδων που έλαβαν θεραπεία (RWP Low vs RWP High). Η ωοθηκεκτομή προκάλεσε σημαντική μείωση των εμβιομηχανικών παραμέτρων όπως αναμενόταν, και η δοκιμασία κάμψης τριών σημείων έδειξε ότι η απορρόφηση ενέργειας αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά στις ομάδες OVX που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με RWP με συγκεντρώσεις 50 mg/kg και 150 mg/dl (P = 0.007 και P = 0.033, αντίστοιχα). Η τάση θραύσης ήταν υψηλότερη στις ομάδες που υποβλήθηκαν σε αγωγή με εκχύλισμα

RWPs, σε σύγκριση με την ομάδα OVX. Στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα προέκυψαν μεταξύ των ομάδων RWPs Low και OVX ($P = 0.016$). Οι μετρήσεις της ομάδας RWPs High ήταν υψηλότερες από την ομάδα OVX, και παραπλήσιες με της ομάδας CTRL, παρόλα αυτά δεν αναδείχτηκαν στατιστικά σημαντικά ευρήματα. Επιπλέον, στη σύγκριση μεταξύ της ομάδας CTRL και των ομάδων παρέμβασης δεν προέκυψε καμία διαφορά μιας και οι τιμές ήταν παρόμοιες. Η διατροφική πρόσληψη RWPs για 6 μήνες απέτρεψε την ταχεία οστική απώλεια και βελτίωσε την αντοχή των οστών σε ωοθηκεκτομημένους επίμυες.

ABSTRACT

The aim of this study was to examine the effect of Red Wine Polyphenols (RWPs) extract on bone mineral density (BMD) in the ovariectomized (OVX) rat model. Eleven of the 50 rats consisted the sham-operated non-ovariectomized control group (CTRL, n=11). Thirty-nine rats underwent bilateral ovariectomy by the ventral approach; of these, 13 rats consisted the ovariectomized group without treatment (OVX, n=13), 11 rats were treated with 50 mg/kg body weight per day RWPs extract (RWPs Low, n = 11) and 15 rats were treated with 150 mg/kg RWPs extract (RWPs High, n=15). Body and uterine weight, BMD of the tibia at baseline, 3 and 6 months post-OVX, and 3-pointing bending of the femur, were examined.

Statistical comparison of the proximal tibia BMD within groups during the study period showed a significant reduction in the OVX vs treated rats (RWPs Low and RWPs High) both from baseline to 3 and 6 months and from 3 to 6 months ($P < 0.05$). For the proximal tibial metaphysis, comparison of BMD percentage changes from baseline to 3 months and to 6 months, revealed highly statistical differences between OVX and RWPs groups (OVX vs RWPs Low, $P = 0.000$ and $P = 0.000$ and OVX vs RWPs High, $P = 0.000$ and 0.000 , respectively). OVX induced a significant reduction of biomechanical parameters as expected; energy absorption and significantly increased in the OVX group treated with RWPs at 50 mg/kg and 150 mg/kg, compared with the nontreated OVX rats ($P = 0.007$ and $P = 0.033$, respectively). Fracture stress was higher in the RWPs treated groups compared to the OVX group. Statistically significant results were obtained between RWPs Low and OVX ($P = 0.016$). RWPs High fracture stress measurements were higher than the OVX group, and similar to the CTRL group, however, no

statistically significant findings were found. Dietary intake of RWPs for 6 months significantly prevented trabecular bone loss and improved bone strength in estrogen-deficient ovariectomized rats.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Horowitz MC, Jilka RL. Colony stimulating factors and bone remodeling. In: Cytokines and bone metabolism. 1992. pp. 185–228.
2. Bab IA, Einhorn TA. Polypeptide factors regulating osteogenesis and bone marrow repair. J Cell Biochem. 1994 Jul;55(3):358–65.
3. Μιχαήλ Γ. Ερειστικός ιστός. In: Ιστολογία, 2η έκδοση. Θεσσαλονίκη; 1986. p. 67–140.
4. Banks W. Supportive Tissues-Bone. In: Applied Veterinary Histology, 3rd ed. St. Louis, Missouri: Mosby. In: Applied Veterinary Histology, 3rd ed. St. Louis, Missouri: Mosby; 1993. pp. 107–26.
5. Λυρίτης ΓΠ. Οστεοπόρωση. Αθήνα: Εκδόσεις Press Line; 1996.
6. Mahan LK, Escott-Stump S. Krause's Food, Nutrition and Diet Therapy. 10η έκδοση. Philadelphia ; London: W. B. Saunders Company; 2000.
7. Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodeling. Ann N Y Acad Sci. 2006 Dec 1;1092(1):385–96.
8. Lloret A, Coiffier G, Couchouron T, Perdriger A, Guggenbuhl P. Risk factors of mortality during the first year after low energy osteoporosis fracture: a retrospective case-control study. Clin Cases Miner Bone Metab. 2016;13(2):123–6.
9. Weisz GM. Osteoporosis: A Future Public Health Problem for Israel? Medical and Legal Obligations. Isr Med Assoc J. 2017 Apr;19(4):203–6.

