



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΡΕΥΝΑΣ ΠΑΘΗΣΕΩΝ ΜΥΟΣΚΕΛΕΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

«Θ.ΓΑΡΟΦΑΛΙΔΗΣ»

ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ : ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΣΜΗΝΗ ΔΟΝΤΑ

«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ ΣΤΗΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ
ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗ»

ΠΕΠΕ ΑΓΓΕΛΙΚΗ ΕΙΡΗΝΗ

ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ΟΜΟΤΙΜΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΑΓΓΕΛΙΚΗ ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΟΥ-ΠΙΤΙΔΗ

CC BY-NC-ND

ΑΘΗΝΑ 2021



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΡΕΥΝΑΣ ΠΑΘΗΣΕΩΝ ΜΥΟΣΚΕΛΕΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

«Θ.ΓΑΡΟΦΑΛΙΔΗΣ»

ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ : ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΣΜΗΝΗ ΔΟΝΤΑ

«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΜΑΣΤΙΧΑΣ ΧΙΟΥ ΣΤΗΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ
ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗ»

ΠΕΠΕ ΑΓΓΕΛΙΚΗ ΕΙΡΗΝΗ

ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ΟΜΟΤΙΜΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΑΓΓΕΛΙΚΗ ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΟΥ-ΠΙΤΙΔΗ

ΑΘΗΝΑ 2021

Ημερομηνία αίτησης: 26/2/2014

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 14/7/2014

Αποτελούμενη από τους:

Ομότιμη καθηγήτρια Αγγελική Τριανταφύλλου- Πιτίδη (Επιβλέπων μέλος)

Καθηγήτρια Ισμήνη Δοντά

Αναπληρωτής Καθηγητής Θεόδωρος Καρατζάς

Ημερομηνία καθορισμού θέματος διδακτορικής διατριβής: 22/1/2016

Ημερομηνία ορισμού Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής: 30/7/2021

Αποτελούμενη από τους:

Ομότιμη καθηγήτρια Αγγελική Τριανταφύλλου- Πιτίδη (Επιβλέπων μέλος)

Καθηγήτρια Ισμήνη Δοντά

Αναπληρωτής Καθηγητής Θεόδωρος Καρατζάς

κ. Αλέξιος-Λέανδρος Σκαλτσούνης, Καθηγητής Φαρμακευτικής Σχολής ΕΚΠΑ

κα, Μητάκου Σοφία, Καθηγήτρια Φαρμακευτικής Σχολής ΕΚΠΑ

κα. Μουτσάτσου- Παρασκευή, Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

κα. Ευανθία Κασσή, Αν. Καθηγήτρια Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

Στους γονείς μου, Σταυρό και Ελένη
και στην αδερφή μου, Ειρήνη
που βρίσκονται πάντα δίπλα μου.

ΟΡΚΟΣ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ

Ορκίζομαι στο θεό Απόλλωνα τον ιατρό και στο θεό Ασκληπιό και στην Υγεία και στην Πανάκεια και επικαλούμενος τη μαρτυρία όλων των θεών και των θεαινών ότι θα εκτελέσω κατά τη δύναμη και την κρίση μου τον όρκο αυτόν και τη συμφωνία αυτή. Να θεωρώ το διδάσκαλό μου της ιατρικής τέχνης ίσο με τους γονείς μου και κοινωνό του βίου μου. Και όταν χρειάζεται χρήματα να μοιράζομαι μαζί του τα δικά μου. Να θεωρώ την οικογένειά του αδέρφια μου και να τους διδάσκω αυτή την τέχνη αν θέλουν να τη μάθουν, χωρίς δίδακτρα ή άλλη συμφωνία. Να μεταδίδω τους κανόνες ηθικής, την προφορική διδασκαλία και όλες τις άλλες ιατρικές γνώσεις στους γιους μου, στους γιους του δασκάλου μου και στους εγγεγραμμένους μαθητές που πήραν τον ιατρικό όρκο, αλλά σε κανέναν άλλο. Θα χρησιμοποιώ τη θεραπεία για να βοηθήσω τους ασθενείς κατά τη δύναμη και την κρίση μου, αλλά ποτέ για να βλάψω ή να αδικήσω. Ούτε θα δίνω θανατηφόρο φάρμακο σε κάποιον που θα μού το ζητήσει, ούτε θα του κάνω μια τέτοια υπόδειξη. Παρομοίως, δεν θα εμπιστευθώ σε έγκυο γυναίκα μέσο που προκαλεί έκτρωση. Θα διατηρώ αγνή και άσπιλη και τη ζωή και την τέχνη μου. Δεν θα χρησιμοποιώ νυστέρι ούτε σε αυτούς που πάσχουν από λιθίαση, αλλά θα παραχωρώ την εργασία αυτή στους ειδικούς της τέχνης. Σε όσα σπίτια πηγαίνω, θα μπαίνω για να βοηθήσω τους ασθενείς και θα απέχω από οποιαδήποτε εσκεμμένη βλάβη και φθορά, και ιδίως από γενετήσιες πράξεις με άνδρες και γυναίκες, ελεύθερους και δούλους. Και όσα τυχόν βλέπω ή ακούω κατά τη διάρκεια της θεραπείας ή και πέρα από τις επαγγελματιές μου ασχολίες στην καθημερινή μου ζωή, αυτά που δεν πρέπει να μαθευτούν παραέξω δεν θα τα κοινοποιώ, θεωρώντας τα θέματα αυτά μυστικά. Αν τηρώ τον όρκο αυτό και δεν τον παραβώ, ας χαίρω πάντοτε υπολήψεως ανάμεσα στους ανθρώπους για τη ζωή και για την τέχνη μου. Αν όμως τον παραβώ και επιορκήσω, ας πάθω τα αντίθετα.

Βιογραφικό Σημείωμα

Τίτλοι Σπουδών

2014-2021: Υποψήφια διδάκτορας της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

2010-2012: Μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών Πανεπιστημίου Πατρών. Εφαρμοσμένη βιοχημεία: Κλινική χημεία-βιοτεχνολογία, αξιολόγηση φαρμακευτικών προϊόντων. Βαθμός πτυχίου 8,83.

2006-2010: Πτυχίο του Πανεπιστημίου Πατρών, Τμήμα Χημείας. Βαθμός πτυχίου 7,75.

2000-2004: Πτυχίο του Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος Αθηνών, Τμήμα ραδιολογίας-ακτινολογίας της σχολής επαγγελματιών υγείας και πρόνοιας. Βαθμός πτυχίου 7,66.

Επαγγελματική εμπειρία

4/2004-9/2004: Πρακτική άσκηση στο τμήμα αξονικού και μαγνητικού τομογράφου του 1ου νοσοκομείου ΙΚΑ.

7/2005-3/2006: Τμήμα κλασικής ακτινολογίας του 417 ΝΙΜΤΣ

10/2014-5/2015: Ακτινολογικό τμήμα Νοσοκομείου Αλεξάνδρα.

7/2015-8/2015: Summer foundation course at Emfasis Education Group (Προετοιμασία μαθητών για την εισαγωγή και τη φοίτηση σε αγγλόφωνα πανεπιστήμια του εξωτερικού. Ύλη: Ανόργανη χημεία, Οργανική χημεία και Βιομόρια. Σημειώσεις.)

10/2015-6/2016: Winter foundation course at Emfasis Education Group.

6/2017- : Τμήμα κλασικής ακτινολογίας του Γ.Ν.Θ Ιπποκρατείου

8/2019 – 2/2020 : Καθηγήτρια στο ΙΕΚ Παστέρ στα μαθήματα Ακτινοτεχνολογία Ι και Ακτινοφυσική Ι.

Πρόσθετες Πληροφορίες

Αγγλικά: Certificate of Proficiency in English – University of Michigan

Η/Υ: ECDL, Mac OS (iWork)

Εργασίες

Μεταπτυχιακή διατριβή: «Μελέτη της έκφρασης της σεργλυκίνης σε όγκους όρχεων και του ρόλου της στην ρύθμιση της έκφρασης βιοδραστικών μορίων»

Διπλωματική εργασία: «Επίδραση της θειικής χονδροϊτίνης και του υαλουρονικού οξέος στη δραστηριότητα του συμπληρώματος»

Πτυχιακή εργασία: «Λάθη και παραλήψεις ακτινοτεχνολογίας αυχενικής μοίρας σπονδυλικής στήλης»

Δημοσιεύσεις

«Διαγνωστική προσέγγιση της πνευμονικής εμβολής και η αξία της υπολογιστικής τομογραφίας»,
Ακτινοτεχνολογία (τεύχος 16)

Chios Mastic Gum consumption has a protective effect on ovariectomy-induced bone loss in rats.
Angeliki Eirini Pepe, Pavlos Lelovas, Vasiliki K Pachi, Maria Halabalaki, Antonis Galanos,
Panagiota Mikou, Dimitrios Pitidis Poutos, George Papadomichelakis, Stavros Kourkoulis,
Ermioni Pasiou, Sofia Mitakou, Theodore Karatzas, Angeliki Triantafyllou, Ismene A Dontas.
(Preventive Nutrition and Food Science, Date accepted: Apr 22, 2021)

Ανακοινώσεις σε συνέδρια

Investigation of the effect of Chios mastic gum on ovariectomy-induced bone loss in rats.
Pepe A., Lelovas P., Zoitsis S., Aligiannis N., Galanos A., Skaltsounis L., Papadomichelakis G.,
Karatzas T., Dontas I., Triantafyllou A.
13th FELASA Congress, 2016, Brussels, Belgium

Cytologic evaluation of vaginal smears in ovariectomised rats on special diets as an index of
estrogenic effect.

P. Mikou, D. Galanis, S. Zoitsis, A. Pepe, P. Lelovas, S. Mitakou, I. Dontas
40th European Congress of Cytology, October 2016, Liverpool

Protective effect of Chios Mastic Gum on bone mineral density of ovariectomized rats
A.E. Pepe, P. Lelovas, V.K. Pachi, L. A. Skaltsounis, S. Mitakou, A. Galanos, I. Dontas
20th International Congress of the International Society for Ethnopharmacology

Ομιλίες σε Συνέδρια -Ημερίδες

Μελέτη της δράσης της Μαστιχας Χίου στην πρόληψη της οστεοπόρωσης στο πειραματικό πρότυπο
του θήλεος ωθηκεκτομημένου επίμουσ.

Πεπέ Α., Λελόβας Π., Καρατζάς Θ., Δοντά Ι., Τριανταφύλλου Α.

26ο Πανελλήνιο Συνέδριό της Ελληνικής Εταιρείας Μελέτης Μεταβολισμού των Οστών
(Ε.Ε.Μ.Μ.Ο), Θεσσαλονίκη

Ο ρόλος του Τεχνολόγου Ακτινολογίας Ακτινοθεραπείας στο νοσοκομείο.

Πεπέ Α.

Επαγγελματική ημερίδα της Ένωσης Τεχνολόγων Ακτινολόγων Κεντρικής Μακεδονίας, Θεσσαλονίκη

Η επίδραση της ακτινοβολίας στο ανθρώπινο σώμα

Α. Πεπέ– Δ. Δαλάλας

3ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσηλευτών - Χειριστών Επεμβατικής Καρδιολογίας & Ηλεκτροφυσιολογίας

Δημοσιεύσεις που προέκυψαν από την εκτέλεση της διατριβής

Chios Mastic Gum consumption has a protective effect on ovariectomy-induced bone loss in rats. Angeliki Eirini Pepe, Pavlos Lelovas, Vasiliki K Pachi, Maria Halabalaki, Antonis Galanos, Panagiota Mikou, Dimitrios Pitidis Poutos, George Papadomichelakis, Stavros Kourkoulis, Ermioni Pasiou, Sofia Mitakou, Theodore Karatzas, Angeliki Triantafyllou, Ismene A Dontas. (Preventive Nutrition and Food Science, Date accepted: Apr 22, 2021, PNF Vol 26 No. 2 (June, 2021))

Προφορικές και γραπτές ανακοινώσεις σε διεθνή συνέδρια που προέκυψαν από τα στοιχεία της διατριβής

Investigation of the effect of Chios mastic gum on ovariectomy-induced bone loss in rats.

Pepe A., Lelovas P., Zoitsis S., Aligiannis N., Galanos A., Skaltsounis L., Papadomichelakis G., Karatzas T., Dontas I., Triantafyllou A.

13th FELASA Congress, 2016, Brussels, Belgium

Cytologic evaluation of vaginal smears in ovariectomised rats on special diets as an index of estrogenic effect.

P. Mikou, D. Galanis, S. Zoitsis, A. Pepe, P. Lelovas, S. Mitakou, I. Dontas

40th European Congress of Cytology, October 2016, Liverpool

Μελέτη της δράσης της Μαστίχας Χίου στην πρόληψη της οστεοπόρωσης στο πειραματικό πρότυπο του θήλεος ωθηκεκτομημένου επίμουσ.

Πεπέ Α., Λελόβας Π., Καρατζάς Θ., Δοντά Ι., Τριανταφύλλου Α.

26ο Πανελλήνιο Συνέδριό της Ελληνικής Εταιρείας Μελέτης Μεταβολισμού των Οστών (Ε.Ε.Μ.Μ.Ο), Θεσσαλονίκη

Protective effect of Chios Mastic Gum on bone mineral density of ovariectomized rats

A.E. Pepe, P. Lelovas, V.K. Pachi, L. A. Skaltsounis, S. Mitakou, A. Galanos, I. Dontas

20th International Congress of the International Society for Ethnopharmacology

Περιεχόμενα

| | |
|--|----|
| Βιογραφικό Σημείωμα | 6 |
| Περιεχόμενα | 10 |
| Πίνακας Εικόνων | 12 |
| Πίνακας πινάκων | 13 |
| Γενικό Μέρος..... | 15 |
| Εισαγωγή | 15 |
| Θεμέλια ουσία και ασβεστοποίηση..... | 15 |
| Σχηματισμός του οστού και απορρόφηση | 16 |
| Σύζευξη απορρόφησης και σχηματισμού..... | 18 |
| Οστεοκύτταρα | 19 |
| Οστεοπόρωση και οστεοπενία..... | 20 |
| Φυσιολογία | 23 |
| Θεραπεία | 24 |
| Πειραματικές μελέτες..... | 25 |
| Ηθικό πλαίσιο | 25 |
| Κριτήρια καταλληλότητας των πειραματικών προτύπων..... | 27 |
| Επίμυες- Πειραματικό πρότυπο οστεοπόρωσης..... | 28 |
| Οι επίμυες ως πειραματικό πρότυπο για τη μελέτη της οστεοπόρωσης | 28 |
| Πρότυπα επιμύων για τη μελέτη της οστεοπόρωσης | 29 |
| Μέθοδοι αξιολόγησης της οστεοπενίας στους επίμυες..... | 30 |
| Μη επεμβατικές μέθοδοι..... | 31 |
| Επεμβατικές μέθοδοι | 32 |
| Συλλογή κολπικών επιχρισμάτων..... | 34 |
| Ειδικό Μέρος..... | 38 |
| Σκοπός της μελέτης..... | 38 |
| Υλικά και μέθοδοι..... | 38 |
| Ζωικά πρότυπα –στέγαση και ομαδοποίηση | 38 |
| Ταυτοποίηση και αρίθμηση επιμύων | 40 |
| Μέτρηση οστικής πυκνότητας | 41 |

| | |
|--|-----------|
| Ωοθηκειτομή..... | 44 |
| Χορήγηση Μαστίχας Χίου | 46 |
| Ανάλυση Μαστίχας Χίου | 46 |
| Προετοιμασία εκχυλίσματος..... | 46 |
| Δοσολογία εκχυλίσματος..... | 47 |
| Παρακολούθηση σωματικού βάρους..... | 48 |
| Παρακολούθηση κατανάλωσης νερού και τροφής..... | 48 |
| Συλλογή κολπικών επιχρισμάτων | 48 |
| Ευθανασία, συλλογή και ζύγιση οργάνων | 49 |
| Δοκιμή μηχανικής αντοχής των οστών..... | 49 |
| Θραύση οστών | 50 |
| Σταθεροποίηση οστών σε ρητίνη..... | 52 |
| Λείανση και φωτογραφίες στο στερεοσκόπιο | 53 |
| Υπολογισμός των τάσεων που δημιουργούνται στο οστό κατά την κάμψη..... | 54 |
| Στατιστική ανάλυση..... | 55 |
| Αποτελέσματα | 58 |
| Ανάλυση Μαστίχας Χίου | 58 |
| Σωματικά βάρη επιμύων | 58 |
| Βάρη οργάνων..... | 59 |
| Μέτρηση οστικής πυκνότητας | 61 |
| Αριστερή κνήμη..... | 61 |
| Εγγύς μετάφυση..... | 63 |
| 6 ^{ος} οσφυϊκός σπόνδυλος..... | 65 |
| Μηχανική Αντοχή Οστών | 67 |
| Κυτταρολογική Αξιολόγηση Κολπικών Επιχρισμάτων | 68 |
| Συζήτηση | 72 |
| Συμπεράσματα | 78 |
| Περίληψη | 80 |
| Abstract..... | 81 |
| Βιβλιογραφία..... | 83 |