10. Thulkar J, Singh S, Sharma S, Thulkar T. Preventable risk factors for osteoporosis in postmenopausal women: Systematic review and meta-analysis. *J Midlife Health*. 2016;7(3):108–13.
11. Svedbom A, Hernlund E, Ivergård M, Compston J, Cooper C, Stenmark J, et al. Osteoporosis in the European Union: a compendium of country-specific reports. *Arch Osteoporos*. 2013;8(1–2):137.
12. Wang T, Liu Q, Tjhioe W, Zhao J, Lu A, Zhang G, et al. Therapeutic Potential and Outlook of Alternative Medicine for Osteoporosis. *Curr Drug Targets*. 2017 Jun 2;18(9):1051–68.
13. Tao S, Huang Y, Lioret A. Plant interaction. In: *Proceedings of the 2016 Virtual Reality International Conference on - VRIC '16*.
14. Inzerillo AM, Zaidi M. Osteoporosis: trends and intervention. *Mt Sinai J Med*. 2002 Sep;69(4):220–31.
15. Sewell KL. Iatrogenic osteoporosis. *Arch Dermatol*. 1995 Nov;131(11):1321–2.
16. Marcus R, Holloway L, Wells B, Greendale G, James MK, Wasilauskas C, et al. The Relationship of Biochemical Markers of Bone Turnover to Bone Density Changes in Postmenopausal Women: Results from the Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Trial. *J Bone Miner Res*. 1999 Sep 1;14(9):1583–95.
17. Ran SY, Yu Q, Chen Y, Lin SQ. Prevention of postmenopausal osteoporosis in Chinese women: a 5-year, double-blind, randomized, parallel placebo-controlled study. *Climacteric*. 2017 May 19;1–6.

18. Ran SY, Yu Q, Chen Y, Lin SQ. Prevention of postmenopausal osteoporosis in Chinese women: a 5-year, double-blind, randomized, parallel placebo-controlled study. *Climacteric*. 2017 Jul 4;20(4):391–6.
19. Miller VM, Lahr BD, Bailey KR, Heit JA, Harman SM, Jayachandran M. Longitudinal effects of menopausal hormone treatments on platelet characteristics and cell-derived microvesicles. *Platelets*. 2016 Jan 2;27(1):32–42.
20. Oster P, Arab L, Kohlmeier M, Mordasini R, Schellenberg B, Schlierf G. Effects of estrogens and progestogens on lipid metabolism. *Am J Obstet Gynecol*. 1982 Mar 15;142(6 Pt 2):773–5.
21. L’Hermite M. Custom-compounded bioidentical hormone therapy: why so popular despite potential harm? The case against routine use. *Climacteric*. 2017 May 4;20(3):205–11.
22. Jones ME, Schoemaker MJ, Wright L, McFadden E, Griffin J, Thomas D, et al. Menopausal hormone therapy and breast cancer: what is the true size of the increased risk? *Br J Cancer*. 2016 Aug 23;115(5):607–15.
23. Asi N, Mohammed K, Haydour Q, Gionfriddo MR, Vargas OLM, Prokop LJ, et al. Progesterone vs. synthetic progestins and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Syst Rev*. 2016 Dec 26;5(1):121.
24. Flores VA, Taylor HS. The Effect of Menopausal Hormone Therapies on Breast Cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2015 Sep;44(3):587–602.
25. O’Brien KM, Fei C, Sandler DP, Nichols HB, DeRoo LA, Weinberg CR. Hormone Therapy and Young-Onset Breast Cancer. *Am J Epidemiol*. 2015 May

- 15;181(10):799–807.
26. Pines A, Shapiro S. Long-term menopausal hormone therapy and health consequences – how to choose sides? *Climacteric*. 2015 Jul 4;18(4):441–3.
 27. Stuenkel CA. Menopausal Hormone Therapy: Current Considerations. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2015 Sep;44(3):565–85.
 28. Coope J, Marsh J. Can We Improve Compliance With Long-Term HRT? *Obs Gynecol Surv*. 1993;48(4):279–80.
 29. Gray TK, Flynn TC, Gray KM, Nabell LM. 17 beta-estradiol acts directly on the clonal osteoblastic cell line UMR106. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Sep;84(17):6267–71.
 30. Rickard DJ, Subramaniam M, Spelsberg TC. Molecular and cellular mechanisms of estrogen action on the skeleton. *J Cell Biochem*. 1999;Suppl 32-33:123–32.
 31. Oursler MJ, Osdoby P, Pyfferoen J, Riggs BL, Spelsberg TC. Avian osteoclasts as estrogen target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Aug 1;88(15):6613–7.
 32. Komm BS, Terpening CM, Benz DJ, Graeme KA, Gallegos A, Korc M, et al. Estrogen binding, receptor mRNA, and biologic response in osteoblast-like osteosarcoma cells. *Science*. 1988 Jul 1;241(4861):81–4.
 33. Ernst M, Heath JK, Rodan GA. Estradiol effects on proliferation, messenger ribonucleic acid for collagen and insulin-like growth factor-I, and parathyroid hormone-stimulated adenylate cyclase activity in osteoblastic cells from calvariae and long bones. *Endocrinology*. 1989 Aug;125(2):825–33.

34. Sharan K, Swarnkar G, Siddiqui J a, Kumar A, Rawat P, Kumar M, et al. A novel flavonoid, 6-C-beta-d-glucopyranosyl-(2S,3S)-(+)-3',4',5,7-tetrahydroxyflavanone, isolated from *Ulmus wallichiana* Planchon mitigates ovariectomy-induced osteoporosis in rats. *Menopause*. 2010;17(3):577–86.
35. Lin HY, Harris TL, Flannery MS, Aruffo A, Kaji EH, Gorn A, et al. Expression cloning of an adenylate cyclase-coupled calcitonin receptor. *Science*. 1991 Nov 15;254(5034):1022–4.
36. Cenci S, Weitzmann MN, Gentile MA, Aisa MC, Pacifici R. M-CSF neutralization and egr-1 deficiency prevent ovariectomy-induced bone loss. *J Clin Invest*. 2000 May 1;105(9):1279–87.
37. Shevde NK, Bendixen AC, Dienger KM, Pike JW. Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jul 5;97(14):7829–34.
38. Cummings SR, Black DM, Nevitt MC, Browner W, Cauley J, Ensrud K, et al. Bone density at various sites for prediction of hip fractures. The Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Lancet (London, England)*. 1993 Jan 9;341(8837):72–5.
39. Marshall D, Johnell O, Wedel H. Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures. *BMJ*. 1996 May 18;312(7041):1254–9.
40. Kanis JA. An update on the diagnosis of osteoporosis. *Curr Rheumatol Rep*. 2000 Feb;2(1):62–6.