Πίνακας Εικόνων

| | |
|--|----|
| Εικόνα 1. RANK, RANKL και OPG. | 19 |
| Εικόνα 2. Δοκιμασία κάμψης τριών σημείων. | 34 |
| Εικόνα 3. Δοκιμασία κάμψης τεσσάρων σημείων. | 34 |
| Εικόνα 4. Χώρος φύλαξης των επιμύων στο Εργαστήριο «Έρευνας Παθήσεων Μυοσκελετικού Συστήματος» του Νοσοκομείου ΚΑΤ. | 39 |
| Εικόνα 5. Σύσταση της ειδικής τροφής συντήρησης 4RF21 GPL που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη των επιμύων από την ηλικία των 3 μηνών έως την ηλικία των 6 μηνών. | 40 |
| Εικόνα 6. Μέθοδος αρίθμησης και ταυτοποίησης των επιμύων με τις μονάδες να σημαίνονται στο δεξιό ουσ και τις δεκάδες στο αριστερό (Λοντά, 1993). | 41 |
| Εικόνα 7. Χρονοδιάγραμμα πειραματικής διαδικασίας. | 42 |
| Εικόνα 8. Τοποθέτηση αναισθητοποιημένου επίμυος στο ειδικό υπόστρωμα για τη μέτρηση της BMD. | 43 |
| Εικόνα 9. Τοποθέτηση αναισθητοποιημένου επίμυος στο μηχανήμα D.E.X.A. για τη μέτρηση της BMD. | 43 |
| Εικόνα 10. ROIs στην περιοχή της κνήμης και του 6 ^{ου} οσφυϊκού σπονδύλου. | 44 |
| Εικόνα 11. Ακτινοποίηση του αναισθητοποιημένου επίμυος για την πραγματοποίηση της ωοθηκεκτομής. | 45 |
| Εικόνα 12. Σύσταση τροφής χωρίς σόγια. | 47 |
| Εικόνα 13. Τοποθέτηση μηριαίου οστού | 50 |
| Εικόνα 14. Τοποθέτηση του οστού στην αρπάγη, πάντα με καθορισμένη απόσταση $L=16\text{mm}$, το οστό δέχεται πίεση από ένα έμβολο με μια δύναμη F . d είναι η μετατόπιση (displacement) του εμβόλου καθώς κατεβαίνει σταδιακά μέχρι να επέλθει πλήρης αστοχία. | 51 |
| Εικόνα 15. Δεδομένα από την δοκιμασία κάμψης 3 σημείων του οστού LF45 που ανήκει στην ομάδα CMG. | 52 |
| Εικόνα 16. Διαφορετικές διατομές οστών. | 52 |
| Εικόνα 17. Σταθεροποίηση του οστού. | 53 |
| Εικόνα 18. Οστό σε ρητίνη (RF45). | 53 |
| Εικόνα 19. Φωτογραφία από το στερεοσκόπιο του δεξιού μηριαίου του επίμυος 57. | 54 |
| Εικόνα 20. Πλήρες χρωματογράφημα UPLC-ESI(-)-HRMS της Μαστίχας Χίου η οποία χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη, στο οποίο φαίνονται οι κορυφές και οι δομές των κύριων τριτερπενικών οξέων. | 58 |
| Εικόνα 21. Διάγραμμα της ποσοστιαίας μεταβολής της BMD ($mean \pm SD \%$) της αριστερής κνήμης των τριών ομάδων. | 63 |
| Εικόνα 22. Διάγραμμα της ποσοστιαίας μεταβολής της BMD ($mean \pm SD \%$) της εγγύς μετάφυσης της αριστερής κνήμης των τριών ομάδων. | 65 |
| Εικόνα 23. Διάγραμμα της ποσοστιαίας μεταβολής της BMD ($mean \pm SD \%$) του τελευταίου οσφυϊκού σπονδύλου των τριών ομάδων. | 67 |
| Εικόνα 24. Χρώση Παπανικολάου: κυριαρχούν μικρά εμπύρρινα επιθηλιακά κύτταρα (Πρόοιστρος). | 68 |
| Εικόνα 25. Χρώση Παπανικολάου: κυριαρχούν απύρρινα κερατινοποιημένα επιθηλιακά κύτταρα (Οίστρος) | 69 |
| Εικόνα 26. Χρώση Παπανικολάου: κυριαρχούν ουδετερόφιλα κύτταρα (Λίοιστρος). | 69 |

Πίνακας πινάκων

| | |
|---|----|
| Πίνακας 1. Κλινικοί παράγοντες κινδύνου για κατάγματα που περιλαμβάνονται στο εργαλείο FRAX αξιολόγησης κινδύνου κατάγματος. | 22 |
| Πίνακας 2. Αλγόριθμος των προτεινόμενων και υπό συνθήκες προτεινόμενων ζωικών προτύπων στην έρευνα της οστεοπόρωσης. | 28 |
| Πίνακας 3. Χρόνοι μεταβολής από την κατασκευή στην ανακατασκευή στον σκελετό των επιμύων (Jee and Yao, 2001, Erben, 1996) | 29 |
| Πίνακας 4. Όργανα που συλλέχθηκαν κατά την ευθανασία. | 49 |
| Πίνακας 6. Βάρη οργάνων στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας. | 61 |
| Πίνακας 7. Βάρη οργάνων / BW (%) στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας. | 61 |
| Πίνακας 8. Σύγκριση των τιμών BMD της κνήμης μεταξύ των ομάδων κατά την περίοδο των 6 μηνών. Σύγκριση των απόλυτων τιμών (g/cm^2) και των ποσοσטיών μεταβολών της BMD της κνήμης μεταξύ των ομάδων στην αρχή της πειραματικής διαδικασίας (πριν την ωθηκεκτομή), 3 και 6 μήνες μετά την ωθηκεκτομή. | 62 |
| Πίνακας 9. Σύγκριση των τιμών BMD της εγγύς μετάφρωση της αριστερής κνήμης μεταξύ των ομάδων κατά την περίοδο των 6 μηνών. Σύγκριση των απόλυτων τιμών (g/cm^2) και των ποσοσטיών μεταβολών της BMD της εγγύς μετάφρωση της αριστερής κνήμης μεταξύ των ομάδων στην αρχή της πειραματικής διαδικασίας (πριν την ωθηκεκτομή), 3 και 6 μήνες μετά την ωθηκεκτομή. | 64 |
| Πίνακας 10. Σύγκριση των τιμών BMD του 6 ^{ου} οσφυϊκού σπονδύλου μεταξύ των ομάδων κατά την περίοδο των 6 μηνών. Σύγκριση των απόλυτων τιμών (g/cm^2) και των ποσοσטיών μεταβολών της BMD του 6 ^{ου} οσφυϊκού σπονδύλου μεταξύ των ομάδων στην αρχή της πειραματικής διαδικασίας (πριν την ωθηκεκτομή), 3 και 6 μήνες μετά την ωθηκεκτομή. | 66 |
| Πίνακας 11. Εμβιομηχανικές παράμετροι δεξιού μηριαίου οστού. | 67 |
| Πίνακας 12. Αξιολόγηση των κολπικών επιχρισμάτων της ομάδας Control. | 68 |
| Πίνακας 13. Δείκτης κερατινοποιημένων κυττάρων, CI | 69 |

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Γενικό Μέρος

Εισαγωγή

Οστίτης Ιστός

Ο σκελετός έχει δομική, προστατευτική και κινητική λειτουργία και αποτελεί αποθήκη ασβεστίου. Αποτελείται από φλοιώδες και σπογγώδες οστό, με το φλοιώδες οστό να είναι έντονα ασβεστοποιημένο και να έχει κυρίως δομική και προστατευτική δράση. Το σπογγώδες οστό περιέχει λιγότερο ασβέστιο και καλύπτει μεγαλύτερη επιφάνεια γεγονός που του επιτρέπει να έχει μεταβολική δράση. Συνολικά, ο ανθρώπινος σκελετός αποτελείται 80% από φλοιώδες οστό και 20% από σπογγώδες οστό. Η αναλογία φλοιώδους και σπογγώδους οστού ποικίλει ανάλογα με το σημείο του σκελετού, για παράδειγμα οι σπόνδυλοι είναι πλούσιοι σε σπογγώδες οστό και έχουν πολύ λίγο φλοιώδες οστό, ενώ τα μακριά οστά έχουν πιο παχύ φλοιό και σχετικά λιγότερο σπογγώδες οστό.

Κατά την παιδική και εφηβική ηλικία τα οστά αυξάνονται σε μέγεθος και ασβεστοποιούνται, μια διαδικασία η οποία ονομάζεται ανάπτυξη. Η οστική μάζα αυξάνεται από 80 g κατά τη γέννηση σε 3000 g στην ηλικία των 25 ετών, όπου και θεωρείται η μέγιστη οστική πυκνότητα. Τα πλατιά οστά, όπως το κρανίο, αυξάνονται με ενδομεμβρανική οστεοποίηση και τα μακριά οστά, όπως το βραχιόνιο και το μηριαίο, αυξάνονται σε μήκος με ενδοχονδρική οστεοποίηση και σε πλάτος με περιοστική εναπόθεση.

Ο σχηματισμός των οστών είναι η διαδικασία κατά την οποία τα οστά σχηματίζονται και προσαρμόζονται στα φορτία καθώς και σε άλλες επιρροές. Ο σχηματισμός των οστών μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγή της μάζας, του μεγέθους και της γεωμετρίας των οστών. Ο σχηματισμός του φλοιώδους οστού στις επιφάνειες του περιόστεου και του ενδόστεου αλλάζει τη διάμετρο του οστού καθώς και το πάχος του φλοιώδους.

Η ανακατασκευή των οστών είναι μια διαδικασία ανανέωσης και επισκευής των οστών η οποία συνεχίζεται καθ' όλη τη διάρκεια της ενήλικης ζωής. Στην εμμηνόπαυση παρατηρείται μια γρήγορη αύξηση της οστικής ανακατασκευής, ενώ στους άντρες παρατηρείται πιο σταδιακή αύξηση σε σχέση με την ηλικία. Οι αλλαγές αυτές στην οστική ανακατασκευή κατοπτρίζονται στην οστική μάζα.

Θεμέλια ουσία και ασβεστοποίηση

Η θεμέλια ουσία αποτελείται από ίνες κολλαγόνου τύπου I με γλυκοπρωτεΐνες, πρωτεογλυκάνες, γ-καρβοξυλιωμένες πρωτεΐνες και νερό. Πολλές από τις μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες έχουν φυσιολογικούς ρόλους στη ρύθμιση της δράσης των οστικών κυττάρων και την ασβεστοποίηση.

Το κολλαγόνο τύπου I είναι μια τριπλή έλικα που περιέχει δυο πανομοιότυπες αλυσίδες α1 και μια αλυσίδα α2. Οι ίνες κολλαγόνου στο ώριμο οστό προσανατολίζονται σε εναλλασσόμενα στρώματα προσδίδοντας μέγιστη αντοχή στη δομή.

Το ανόργανο συστατικό του οστίτη ιστού είναι ο υδροξυαπατίτης ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$). Οι κρύσταλλοι του υδροξυαπατίτη βρίσκονται κατά μήκος των ινών του κολλαγόνου. Η ανόργανη ουσία ενισχύει το οστό αυξάνοντας τη μηχανική αντοχή του. Η θεμέλια ουσία και τα ανόργανα συστατικά συμβάλλουν και τα δυο στις μηχανικές ιδιότητες του οστού. Η μήτρα του κολλαγόνου παρέχει ανθεκτικότητα (η μέγιστη ποσότητα ενέργειας που μπορεί να απορροφήσει το οστό πριν από το κάταγμα) και τα ανόργανα συστατικά παρέχουν ακαμψία (ο βαθμός στον οποίο το οστό αντιστέκεται στην παραμόρφωση όταν εφαρμόζεται δύναμη). Αυτό αποδεικνύεται στην ατελή οστεογένεση, όπου ποσοτικές ή ποιοτικές ανωμαλίες του κολλαγόνου οδηγούν σε κάταγμα λόγω μειωμένης σκληρότητας. Στην οστεομαλακία, που συνήθως οφείλεται σε ανεπάρκεια βιταμίνης D, η ελλιπής ασβεστοποίηση μπορεί να οδηγήσει σε οστική δυσμορφία και κάταγμα λόγω απώλειας της δυσκαμψίας.

Σχηματισμός του οστού και απορρόφηση

Ο σχηματισμός και η απορρόφηση του οστού αποτελούν τη βάση της ανάπτυξης, της κατασκευής και της ανακατασκευής.

Η οστική ανακατασκευή είναι μια συνεχής διαδικασία που ανανεώνει τα οστά ώστε να επισκευάζονται οι μικροβλάβες τους και να διατηρείται η αντοχή τους. Συμβάλλει, επίσης, στη διατήρηση του ασβέστιου του ορού σε φυσιολογικά όρια με απελευθέρωση αλάτων από τη μήτρα των οστών. Περίπου το 5 έως 10% του σκελετού των ενηλίκων αντικαθίσταται με την οστική ανακατασκευή κάθε χρόνο.

Η ανακατασκευή στο σπογγώδες οστό και στην ενδοφλοιώδη επιφάνεια λαμβάνει χώρα στην επιφάνεια του οστού, όμως στο φλοιώδες οστό οι οστεοκλάστες σχηματίζουν έναν κώνο αναρρόφησης μέσα στη μήτρα του οστού.

Το σήμα για την έναρξη της ανακατασκευής μπορεί να προέρχεται από το ενδοκρινικό σύστημα (όπως αυξημένη PTH σε απόκριση στην υπασβεσταιμία), γεγονός που οδηγεί σε γενικευμένη αύξηση της ενεργοποίησης των οστεοκλαστών. Η τοπική ανακατασκευή ξεκινάει ως απόκριση στις μικροβλάβες, πιθανώς μέσω της σηματοδότησης των οστεοκυττάρων.

Κατά τη διάρκεια ενός κύκλου ανακατασκευής, οι οστεοκλάστες στην οστική επιφάνεια ενεργοποιούνται και απορροφούν την οστική μήτρα, δημιουργώντας ένα βοθρίο το οποίο γεμίζει με

οστεοβλάστες. Ο κύκλος ανακατασκευής συνήθως διαρκεί περίπου 200 ημέρες. Ο κύκλος ανακατασκευής των οστών ρυθμίζεται σε μεγάλο βαθμό, και η απορρόφηση και ο σχηματισμός συνδέονται στενά, έτσι ώστε σε υγιή άτομα και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ο σχηματισμός και η απορρόφηση του οστού να πραγματοποιούνται στον ίδιο βαθμό και η ποσότητα του οστικού ιστού να είναι η ίδια στην αρχή και στο τέλος του κύκλου.

Οι οστεοκλάστες είναι γιγαντιαία πολυπύρρηνα κύτταρα της οικογένειας των μονοκυττάρων. Οι οστεοκλάστες επιτίθενται στο οστό με ιντεγρίνες και η πτυχωτή τους επιφάνεια σχηματίζει ένα σφραγισμένο τμήμα πάνω από την οστική επιφάνεια. Εκκρίνουν ιόντα υδρογόνου και ένζυμα όπως καθεψίνη K και μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs) στο σφραγισμένο τμήμα. Το όξινο περιβάλλον διαλύει τα άλατα των οστών και τα ένζυμα διασπούν την οστική μήτρα. Η διαφοροποίηση, η ενεργοποίηση και η απόπτωση των οστεοκλαστών υπόκεινται σε πολλαπλές τοπικές και ενδοκρινικές επιδράσεις. Οι βασικοί παράγοντες στη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών, είναι οι παράγοντες διέγερσης αποικιών μακροφάγων (macrophage colony stimulating factor, M-CSF) και ο ενεργοποιητής του υποδοχέα του πυρηνικού παράγοντα- κ B (receptor activator of nuclear factor- κ B, RANK). Οι αντι-απορροφητικές αγωγές για την οστεοπόρωση, συμπεριλαμβανομένων των διφωσφονικών, την ορμονική θεραπεία αντικατάστασης, τους επιλεκτικούς διαμορφωτές υποδοχέων οιστρογόνων και τη δenosουμάμπη (denosumab), μειώνουν τη δράση των οστεοκλαστών, καθυστερώντας έτσι και την απορρόφηση. Τα διφωσφονικά προσκολλώνται στην επιφάνεια του οστού και εισέρχονται στο οστό από τον οστεοκλάστη κατά τη διάρκεια της οστικής απορρόφησης, απενεργοποιώντας τον οστεοκλάστη ή προκαλώντας απόπτωση. Η δenosουμάμπη είναι ένα ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα που στοχεύει και συνδέεται με υψηλή συγγένεια και ειδικότητα με το RANKL (Kostenuik et al., 2009), προλαμβάνοντας την ενεργοποίηση του υποδοχέα του, του RANK, στην επιφάνεια των οστεοκλαστών και των πρόδρομων οστεοκλαστών.

Οι οστεοβλάστες δημιουργούν την οστική μήτρα και υποβοηθούν την ασβεστοποίηση της. Προέρχονται από μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα και ανήκουν στην ίδια οικογένεια με τα χονδροκύτταρα, τους μυοβλάστες, τους ινοβλάστες και τα λιποκύτταρα. Οι ανενεργοί/αδρανείς οστεοβλάστες βρίσκονται κατά μήκος της οστικής επιφάνειας ως επενδυτικά κύτταρα και οι ενεργοί οστεοβλάστες είναι κυβοειδή κύτταρα τα οποία σχηματίζουν μια μονή στοιβάδα στην επιφάνεια του νεοσχηματισμένου οστεοειδούς.