41. Turner RT, Maran A, Lotinun S, Hefferan T, Evans GL, Zhang M, et al. Animal models for osteoporosis. *Rev Endocr Metab Disord*. 2001 Jan;2(1):117–27.
42. Loeb W. The rat. In: Loeb WF, Quimby FW, editors *The clinical chemistry of laboratory animals*. 2nd editio. Ann Arbor: Edwards Brothers; 1999. pp. 33–45.
43. Seibel MJ. Molecular markers of bone turnover: biochemical, technical and analytical aspects. *Osteoporos Int*. 2000;11 Suppl 6:S18-29.
44. Μαρίνου Κ, Δοντά Ι. Ηθική πειραματισμού. Ηθική αξιολόγηση πειραματικού πρωτοκόλλου. *Περιοδικό της Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας*. 2009;(60):217–21.
45. Slosman DO, Casez JP, Pichard C, Rochat T, Fery F, Rizzoli R, et al. Assessment of whole-body composition with dual-energy x-ray absorptiometry. *Radiology*. 1992 Nov;185(2):593–8.
46. Mazess RB, Barden HS, Bisek JP, Hanson J. Dual-energy x-ray absorptiometry for total-body and regional bone-mineral and soft-tissue composition. *Am J Clin Nutr*. 1990 Jun 1;51(6):1106–12.
47. Fuller NJ, Laskey MA, Elia M. Assessment of the composition of major body regions by dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA), with special reference to limb muscle mass. *Clin Physiol*. 1992 May;12(3):253–66.
48. Wang W, Wang Z, Faith MS, Kotler D, Shih R, Heymsfield SB. Regional skeletal muscle measurement: evaluation of new dual-energy X-ray absorptiometry model. *J Appl Physiol*. 1999 Sep;87(3):1163–71.
49. Gotfredsen A, Jensen J, Borg J, Christiansen C. Measurement of lean body mass

- and total body fat using dual photon absorptiometry. *Metabolism*. 1986 Jan;35(1):88–93.
50. Heymsfield SB, Smith R, Aulet M, Bensen B, Lichtman S, Wang J, et al. Appendicular skeletal muscle mass: measurement by dual-photon absorptiometry. *Am J Clin Nutr*. 1990 Aug 1;52(2):214–8.
51. Lindsay R, Cosman F, Herrington BS, Himmelstein S. Bone mass and body composition in normal women. *J Bone Miner Res*. 1992 Jan 3;7(1):55–63.
52. Mazess RB, Cameron JR, Sorenson JA. Determining body composition by radiation absorption spectrometry. *Nature*. 1970 Nov 21;228(5273):771–2.
53. Peppler WW, Mazess RB. Total body bone mineral and lean body mass by dual-photon absorptiometry. I. Theory and measurement procedure. *Calcif Tissue Int*. 1981;33(4):353–9.
54. Durnin J V. Appropriate technology in body composition: a brief review. *Asia Pac J Clin Nutr*. 1995 Mar;4(1):1–5.
55. Tothill P. Dual-energy X-ray absorptiometry for the measurement of bone and soft tissue composition. *Clin Nutr*. 1995 Oct;14(5):263–8.
56. Kohrt WM. Body composition by DXA: tried and true? *Med Sci Sports Exerc*. 1995 Oct;27(10):1349–53.
57. Breen SA, Loveday BE, Millest AJ, Waterton JC. Stimulation and inhibition of bone formation: use of peripheral quantitative computed tomography in the mouse in vivo. *Lab Anim*. 1998 Oct 24;32(4):467–76.

58. Salamone LM, Fuerst T, Visser M, Kern M, Lang T, Dockrell M, et al. Measurement of fat mass using DEXA: a validation study in elderly adults. *J Appl Physiol.* 2000 Jul;89(1):345–52.
59. Barrera MG, Salazar G, Gajardo H, Gattás V, Coward A. [Comparative analysis of body composition assessment methods in healthy adult men]. *Rev Med Chil.* 1997 Nov;125(11):1335–42.
60. Prior BM, Cureton KJ, Modlesky CM, Evans EM, Sloniger MA, Saunders M, et al. In vivo validation of whole body composition estimates from dual-energy X-ray absorptiometry. *J Appl Physiol.* 1997 Aug;83(2):623–30.
61. Pritchard JE, Nowson CA, Strauss BJ, Carlson JS, Kaymakci B, Wark JD. Evaluation of dual energy X-ray absorptiometry as a method of measurement of body fat. *Eur J Clin Nutr.* 1993 Mar;47(3):216–28.
62. Heymsfield SB, Smith R, Aulet M, Bensen B, Lichtman S, Wang J, et al. Appendicular skeletal muscle mass: measurement by dual-photon absorptiometry. *Am J Clin Nutr.* 1990 Aug 1;52(2):214–8.
63. Johansen PB, Flyvbjerg A, Wilken M, Malmjöf K. Comparison of methods of analysis of body composition in hypophysectomized rats treated with rat growth hormone. *Growth Horm IGF Res.* 2000 Dec;10(6):342–8.
64. Svendsen OL, Haarbo J, Hassager C, Christiansen C. Accuracy of measurements of body composition by dual-energy x-ray absorptiometry in vivo. *Am J Clin Nutr.* 1993 May 1;57(5):605–8.
65. Li XJ, Jee WSS, Chow S-Y, Woodbury DM. Adaptation of cancellous bone to