Η πρωτογενής ασβεστοποίηση, με την εναπόθεση κρυστάλλων υδροξυαπατίτη, αρχίζει περίπου δύο εβδομάδες μετά το σχηματισμό της μη ασβεστοποιημένης μήτρας (οστεοειδές) από τον οστεοβλάστη και συνεχίζεται για περίπου 6 μήνες. Η δευτερογενής ασβεστοποίηση εξελίσσεται για 2 έως 3 χρόνια, με ενσωμάτωση περισσότερων αλάτων και ανάπτυξη κρυσταλλικών δομών.

Όταν η αναδημιουργία και ο σχηματισμός του οστού είναι πλήρης, μερικοί οστεοβλάστες υποβάλλονται σε απόπτωση, μερικοί γίνονται κύτταρα επένδυσης και μερικοί παγιδεύονται στο ασβεστοποιημένο οστό όπου παραμένουν ως οστεοκύτταρα.

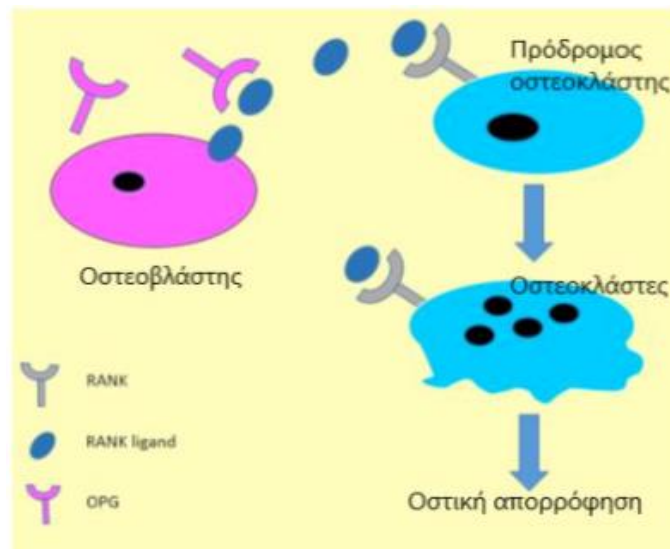
Η οστική ανακατασκευή έχει κιρκάδιο ρυθμό, ο οποίος είναι πιο έντονος για την απορρόφηση από ότι για τον σχηματισμό. Η ανακατασκευή των οστών αυξάνεται τη νύχτα και μειώνεται κατά τη διάρκεια της ημέρας. Ο ρυθμός της ανακατασκευής καθορίζεται/επηρεάζεται από ένα συνδυασμό ενδοκρινικών παραγόντων, όπως η κορτιζόλη, η κυτοκίνη και η μελατονίνη, τοπικών παράγοντων, όπως ο πυρηνικός υποδοχέας PPAR γ (peroxisomal proliferator activated receptor gamma) και τα γονίδια ρύθμισης κιρκάδιου ρυθμού (clock genes).

Σύζευξη απορρόφησης και σχηματισμού

Η ισορροπία και ο ρυθμός ανακατασκευής των οστών είναι κρίσιμη για την οστική μάζα και την ποιότητα των οστών. Η απορρόφηση και ο σχηματισμός συνδέονται από τοπικούς παράγοντες και ένας από τους βασικούς ρυθμιστές είναι το σύστημα RANK/RANKL /OPG (οστεοπροτεγερίνη). Ο RANK είναι ένας υποδοχέας που εκφράζεται στην κυτταρική μεμβράνη των πρόδρομων και των ώριμων οστεοκλαστών και η ενεργοποίησή του διεγείρει τη διαφοροποίηση και τη δράση των οστεοκλαστών. Ο υποδοχέας RANK εκκρίνεται από τα στρωματικά κύτταρα (stromalcells) ή τους οστεοβλάστες και είναι ο κύριος παρακρινικός παράγοντας στην ενεργοποίηση της μονάδας ανακατασκευής του οστού. Η ενεργοποίηση του RANK στους οστεοκλάστες και τους πρόδρομους οστεοκλάστες απαιτεί την παρουσία του M-CSF. Η OPG εκκρίνεται επίσης από τους οστεοβλάστες και είναι ένας διαλυτός υποδοχέας ανταγωνιστής που εξουδετερώνει τον υποδοχέα RANK και έτσι μειώνει τη διαφοροποίηση και τη δράση των οστεοκλαστών (Εικόνα 1). Η έκκριση του υποδοχέα RANK και της OPG ρυθμίζονται από ορμόνες και κυτοκίνες, συμπεριλαμβανομένων των στεροειδών του φύλου, την IL-1 (ιντερλευκίνη 1) και της PGE2 (προσταγδαλίνη E2). Πολλοί από τους βασικούς ρυθμιστές της οστικής απορρόφησης δρουν μέσω της αλλαγής των σχετικών ποσοτήτων του υποδοχέα RANK και της OPG που εκκρίνεται από τους οστεοβλάστες.

Οι μηχανισμοί που συνδέουν το σχηματισμό του οστού με την αναρρόφηση, για να εξασφαλιστεί ότι ο χώρος αναρρόφησης συμπληρώνεται, είναι λιγότερο κατανοητοί. Είναι μια τοπικά ρυθμιζόμενη διαδικασία και πιθανόν να υπάρχει συμβολή από παράγοντες που απελευθερώνονται από τη μήτρα των οστών κατά τη διάρκεια της απορρόφησης και παράγοντες που εκκρίνονται από τους οστεοκλάστες και άλλα τοπικά κύτταρα όπως τα μακροφάγα.

Εικόνα 1. RANK, RANKL και OPG.



Οστεοκύτταρα

Τα οστεοκύτταρα είναι τα κύρια κύτταρα του οστού και ξεπερνούν το 90% του συνόλου των οστικών κυττάρων. Αναπτύσσονται από οστεοβλάστες που έχουν ολοκληρώσει το ρόλο τους στον σχηματισμό του οστού και ενσωματώνονται σε κενά εντός της οστικής μήτρας και έχουν μακρές συνδέσεις που διέρχονται μέσω διαύλων και τους επιτρέπουν να ενεργούν ως κέντρα της διακυτταρικής επικοινωνίας. Τα οστεοκύτταρα έχουν σημαντικό ρόλο στην απόκριση του οστού σε μικροβλάβες και μηχανικά ερεθίσματα και ρυθμίζουν το μεταβολισμό των φωσφορικών μέσω έκκρισης του FGF-23 (αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών 23).

Όταν αναπτύσσονται μικροβλάβες στα οστά, τα τοπικά οστεοκύτταρα υποβάλλονται σε απόπτωση και σηματοδοτούν τους οστεοκλάστες για να ξεκινήσουν τον κύκλο ανακατασκευής και να αρχίσουν την οστική απορρόφηση.

Έχει προταθεί ότι τα οστεοκύτταρα είναι οι αισθητήρες φόρτωσης και μηχανικών ερεθισμάτων. Καθώς εφαρμόζεται πίεση στα οστά, η διάτμηση του ρευστού στα κανάλια παραμορφώνει την κυτταρική μεμβράνη του δενδρίτη του οστεοκυττάρου και αρχίζει την ενδοκυτταρική σηματοδότηση.

Οστεοπόρωση και οστεοπενία

Η οστεοπόρωση αποτελεί μια διαταραχή με σοβαρές επιπτώσεις παγκοσμίως και τα οστεοπορωτικά κατάγματα έχουν συσχετιστεί με την επιβάρυνση του κόστους υγειονομικής περίθαλψης, τη νοσηρότητα και τη θνητότητα (Center et al., 1999). Η συντριπτική πλειοψηφία των ασθενών δεν έχουν διαγνωσθεί και δεν λαμβάνουν θεραπεία, ιδιαίτερα οι ασθενείς υψηλού κινδύνου (Silverman and Christiansen, 2012). Στους ασθενείς άνω των 65 ετών, η αύξηση της συχνότητας εμφάνισης οστεοπορωτικών καταγμάτων συνοδεύεται από δεινές επιπτώσεις όπως αναπηρία και θνητότητα (Lin and Lane, 2006).

Η οστεοπόρωση ορίζεται ως η αλλοίωση της οστικής μάζας και της μικροαρχιτεκτονικής δομής των οστών, μαζί με την αύξηση της ευθραυστότητας, που προδιαθέτει τα οστά για κατάγματα (Kanis et al., 2008).