- aging and immobilization in the rat: A single photon absorptiometry and histomorphometry study. *Anat Rec.* 1990 May;227(1):12–24.
66. Rosen HN, Tollin S, Balena R, Middlebrooks VL, Beamer WG, Donohue LR, et al. Differentiating between orchietomized rats and controls using measurements of trabecular bone density: a comparison among DXA, histomorphometry, and peripheral quantitative computerized tomography. *Calcif Tissue Int.* 1995 Jul;57(1):35–9.
67. Eriksen E, Vesterby A, Kassem M, Melsen F, Mosekilde L. Bone Remodeling and Bone Structure. In: *Handbook of Experimental Pharmacology.* 1993. pp. 67–109.
68. Langub MC, Faugere MC, Malluche HH. Molecular bone morphometry. *Pediatr Nephrol.* 2000 Jul;14(7):629–35.
69. Sedlin ED, Hirsch C. Factors affecting the determination of the physical properties of femoral cortical bone. *Acta Orthop Scand.* 1966;37(1):29–48.
70. Burstein AH, Currey JD, Frankel VH, Reilly DT. The ultimate properties of bone tissue: the effects of yielding. *J Biomech.* 1972 Jan;5(1):35–44.
71. Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone.* 14(4):595–608.
72. Ashman R. *Ultrasonic Determination of the Elastic Properties of Cortical Bone: Techniques and Limitations.* 1982. 306 pp.
73. Evans AG, Jones LR. Confinement of airborne radioactivity. Progress report, January--June 1972. 1973.

74. McelhaneY J, Fogle J, Byars E, Weaver G. Effect of embalming on the mechanical properties of beef bone. *J Appl Physiol*. 1964 Nov;19(6):1234–6.
75. Pelker RR, Friedlaender GE, Markham TC, Panjabi MM, Moen CJ. Effects of freezing and freeze-drying on the biomechanical properties of rat bone. *J Orthop Res*. 1984;1(4):405–11.
76. Dempster WT, Liddicoat RT. Compact bone as a non-isotropic material. *Am J Anat*. 1952 Nov;91(3):331–62.
77. Evans FG, Lebow M. *Regional Differences in Some of the Physical Properties of the Human Femur*. *J Appl Physiol*. 1951 Mar;3(9):563–72.
78. Bonfield W, Li CH. The temperature dependence of the deformation of bone. *J Biomech*. 1968 Dec;1(4):323–9.
79. Smith JW, Walmsley R. Factors affecting the elasticity of bone. *J Anat*. 1959 Oct;93:503–23.
80. Bonfield W, Tully AE. Ultrasonic analysis of the Youngs modulus of cortical bone. *J Biomed Eng*. 1982 Jan;4(1):23–7.
81. Carter DR, Hayes WC. Fatigue life of compact bone--I. Effects of stress amplitude, temperature and density. *J Biomech*. 1976;9(1):27–34.
82. Turner CH, Akhter MP, Heaney RP. The effects of fluoridated water on bone strength. *J Orthop Res*. 1992 Jul;10(4):581–7.
83. Reilly DT, Burstein AH. The elastic and ultimate properties of compact bone tissue. *J Biomech*. 1975;8(6):393–405.

84. Keller TS, Spengler DM, Carter DR. Geometric, elastic, and structural properties of maturing rat femora. *J Orthop Res.* 1986;4(1):57–67.
85. Beck TJ, Ruff CB, Scott WW, Plato CC, Tobin JD, Quan CA. Sex differences in geometry of the femoral neck with aging: a structural analysis of bone mineral data. *Calcif Tissue Int.* 1992 Jan;50(1):24–9.
86. Martin RB, Burr DB. Non-invasive measurement of long bone cross-sectional moment of inertia by photon absorptiometry. *J Biomech.* 1984;17(3):195–201.
87. Ferretti JL, Capozza RF, Zanchetta JR. Mechanical validation of a tomographic (pQCT) index for noninvasive estimation of rat femur bending strength. *Bone.* 1996 Feb;18(2):97–102.
88. Jämsä T, Jalovaara P, Peng Z, Väänänen HK, Tuukkanen J. Comparison of three-point bending test and peripheral quantitative computed tomography analysis in the evaluation of the strength of mouse femur and tibia. *Bone.* 1998 Aug;23(2):155–61.
89. Ferretti JL, Gaffuri O, Capozza R, Cointy G, Bozzini C, Olivera M, et al. Dexamethasone effects on mechanical, geometric and densitometric properties of rat femur diaphyses as described by peripheral quantitative computerized tomography and bending tests. *Bone.* 1995 Jan;16(1):119–24.
90. Gere J, Timoshenko S. *Mechanics of Materials.* 1991.
91. Burstein AH, Zika JM, Heiple KG, Klein L. Contribution of collagen and mineral to the elastic-plastic properties of bone. *J Bone Joint Surg Am.* 1975 Oct;57(7):956–61.

92. Turner CH. Homeostatic control of bone structure: an application of feedback theory. *Bone*. 1991;12(3):203–17.
93. Duthie GG, Gardner PT, Kyle JAM. Plant polyphenols: are they the new magic bullet? *Proc Nutr Soc*. 2003 Aug 5;62(3):599–603.
94. Paixao N, Perestrelo R, Marques J, Camara J. Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chem*. 2007;105(1):204–14.
95. García-Puente Rivas E, Alcalde-Eon C, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo JC, Escribano-Bailón MT. Behaviour and characterisation of the colour during red wine making and maturation. *Anal Chim Acta*. 2006 Mar 23;563(1–2):215–22.
96. Mazauric J-P, Salmon J-M. Interactions between Yeast Lees and Wine Polyphenols during Simulation of Wine Aging: I. Analysis of Remnant Polyphenolic Compounds in the Resulting Wines. *J Agric Food Chem*. 2005 Jul 13;53(14):5647–53.
97. Brenna O, Pagliarini E. Multivariate Analysis of Antioxidant Power and Polyphenolic Composition in Red Wines. 2001.
98. Duell PB. Prevention of atherosclerosis with dietary antioxidants: fact or fiction? *J Nutr*. 1996 Apr 1;126(4 Suppl):1067S–71S.
99. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*. 1996 Jan 1;20(7):933–56.
100. Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary

- antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* (London, England). 1993 Oct 23;342(8878):1007–11.
101. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 2004 May 1;79(5):727–47.
102. Zoecklein BW, Fugelsang KC, Gump BH, Nury FS. Extract. In: *Production Wine Analysis*. Boston, MA: Springer US; 1990. pp. 64–70.
103. Bird D, Wine Appreciation Guild (San Francisco C. Understanding wine technology : a book for the non-scientist that explains the science of winemaking. DBQA Pub.; 2010. 307 pp.
104. Minussi RC, Rossi M, Bologna L, Cordi L, Rotilio D, Pastore GM, et al. Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. *Food Chem*. 2003 Aug;82(3):409–16.
105. Ribéreau-Gayon P, Glories L, Maujean A, Dubourdiou D. *Handbook of Enology Volume 2 The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments 2 nd Edition*. 2006. 141-203 pp.
106. Robinson J, Harding J, editors. *The Oxford Companion to Wine*. Oxford University Press; 2015.
107. Kasdallah-Grissa A, Mornagui B, Aouani E, Hammami M, El May M, Gharbi N, et al. Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates ethanol-induced oxidative stress in rat liver. *Life Sci*. 2007 Feb 20;80(11):1033–9.
108. Rubiolo JA, Mithieux G, Vega FV. Resveratrol protects primary rat hepatocytes against oxidative stress damage: *Eur J Pharmacol*. 2008 Sep 4;591(1–3):66–72.

109. Harborne JB. Methods in plant biochemistry. Volume 1. Plant phenolics. Methods in plant biochemistry. Volume 1. Plant phenolics. Academic Press Ltd.; 1989.
110. Orallo F. Trans-resveratrol: a magical elixir of eternal youth? *Curr Med Chem.* 2008;15(19):1887–98.
111. Soleas GJ, Grass L, Josephy PD, Goldberg DM, Diamandis EP. A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. *Clin Biochem.* 2002 Mar;35(2):119–24.
112. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing K V, Thomas CF, Beecher CW, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science.* 1997 Jan 10;275(5297):218–20.
113. Ferguson LR. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutat Res.* 2001 Apr 18;475(1–2):89–111.
114. Rahman A, Shahabuddin, Hadi SM, Parish JH, Ainley K. Strand scission in DNA induced by quercetin and Cu(II): role of Cu(I) and oxygen free radicals. *Carcinogenesis.* 1989 Oct;10(10):1833–9.
115. Li Y, Trush MA, Yager JD. DNA damage caused by reactive oxygen species originating from a copper-dependent oxidation of the 2-hydroxy catechol of estradiol. *Carcinogenesis.* 1994 Jul;15(7):1421–7.
116. Yoshino M, Haneda M, Naruse M, Murakami K. Prooxidant activity of flavonoids: copper-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. *Mol Genet Metab.* 1999 Dec;68(4):468–72.

117. Sakihama Y, Cohen MF, Grace SC, Yamasaki H. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*. 2002 Aug 1;177(1):67–80.
118. Yamamoto T, Hsu S, Lewis J, Wataha J, Dickinson D, Singh B, et al. Green tea polyphenol causes differential oxidative environments in tumor versus normal epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 Oct 3;307(1):230–6.
119. Fukumoto LR, Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J Agric Food Chem*. 2000 Aug;48(8):3597–604.
120. Agarwal C, Sharma Y, Agarwal R. Anticarcinogenic effect of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in human prostate carcinoma DU145 cells: modulation of mitogenic signaling and cell-cycle regulators and induction of G1 arrest and apoptosis. *Mol Carcinog*. 2000 Jul;28(3):129–38.
121. Eng ET, Ye J, Williams D, Phung S, Moore RE, Young MK, et al. Suppression of estrogen biosynthesis by procyanidin dimers in red wine and grape seeds. *Cancer Res*. 2003 Dec 1;63(23):8516–22.
122. Sharma G, Tyagi AK, Singh RP, Chan DCF, Agarwal R. Synergistic Anti-Cancer Effects of Grape Seed Extract and Conventional Cytotoxic Agent Doxorubicin Against Human Breast Carcinoma Cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2004 May;85(1):1–12.
123. Aldini G, Carini M, Piccoli A, Rossoni G, Facino RM. Procyanidins from grape seeds protect endothelial cells from peroxynitrite damage and enhance endothelium-dependent relaxation in human artery: new evidences for cardio-protection. *Life Sci*. 2003 Oct 17;73(22):2883–98.

124. Eaton-Evans J. Osteoporosis and the role of diet. *Br J Biomed Sci.* 1994 Dec;51(4):358–70.
125. Bowers JL, Tyulmenkov V V, Jernigan SC, Klinge CM. Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology.* 2000 Oct;141(10):3657–67.
126. Kinjo J, Tsuchihashi R, Morito K, Hirose T, Aomori T, Nagao T, et al. Interactions of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta (III). Estrogenic activities of soy isoflavone aglycones and their metabolites isolated from human urine. *Biol Pharm Bull.* 2004 Feb;27(2):185–8.
127. Yin J, Winzenberg T, Quinn S, Giles G, Jones G. Beverage-specific alcohol intake and bone loss in older men and women: a longitudinal study. *Eur J Clin Nutr.* 2011 Apr 16;65(4):526–32.
128. Welch A, MacGregor A, Jennings A, Fairweather-Tait S, Spector T, Cassidy A. Habitual flavonoid intakes are positively associated with bone mineral density in women. *J Bone Miner Res.* 2012 Sep;27(9):1872–8.
129. Hardcastle AC, Aucott L, Reid DM, Macdonald HM. Associations between dietary flavonoid intakes and bone health in a scottish population. *J Bone Miner Res.* 2011 May;26(5):941–7.
130. Siddiqui JA, Sharan K, Swarnkar G, Rawat P, Kumar M, Manickavasagam L, et al. Quercetin-6-C-β-d-glucopyranoside isolated from *Ulmus wallichiana* planchon is more potent than quercetin in inhibiting osteoclastogenesis and mitigating ovariectomy-induced bone loss in rats. *Menopause.* 2010 Jul;1.