Κατάταξη

Η οστεοπόρωση μπορεί να ταξινομηθεί σε δυο γενικές κατηγορίες, την πρωτοπαθή και τη δευτερογενή. Η πρωτοπαθής οστεοπόρωση σχετίζεται με τη γήρανση και τη μειωμένη λειτουργία των γονάδων, ενώ η δευτερογενής οστεοπόρωση προκαλείται από συγκεκριμένα νοσήματα ή θεραπείες όπως υπογοναδισμός, υπερασβεστιουρία, υπερπαραθυρεοειδισμός, υπερθυρεοειδισμός, ρευματοειδής αρθρίτιδα και χρόνια νεφρική νόσο (Adler, 2014, Sözen et al., 2017).

Η πρωτοπαθής οστεοπόρωση υποδιαιρείται βάση ηλικίας σε οστεοπόρωση τύπου I (<70 ετών) και τύπου II (>70 ετών). Η οστεοπόρωση τύπου I, η οποία ονομάζεται και μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση, εμφανίζεται πιο συχνά στις γυναίκες και συνήθως εξαρτάται από το επίπεδο των ορμονών. Χαρακτηρίζεται από υπερβολική επαναρρόφηση του οστού και η απώλεια του σπογγώδους οστού είναι μεγαλύτερη από αυτή του φλοιώδους. Η οστεοπόρωση τύπου II, γνωστή και ως γεροντική οστεοπόρωση, εμφανίζεται και στα δύο φύλα. Χαρακτηρίζεται συνήθως από μειωμένο σχηματισμό οστού και επηρεάζει στον ίδιο βαθμό το σπογγώδες και το φλοιώδες οστό (Adler, 2014, Zhu et al., 2017).

Η τοπική μορφή οστεοπόρωσης αποτελεί μια ακόμα σημαντική μορφή της νόσου και οφείλεται στη μη μηχανική φόρτιση του σκελετού (Khajuria et al., 2014). Η χρόνια ακινησία, η ακινητοποίηση λόγω παράλυσης, η χρήση γύψου εξαιτίας κάποιου κατάγματος και η παρατεταμένη έλλειψη βαρύτητας κατά τη διάρκεια διαστημικών πτήσεων αποτελούν τις πιο συνήθεις αιτίες της τοπικής μορφής οστεοπόρωσης. Κατά την παρατεταμένη ακινητοποίηση, η έλλειψη μηχανικής φόρτισης στο οστό

προκαλεί οστική απορρόφηση και αναστέλλει τον οστικό σχηματισμό (Khajuria et al., 2014, Ji et al., 2015).

Στα παιδιά ηλικίας 8 έως 12 ετών μια σπάνια μορφή οστεοπόρωσης, γνωστή ως νεανική οστεοπόρωση, προκαλείται συνήθως από υπερασβεστιουρία και χαμηλή πρόσληψη ασβεστίου.

Η οστεοπόρωση στους άντρες είναι πιθανόν να σχετίζεται με τον υπογοναδισμό, τη χρήση κορτικοστεροειδών και την υπέρμετρη χρήση αλκοόλ. Στους άντρες, η απώλεια της οστικής μάζας αυξάνεται μετά την ηλικία των 70 ετών και συνήθως δεν εντοπίζεται και δεν χορηγείται κάποια θεραπεία (Kiebzak et al., 2002, Feldstein et al., 2005). Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε άντρες που διέμεναν σε κέντρο ευγηρίας και είχαν υποστεί κάταγμα ισχίου, το 60% αυτών είχε υπογοναδισμό (Abbasi et al., 1995). Στους ηλικιωμένους άντρες πιο συχνά παρατηρούνται κατάγματα στους σπονδύλους (Ebeling, 2008). Η ελάττωση της τεστοστερόνης έχει άμεση επίδραση στο φλοιώδες και το σπογγώδες οστό και μειώνει την οστική πυκνότητα σε ασθενείς με υπογοναδισμό (Behre et al., 1997). Η οστεοπόρωση συνήθως εντοπίζεται μετά το πρώτο κάταγμα ισχίου, το οποίο αποτελεί και παράγοντα κινδύνου για μελλοντικό κάταγμα (Kiebzak et al., 2002).

Το Εθνικό Ίδρυμα Οστεοπόρωσης (National Osteoporosis Foundation, NOF) έχει ορίσει κατευθυντήριες γραμμές για τον έλεγχο της οστεοπόρωσης. Η συστηματική εξέταση της οστικής πυκνότητας με DEXA (Dual Energy X-ray Absorptiometry) πρέπει να πραγματοποιείται σε γυναίκες άνω των 65 ετών και σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες μικρότερες των 65 ετών βάσει των παραγόντων κινδύνου. Συστηματική εξέταση της οστικής πυκνότητας με DEXA πρέπει να πραγματοποιείται και σε άντρες άνω των 70 ετών και σε άντρες μεταξύ 50 και 69 ετών βάσει των παραγόντων κινδύνου (U.S. Preventive Services Task Force).^[11]

Οι καθοριστικοί παράγοντες της ισχύος των οστών περιλαμβάνουν τη μάζα των οστών, την μικρο- και μακρο- αρχιτεκτονική δομή των οστών, και τις εγγενείς ιδιότητες όπως τα ανόργανα άλατα και το κολλαγόνο (Viguet - Carrin et al., 2006). Η BMD (bone mineral density) δίνει μια ποσοτική εκτίμηση της οστικής μάζας ανά μονάδα επιφάνειας και αποτελεί τη βασική μονάδα αξιολόγησης της οστεοπόρωσης και της σοβαρότητας της. Η BMD μετράτε σε g/cm^2 , τα οποία μετατρέπονται σε “T-scores” και “Z-scores” από το λογισμικό του μηχανήματος.

Καθώς η BMD αποτελεί το μέτρο της σοβαρότητας της οστεοπόρωσης, ο Π.Ο.Υ. (Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας) όρισε τη διαγνωστική κατάταξη της οστεοπόρωσης βάση του T-score, όπως αυτό μετράται από την εξέταση DEXA στη σπονδυλική στήλη, το ισχίο και το αντιβράχιο. Η ταξινόμηση περιλαμβάνει τρεις κατηγορίες, φυσιολογική (T-score -1 ή μεγαλύτερο), οστεοπενία (T-score μεταξύ -1 και -2.5), και οστεοπόρωση (T-score -2.5 ή μικρότερο) (WHO 1994, Kanis and Glüer, 2000). Το κριτήριο του T-score εφαρμόζεται σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και άντρες άνω των 50 ετών. Στους άντρες και στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες κάτω των 50 ετών για την ταξινόμηση της BMD

χρησιμοποιείται το φυλετικά διορθωμένο Z-score (Sözen et al., 2017). Στην κλινική πράξη, Z-score μικρότερο από -2 θεωρείται ως χαμηλή BMD, ενώ Z-score μεγαλύτερο από -2 αντιπροσωπεύει φυσιολογική BMD (Carey and Delaney, 2010).

Παρόλο που η DEXA αποτελεί το χρυσό κανόνα για τη διάγνωση της οστεοπόρωσης και την πρόβλεψη του κινδύνου καταγμάτων, δεν μπορεί να αποτυπώσει την τρισδιάστατη δομή του οστού και για το λόγο αυτό το T-scores που υπολογίζεται δεν ανταποκρίνεται στην πραγματική ογκομετρική BMD (Unnanuntana et al., 2010). Έχει αναπτυχθεί ένα εργαλείο αξιολόγησης του κινδύνου κατάγματος, το FRAX (Fracture Risk Assessment Tool, εργαλείο αξιολόγησης κινδύνων κατάγματος) το οποίο υπολογίζει τη δεκαετή πιθανότητα κατάγματος βασιζόμενο στους κλινικούς παράγοντες κινδύνου, με ή χωρίς την BMD (Tabatabaei-Malazy et al., 2017). Το εργαλείο FRAX που αναπτύχθηκε από τον ΠΟΥ χρησιμοποιείται για την εκτίμηση του κινδύνου κατάγματος στους ασθενείς (<https://www.shef.ac.uk/FRAX/tool>). Ο αλγόριθμος του FRAX εφαρμόζεται σε ασθενείς με χαμηλή οστική πυκνότητα στον αυχένα του μηριαίου, μεταξύ των ηλικιών 40 και 90. Ο FRAX μπορεί να υπολογιστεί είτε για τον αυχένα του μηριαίου ή για το ισχίο, όμως ο αυχένας του μηριαίου προτιμάται (N.O.F.a.I.S.f.C, 2016). Οι κλινικοί παράγοντες κινδύνου που χρησιμοποιούνται στον αλγόριθμο του FRAX είναι η ηλικία, το φύλο, η φυλή, το ύψος, η μάζα σώματος, το ιστορικό καταγμάτων, το ιστορικό καταγμάτων του ισχίου των γονέων, η χρήση γλυκοκορτικοειδών, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και άλλες δευτερογενής αιτίες της οστεοπόρωσης όπως το κάπνισμα και η κατανάλωση αλκοόλ (Hillier et al., 2011). Ο FRAX πρέπει να συνεκτιμάται με τους κλινικούς παράγοντες κινδύνου και μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τα δυο φύλα (Πίνακας 1).

Κλινικοί παράγοντες κινδύνου για κατάγματα

Κάπνισμα

Κατάχρηση αλκοόλ

Ιστορικό ρευματοειδούς αρθρίτιδας

Δευτερογενής οστεοπόρωση (φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου, πρόωρη εμμηνόπαυση, υπογοναδισμός, χρόνια ηπατική νόσος, σύνδρομο δυσαπορρόφησης)

Προχωρημένη ηλικία

Ιστορικό καταγμάτων

Ιστορικό χρήσης γλυκοκορτικοειδών

Ιστορικό καταγμάτων ισχίου των γονέων

Χαμηλή μάζα σώματος

Δεδομένα από Kanis et al, 2005.

Πίνακας 1. Κλινικοί παράγοντες κινδύνου για κατάγματα που περιλαμβάνονται στο εργαλείο FRAX αξιολόγησης κινδύνων κατάγματος

Επιπροσθέτως, για τη διάγνωση και την παρακολούθηση της θεραπείας της οστεοπόρωσης χρησιμοποιούνται οι βιοχημικοί δείκτες του ρυθμού του οστικού μεταβολισμού. Οι βιοχημικοί δείκτες συμβάλλουν στην αποσαφήνιση των κυτταρικών μηχανισμών ανακατασκευής του οστού που πραγματοποιείται από τους οστεοβλάστες και τους οστεοκλάστες.

Φυσιολογία

Η συντονισμένη δράση οστεοβλαστών και οστεοκλαστών στην επιφάνεια των οστών αποτελεί τη βάση ενός υγιούς οστού στον ενήλικα πληθυσμό (Allen et al., 2010). Ένας ώριμος σκελετός θα υποστεί πλήρη ανακατασκευή μέσα σε χρονικό διάστημα δέκα ετών. Τα παλαιά οστά θα αντικατασταθούν με νέα ώστε να διατηρηθεί η αντοχή του οστού καθ' όλη τη διάρκεια ζωής ενός ενήλικου ανθρώπου (Gupta et al., 2016). Κατά τη διάρκεια της ανακατασκευής, οι οστεοβλάστες και οι οστεοκλάστες είναι στενά συζευγμένοι, όταν ο ένας μειώνεται ή αυξάνεται τότε ο άλλος ακολουθεί. Οι RANK/RANKL/OPG συμμετέχουν στην κυτταρική ρύθμιση της οστικής ανακατασκευής (Kearns et al., 2008). Ο RANKL είναι μια τύπου II διαμεμβρανική πρωτεΐνη που εκφράζεται στους οστεοβλάστες, τα ενεργοποιημένα T κύτταρα και τα στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών (Choi et al., 2016). Ο RANKL δεσμεύεται στον υποδοχέα του, RANK, στους προ-οστεοκλάστες και ενεργοποιεί τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών οδηγώντας σε οστεοκλαστογένεση και επακόλουθη οστική επαναρρόφηση (Boyce et al., 2003). Όπως ο RANKL, έτσι και ο M-CSF εκφράζεται στην επιφάνεια των οστεοβλαστών και παίζει σημαντικό ρόλο στην έκφραση των γονιδίων τα οποία προάγουν τη σειρά των οστεοκλαστών όπως η ανθεκτική σε τρυγικό οξύ όξινη φωσφατάση (tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP), ο υποδοχέας καλσιτονίνης καθεψίνης K (CATK) και η β3-ιντεγκρίνη (Boyle et al., 2003). Κατά την ενεργοποίηση, ο RANK προσλαμβάνει τους παράγοντες που σχετίζονται με τον υποδοχέα TNF (TNF receptor- associated factors, TRAFs), που συνδέονται με διαφορετικές κινάσες και μεσολαβεί στην καθοδική σηματοδότηση (Park et al., 2017). Μεταξύ αυτών των κινάσων είναι η κινάση Src, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο καθώς η έκφρασή της οδηγεί στη σύνδεση των οστεοκλαστών στην οστική επιφάνεια μέσω της $\alpha_v\beta_3$ ιντεγκρίνης (Salam et al., 2014). Αυτοί οι επιστρατευόμενοι οστεοκλάστες εκκρίνουν πρωτόνια για να κάνουν το περιβάλλον όξινο. Αυτό το μικροπεριβάλλον διαλύει τα άλατα του οστού, κυρίως τον υδροξυαπατίτη (HA), και διευκολύνει την απελευθέρωση του κολλαγονολυτικού ενζύμου CATK για να αυξήσει την πρωτεολυτική αποδόμηση του κολλαγόνου τύπου I στα οστά (Salam et al., 2014). Η παραγωγή της OPG από τα κύτταρα των οστεοβλαστών αντισταθμίζει την ωρίμανση των οστεοκλαστών και τη δραστηριότητα τους, δρώντας σαν υποδοχέας του RANKL (Boyce et al., 2003). Έτσι, η σχετική συγκέντρωση των OPG και RANKL στο οστό καθορίζει την αντοχή και τη μάζα του.

Η ολοκλήρωση της οστικής απορρόφησης ακολουθεί την έναρξη του σχηματισμού οστού με την στρατολόγηση των προ-οστεοβλαστικών κυττάρων. Οι παράγοντες ανάπτυξης όπως ο μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας-β (TGF-β), οι αυξητικοί παράγοντες IGF-1 και IGF-2, οι οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες-2 (BMP-2), ο αυξητικός παράγοντας προερχόμενος από αιμοπετάλια (PDGF) ή ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της απορρόφησης οστού από τη μήτρα των οστών, οι οποίοι εκκινούν και διαδίδουν τη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων σε οστεοβλάστες (Clarke, 2008). Ειδικότερα, οι TGF-β και IGFs έχουν σημαντικό ρόλο στην έναρξη του σχηματισμού οστού. Ενώ ο TGF-β είναι γνωστό ότι διεγείρει τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών και προάγει το σχηματισμό του οστού αναστέλλοντας τη δραστηριότητα των οστεοκλαστικών κυττάρων (Langdahl et al., 2003). Οι IGFs δρουν ως αυτοκρινείς ενισχυτές της λειτουργίας των οστεοβλαστών (Wang et al., 2013).

Ο PDGF παίζει επίσης έναν κεντρικό ρόλο στο σχηματισμό οστού με κινητοποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων, σταθεροποίηση των νεοεμφανιζόμενων αγγείων και διαμόρφωση των κυτταρικών συστατικών της διαφοροποίησης των οστεοβλαστών (Caplan and Correa, 2011).

Η αύξηση της δράσης των οστεοκλαστών και η μείωση της δράσης των οστεοβλαστών μειώνουν την οστική μήτρα και την ασβεστοποίηση των οστών, δημιουργώντας οστεοπόρωση. Η καθαρή οστική μάζα, όπως έχει καλά διερευνηθεί, διατηρείται όσο υπάρχει συζευγμένη ή ισορροπημένη δράση μεταξύ οστεοβλαστών και οστεοκλαστών, παρόλα αυτά οι αριβείς μηχανισμοί που συμμετέχουν στα συζευγμένα σήματα που συνδέουν την οστική απορρόφηση και την οστική αναδόμηση δεν είναι πλήρως γνωστά. Ειιάζεται πως η απελευθέρωση αυξητικών παραγόντων, καθώς και οι παράγοντες που εκκρίνονται από τους οστεοκλάστες όπως και εκείνοι που δεσμεύονται στις μεμβράνες είναι μεταξύ των κύριων συντελεστών της διαδικασίας της σύζευξης.

Θεραπεία

Η θεραπεία για την οστεοπόρωση πρέπει να ξεκινά στους ασθενείς που έχουν υποστεί κάταγμα στο ισχίο ή σε κάποιο σπόνδυλο (ασυμπτωματικό ή κλινικό), στους ασθενείς που έχουν T score μικρότερο ή ίσο με -2,5 στον αυχένα του μηριαίου, το ισχίο ή την οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης όταν μετράται με DEXA, σε γυναίκες που βρίσκονται στην εμμηνόπαυση και σε άντρες άνω των 50 ετών με χαμηλή οστική πυκνότητα στο μηριαίο οστό το ισχίο ή την οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης όταν μετράται με DEXA (T score μεταξύ -1,0 και -2,5, οστεοπενία) και σε ασθενείς που έχουν πιθανότητα >3% να υποστούν κάταγμα στο ισχίο ή >20% να υποστούν οστεοπορωτικό κάταγμα (κλινικό κάταγμα της σπονδυλικής στήλης, του αντιβραχίου, του ισχίου ή του ώμου) βάση του FRAX (Cosman et al., 2014, Watts et al., 2012).