131. Trivedi R, Kumar S, Kumar A, Siddiqui JA, Swarnkar G, Gupta V, et al. Kaempferol has osteogenic effect in ovariectomized adult Sprague-Dawley rats. *Mol Cell Endocrinol*. 2008 Jul 16;289(1–2):85–93.
132. Liu ZP, Li WX, Yu B, Huang J, Sun J, Huo JS, et al. Effects of *trans*-Resveratrol from *Polygonum cuspidatum* on Bone Loss Using the Ovariectomized Rat Model. *J Med Food*. 2005 Mar;8(1):14–9.
133. Shen C-L, Wang P, Guerrieri J, Yeh JK, Wang J-S. Protective effect of green tea polyphenols on bone loss in middle-aged female rats. *Osteoporos Int*. 2008 Jul 15;19(7):979–90.
134. Yahara N, Tofani I, Maki K, Kojima K, Kojima Y, Kimura M. Mechanical assessment of effects of grape seed proanthocyanidins extract on tibial bone diaphysis in rats. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2005 Jun;5(2):162–9.
135. Mühlbauer RC, Lozano A, Reinli A, Wetli H. Various selected vegetables, fruits, mushrooms and red wine residue inhibit bone resorption in rats. *J Nutr*. 2003 Nov 1;133(11):3592–7.
136. Hohman EE, Weaver CM. A grape-enriched diet increases bone calcium retention and cortical bone properties in ovariectomized rats. *J Nutr*. 2015 Feb 1;145(2):253–9.
137. Δοντά-Δημητριάδου Ι. Τα πειραματόζωα στις προκλινικές μελέτες φαρμάκων. *Επιθ Κλιν Φαρμακολογίας Φαρμακοκινητικής*. 1984;(1):280–6.
138. Δοντά Ι. Η επιλογή του καταλληλότερου πειραματοζώου ως πειραματικό πρότυπο. *Ελληνική Χειρουργική*. 1994;(66):28–31.

139. Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med*. 2008 Oct;58(5):424–30.
140. Marafante E, Balls M. The European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). In: *Alternatives to Animal Testing*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH; pp. 21–5.
141. Marafante E, Smyrniotis T, Balls M. ECVAM: the European Centre for the Validation of Alternative Methods. *Toxicol In Vitro*. 1994 Aug;8(4):803–5.
142. Piersma AH, Burgdorf T, Louekari K, Desprez B, Taalman R, Landsiedel R, et al. Workshop on acceleration of the validation and regulatory acceptance of alternative methods and implementation of testing strategies. *Toxicol Vitro*. 2018 Aug;50:62–74.
143. Whelan M, Eskes C. Evolving the Principles and Practice of Validation for New Alternative Approaches to Toxicity Testing. In: *Advances in experimental medicine and biology*. 2016. pp. 387–99.
144. Smith JA, van den Broek FAR, Martorell JC, Hackbarth H, Ruksenas O, Zeller W, et al. Principles and practice in ethical review of animal experiments across Europe: summary of the report of a FELASA working group on ethical evaluation of animal experiments. *Lab Anim*. 2007 Apr 24;41(2):143–60.
145. Jee WS, Yao W. Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2001 Mar;1(3):193–207.
146. Shen V, Birchman R, Liang XG, Wu DD, Lindsay R, Dempster DW.

- Prednisolone alone, or in combination with estrogen or dietary calcium deficiency or immobilization, inhibits bone formation but does not induce bone loss in mature rats. *Bone*. 1997 Oct;21(4):345–51.
147. Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopa bone loss. 1991;15:175–91.
148. Seedor JG, Quartuccio HA, Thompson DD. The bisphosphonate alendronate (MK-217) inhibits bone loss due to ovariectomy in rats. *J Bone Miner Res*. 1991 Apr 3;6(4):339–46.
149. Wronski TJ, Cintrón M, Dann LM. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int*. 1988 Sep;43(3):179–83.
150. Wronski TJ, Dann LM, Horner SL. Time course of vertebral osteopenia in ovariectomized rats. *Bone*. 1989;10(4):295–301.
151. Iwaniec U, Turner R. Animal Models for Osteoporosis. In: *Osteoporosis*. 2013. pp. 939–61.
152. Li M, Shen Y, Qi H, Wronski TJ. Comparative study of skeletal response to estrogen depletion at red and yellow marrow sites in rats. *Anat Rec*. 1996 Jul;245(3):472–80.
153. Miyakoshi N, Sato K, Abe T, Tsuchida T, Tamura Y, Kudo T. Histomorphometric evaluation of the effects of ovariectomy on bone turnover in rat caudal vertebrae. *Calcif Tissue Int*. 1999 Apr;64(4):318–24.
154. Turner RT, Vandersteenhoven JJ, Bell NH. The effects of ovariectomy and 17

- beta-estradiol on cortical bone histomorphometry in growing rats. *J Bone Miner Res.* 1987 Apr 3;2(2):115–22.
155. Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner.* 1991 Dec;15(3):175–91.
156. Burr DB. Muscle strength, bone mass, and age-related bone loss. *J Bone Miner Res.* 1997 Oct 1;12(10):1547–51.
157. Danielsen CC, Mosekilde L, Svenstrup B. Cortical bone mass, composition, and mechanical properties in female rats in relation to age, long-term ovariectomy, and estrogen substitution. *Calcif Tissue Int.* 1993 Jan;52(1):26–33.
158. Yoshitake K, Yokota K, Kasugai Y, Kagawa M, Sukamoto T, Nakamura T. Effects of 16 weeks of treatment with tibolone on bone mass and bone mechanical and histomorphometric indices in mature ovariectomized rats with established osteopenia on a low-calcium diet. *Bone.* 1999 Sep;25(3):311–9.
159. Mosekilde L, Sjøgaard CH, Danielsen CC, Tørring O, NILSSON MHL. The anabolic effects of human parathyroid hormone (hPTH) on rat vertebral body mass are also reflected in the quality of bone, assessed by biomechanical testing: a comparison study between hPTH-(1-34) and hPTH-(1-84). *Endocrinology.* 1991 Jul;129(1):421–8.
160. Goulding A, Gold E. A new way to induce oestrogen-deficiency osteopaenia in the rat: comparison of the effects of surgical ovariectomy and administration of the LHRH agonist buserelin on bone resorption and composition. *J Endocrinol.* 1989 May;121(2):293–8.

161. Gallagher A, Chambers TJ, Tobias JH. The estrogen antagonist ICI 182,780 reduces cancellous bone volume in female rats. *Endocrinology*. 1993 Dec;133(6):2787–91.
162. Gasser JA, Green JR, Shen V, Ingold P, Rebmann A, Bhatnagar AS, et al. A single intravenous administration of zoledronic acid prevents the bone loss and mechanical compromise induced by aromatase inhibition in rats. *Bone*. 2006 Oct;39(4):787–95.
163. Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med*. 2008 Oct;58(5):424–30.
164. Li XX, Hara I, Matsumiya T. Effects of osthole on postmenopausal osteoporosis using ovariectomized rats; comparison to the effects of estradiol. *Biol Pharm Bull*. 2002 Jun;25(6):738–42.
165. Martin EA, Ritman EL, Turner RT. Time course of epiphyseal growth plate fusion in rat tibiae. *Bone*. 2003 Mar;32(3):261–7.
166. Mosekilde L. Assessing bone quality--animal models in preclinical osteoporosis research. *Bone*. 1995 Oct;17(4 Suppl):343S–352S.
167. von Wowern N. General and oral aspects of osteoporosis: a review. *Clin Oral Investig*. 2001 Jun;5(2):71–82.
168. Newman E, Turner AS, Wark JD. The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. *Bone*. 1995 Apr;16(4 Suppl):277S–284S.

169. De França NA, Camargo MB, Lazaretti-Castro M, Martini LA. Antioxidant intake and bone status in a cross-sectional study of Brazilian women with osteoporosis. *Nutr Health*. 2013 Apr;22(2):133–42.
170. Reinwald S, Weaver CM. Soy isoflavones and bone health: a double-edged sword? *J Nat Prod*. 2006 Mar;69(3):450–9.
171. Chen J-R, Lazarenko OP, Wu X, Kang J, Blackburn ML, Shankar K, et al. Dietary-induced serum phenolic acids promote bone growth via p38 MAPK/ β -catenin canonical Wnt signaling. *J Bone Miner Res*. 2010 Nov;25(11):2399–411.
172. Zhang X, Shu X-O, Li H, Yang G, Li Q, Gao Y-T, et al. Prospective cohort study of soy food consumption and risk of bone fracture among postmenopausal women. *Arch Intern Med*. 2005 Sep 12;165(16):1890–5.
173. Pawlowski JW, Martin BR, McCabe GP, Ferruzzi MG, Weaver CM. Plum and Soy Aglycon Extracts Superior at Increasing Bone Calcium Retention in Ovariectomized Sprague Dawley Rats. *J Agric Food Chem*. 2014 Jul 2;62(26):6108–17.
174. Qian G, Xue K, Tang L, Wang F, Song X, Chyu M-C, et al. Mitigation of Oxidative Damage by Green Tea Polyphenols and Tai Chi Exercise in Postmenopausal Women with Osteopenia. Cameron DW, editor. *PLoS One*. 2012 Oct 31;7(10):e48090.
175. Zhang Z-F, Yang J-L, Jiang H-C, Lai Z, Wu F, Liu Z-X. Updated association of tea consumption and bone mineral density. *Medicine (Baltimore)*. 2017 Mar;96(12):e6437.

176. Shen C-L, Chyu M-C. Tea flavonoids for bone health: from animals to humans. *J Investig Med*. 2016 Oct;64(7):1151–7.
177. Hooshmand S, Kern M, Metti D, Shamloufard P, Chai SC, Johnson SA, et al. The effect of two doses of dried plum on bone density and bone biomarkers in osteopenic postmenopausal women: a randomized, controlled trial. *Osteoporos Int*. 2016 Jul 22;27(7):2271–9.
178. Deyhim F, Stoecker BJ, Brusewitz GH, Devareddy L, Arjmandi BH. Dried plum reverses bone loss in an osteopenic rat model of osteoporosis. *Menopause*. 2005;12(6):755–62.
179. Franklin M, Bu SY, Lerner MR, Lancaster EA, Bellmer D, Marlow D, et al. Dried plum prevents bone loss in a male osteoporosis model via IGF-I and the RANK pathway. *Bone*. 2006 Dec;39(6):1331–42.
180. Halloran BP, Wronski TJ, VonHerzen DC, Chu V, Xia X, Pingel JE, et al. Dietary Dried Plum Increases Bone Mass in Adult and Aged Male Mice. *J Nutr*. 2010 Oct 1;140(10):1781–7.
181. Bu SY, Lucas EA, Franklin M, Marlow D, Brackett DJ, Boldrin EA, et al. Comparison of dried plum supplementation and intermittent PTH in restoring bone in osteopenic orchidectomized rats. *Osteoporos Int*. 2007 Jul 6;18(7):931–42.
182. Li T, Wu S-M, Xu Z-Y, Ou-Yang S. Rabbiteye blueberry prevents osteoporosis in ovariectomized rats. *J Orthop Surg Res*. 2014 Aug 8;9(1):56.
183. Zhang J, Lazarenko OP, Blackburn ML, Badger TM, Ronis MJJ, Chen J-R.

- Blueberry consumption prevents loss of collagen in bone matrix and inhibits senescence pathways in osteoblastic cells. *Age (Omaha)*. 2013 Jun 4;35(3):807–20.
184. Zhang J, Lazarenko OP, Blackburn ML, Shankar K, Badger TM, Ronis MJJ, et al. Feeding Blueberry Diets in Early Life Prevent Senescence of Osteoblasts and Bone Loss in Ovariectomized Adult Female Rats. Stadler K, editor. *PLoS One*. 2011 Sep 2;6(9):e24486.
185. Kamitani Y, Maki K, Tofani I, Nishikawa Y, Tsukamoto K, Kimura M. Effects of grape seed proanthocyanidins extract on mandibles in developing rats. *Oral Dis*. 2004 Jan;10(1):27–31.
186. Boissy P, Andersen TL, Abdallah BM, Kassem M, Plesner T, Delaissé J-M. Resveratrol inhibits myeloma cell growth, prevents osteoclast formation, and promotes osteoblast differentiation. *Cancer Res*. 2005 Nov 1;65(21):9943–52.
187. De França NAG, Camargo MBR, Lazaretti-Castro M, Martini LA. Antioxidant intake and bone status in a cross-sectional study of Brazilian women with osteoporosis. *Nutr Health*. 2013 Apr 14;22(2):133–42.
188. Zhang Z, Zheng L, Zhao Z, Shi J, Wang X, Huang J. Grape seed proanthocyanidins inhibit H₂O₂-induced osteoblastic MC3T3-E1 cell apoptosis via ameliorating H₂O₂-induced mitochondrial dysfunction. *J Toxicol Sci*. 2014;39(5):803–13.
189. Hohman EE, Weaver CM. A Grape-Enriched Diet Increases Bone Calcium Retention and Cortical Bone Properties in Ovariectomized Rats. *J Nutr*. 2015 Feb 1;145(2):253–9.

190. Dontas I a, Lelovas PP, Kourkoulis SK, Aligiannis N, Paliogianni A, Mitakou S, et al. Protective effect of *Sideritis euboea* extract on bone mineral density and strength of ovariectomized rats. *Menopause*. 2011 Aug;18(8):915–22.
191. Dontas I, Halabalaki M, Moutsatsou P, Mitakou S, Papoutsi Z, Khaldi L, et al. Protective effect of plant extract from *Onobrychis ebenoides* on ovariectomy-induced bone loss in rats. *Maturitas*. 2006 Jan 20;53(2):234–42.
192. Patsaki A, Tchoumtchoua J, Passali C, Lelovas P, Kourkoulis S, Papaioannou N, et al. The Protective Effect of *Amphimas pterocarpoides* Plant Extract on Bone Mineral Density and Strength in Estrogen Deficient Ovariectomized Wistar Rats. *Med Aromat Plants*. 2016;5(5):1–7.
193. Patsaki A, Tchoumchoua J, Passali C, Lelovas P, Mitakou S, Papaioannou N, et al. Dose-dependent effect of *amphimas pterocarpoides* plant extract on bone loss in estrogen-deficient ovariectomized rats. *Arch Hell Med*. 2017;34(5).
194. Panjabi MM, Krag M, Summers D, Videman T. Biomechanical time-tolerance of fresh cadaveric human spine specimens. *J Orthop Res*. 1985;3(3):292–300.
195. Canalis E, McCarthy T, Centrella M. Growth factors and the regulation of bone remodeling. *J Clin Invest*. 1988 Feb 1;81(2):277–81.
196. Termine JD, Wong M. Post-menopausal women and osteoporosis: available choices for maintenance of skeletal health. *Maturitas*. 1998 Nov 16;30(3):241–5.
197. Agarwal C, Sharma Y, Zhao J, Agarwal R. A polyphenolic fraction from grape seeds causes irreversible growth inhibition of breast carcinoma MDA-MB468 cells by inhibiting mitogen-activated protein kinases activation and inducing G1

- arrest and differentiation. *Clin Cancer Res.* 2000 Jul;6(7):2921–30.
198. Coxam V. Prevention of osteopaenia by phyto-oestrogens: animal studies. *Br J Nutr.* 2003 Jun 1;89 Suppl 1(5):S75-85.
199. Seo SH, Lee J, Park IH. Efficacy of Dual Energy X-ray Absorptiometry for Evaluation of Biomechanical Properties: Bone Mineral Density and Actual Bone Strength. *J bone Metab.* 2014 Aug;21(3):205–12.
200. Hohman EE, Weaver CM. A Grape-Enriched Diet Increases Bone Calcium Retention and Cortical Bone Properties in Ovariectomized Rats. *J Nutr.* 2015 Feb 1;145(2):253–9.
201. Cardoso LM da F, Pimenta NDMA, Fiochi RDSF, Mota BFM, Monnerat JA de S, Teixeira CC, et al. Effects of red wine, grape juice and resveratrol consumption on bone parameters of Wistar rats submitted to high-fat diet and physical training. *Nutr Hosp.* 2017 Oct 27;35(2):416–20.