Το NOF συστήνει πως η θεραπεία της οστεοπόρωσης θα πρέπει να ξεκινά με μη φαρμακευτικές προσεγγίσεις. Τα βάρη και οι ασκήσεις αντίστασης μπορούν να αυξήσουν τη μυϊκή μάζα και παροδικά την οστική πυκνότητα (BMD) (Hinton et al., 2015). Το τσίτσι και η γιόγκα βελτιώνουν την ισορροπία και αυξάνουν τον μυϊκό τόνο, τα οποία σε δεύτερο χρόνο μειώνουν τον κίνδυνο πτώσης στα ηλικιωμένα άτομα. Επιπλέον, συνιστάται η διακοπή του καπνίσματος, το οποίο είναι άμεσα συνδεδεμένο με την μείωση της BMD, και η διακοπή της κατανάλωσης αλκοόλ (Black and Rosen, 2016). Η αποτελεσματικότητα της θεραπείας με ασβέστιο και βιταμίνη D παραμένει ένα αμφιλεγόμενο θέμα. Τα συμπληρώματα βιταμίνης D δεν έχουν αποδειχθεί πως μειώνουν τον κίνδυνο κατάγματος ή αυξάνουν την BMD (Ebeling et al., 2001). Η μετά-ανάλυση των δεδομένων από αρκετές έρευνες έδειξε πως το ασβέστιο και τα συμπληρώματα βιταμίνης D δεν είναι αποτελεσματικά στην πρόληψη των καταγμάτων του ισχίου όταν χορηγούνται ξεχωριστά. Όταν δίνονται σε συνδυασμό, το ασβέστιο και τα συμπληρώματα βιταμίνης D έχουν συσχετιστεί με απόλυτη μείωση του κινδύνου κατά 0,5% σε διάστημα 3 ετών. Για ασθενείς άνω των 70 ετών, η απόλυτη μείωση του κινδύνου ήταν 0,9% (Murad et al., 2012). Στην έρευνα “Πρωτοβουλία για την Υγεία της Γυναίκας”, στις γυναίκες που λάμβαναν ασβέστιο και συμπληρώματα βιταμίνης D παρατηρήθηκε αύξηση της BMD και μείωση των καταγμάτων ισχίου κατά 12% σε σύγκριση με τις γυναίκες που λάμβαναν placebo (εικονικό φάρμακο). Δεν παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στα κλινικά κατάγματα σπονδύλων, στα κατάγματα στο αντιβράχιο και τον καρπό, και στα ολικά κατάγματα, αλλά υπήρχε 17% μεγαλύτερος κίνδυνος εμφάνισης πέτρας στα νεφρά σε σύγκριση με τη χρήση placebo. Η μέση πρόσληψη ασβεστίου ήταν περίπου 1150 mg ανά ημέρα (Jackson et al., 2006).

Πειραματικές μελέτες

Πειραματικά Πρότυπα

Πολλά θεραπευτικά σχήματα για τη θεραπεία της οστεοπόρωσης που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη έχουν αρχικά μελετηθεί σε ζωικά πρότυπα (Jee and Yao, 2001, Turner, 2001). Τα ζωικά πρότυπα προσφέρουν ομοιογένεια και δίνουν τη δυνατότητα για ειτεταμένες δοκιμές. Επιπλέον, θα πρέπει να πληρούν κάποιες βασικές προϋποθέσεις όπως να αναπαράγουν με αξιοπιστία τη νόσο, να είναι ευκολά διαθέσιμα και το κόστος απόκτησης και συντήρησης να μην είναι απαγορευτικό.

Ηθικό πλαίσιο

Το Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο και Συμβούλιο ψήφισε την 22α Σεπτεμβρίου 2010 τις οδηγίες περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς.

Η οδηγία που ψηφίστηκε θεσπίζει μέτρα για την προστασία των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς.

Για το σκοπό αυτό, θέσπισε κανόνες σχετικά

1. με την αντικατάσταση και μείωση της χρήσης ζώων σε διαδικασίες και τη βελτίωση της εκτροφής, παροχής στέγης, φροντίδας και χρήσης ζώων σε διαδικασίες.
2. την καταγωγή, εκτροφή, σήμανση των ζώων, την παροχή φροντίδας και στέγης και τη θανάτωσή τους.
3. τη λειτουργία εκτροφένων, προμηθευτών και χρηστών.
4. την αξιολόγηση και αδειοδότηση έργων που περιλαμβάνουν τη χρήση ζώων σε διαδικασίες.

Η εξάλειψη του πόνου, της ταλαιπωρίας, της αγωνίας ή της μόνιμης βλάβης με την αποτελεσματική χρήση αναισθητικών, αναλγητικών ή άλλων μεθόδων δεν συνεπάγεται την εξαίρεση της χρήσης ζώου σε διαδικασίες από το πεδίο εφαρμογής της παρούσας οδηγίας.

Για τους σκοπούς της οδηγίας της 22α Σεπτεμβρίου 2010 ισχύουν κάποιοι ορισμοί.

Ως "διαδικασία" θεωρείται κάθε χρήση ζώου, επιθετική ή μη, για πειραματικούς ή άλλους επιστημονικούς σκοπούς, με γνωστά ή άγνωστα αποτελέσματα, ή εκπαιδευτικούς σκοπούς, που ενδέχεται να προκαλέσουν στο ζώο πόνο, ταλαιπωρία, αγωνία ή μόνιμη βλάβη ίση ή μεγαλύτερη από εκείνη που προκαλεί η εισαγωγή βελόνας σύμφωνα με την ορθή κτηνιατρική πρακτική. Επίσης, περιλαμβάνει κάθε δράση με σκοπό η πιθανότητα να οδηγήσει στη γέννηση ή επώαση ζώου ή στη δημιουργία και διατήρηση νέας γενετικά τροποποιημένης κατηγορίας ζώων υπό αυτές τις προϋποθέσεις, αλλά εξαιρείται η θανάτωση των ζώων αποκλειστικά για τη χρήση των οργάνων ή των ιστών τους.

Ως "έργο" θεωρείται ένα πρόγραμμα εργασίας που έχει καθορισμένο επιστημονικό σκοπό και περιλαμβάνει μια ή περισσότερες διαδικασίες και οι "εγκαταστάσεις" είναι κάθε εγκατάσταση, κτίριο, κτιριακό συγκρότημα ή άλλο οίκημα, που μπορεί να περιλαμβάνει χώρο που δεν είναι απόλυτα περιφραγμένος ή στεγασμένος καθώς και κινητές εσωτερικές εγκαταστάσεις,

Όσον αφορά τον αριθμό και τη χρήση των ζώων πρέπει να ισχύει ο κανόνας των τριών R.

Τα κράτη μέλη διασφαλίζουν ότι, όποτε είναι δυνατόν, χρησιμοποιείται αντί της διαδικασίας άλλη επιστημονικά ικανοποιητική μέθοδος ή στρατηγική δοκιμή χωρίς να περιλαμβάνει τη χρήση ζώου

(αρχή της Αντικατάστασης- Replacement).

Τα κράτη μέλη διασφαλίζουν ότι ο αριθμός των ζώων που χρησιμοποιούνται σε έργα μειώνεται στον ελάχιστο δυνατό, χωρίς να διακυβεύονται οι σκοποί του έργου (αρχή της Μείωσης-Reduction).

Τα κράτη μέλη διασφαλίζουν τη βελτίωση της εκτροφής, παροχής στέγης και φροντίδας των ζώων, καθώς και των μεθόδων που χρησιμοποιούνται σε διαδικασίες, εξαλείφοντας ή μειώνοντας στο ελάχιστο κάθε πιθανό πόνο, ταλαιπωρία, αγωνία ή μόνιμη βλάβη των ζώων (αρχή της Εκλέπτυνσης-Refinement).

Όσον αφορά τις μεθόδους θανάτωσης τα κράτη μέλη εξασφαλίζουν ότι τα ζώα θανατώνονται με τον ελάχιστο πόνο, ταλαιπωρία ή αγωνία και η θανάτωση πραγματοποιείται στην εγκατάσταση εκτροφεία, προμηθευτή ή χρήστη από αρμόδιο πρόσωπο.

Όσον αφορά την αναισθητοποίηση, τα κράτη μέλη διασφαλίζουν ότι, εκτός εάν κρίνεται ακατάλληλη, οι διαδικασίες διεξάγονται υπό γενική ή με τοπική αναισθησία και ότι χρησιμοποιούνται αναλγητικά φάρμακα ή άλλη κατάλληλη μέθοδος για να διασφαλίζεται ότι προκαλείται ο ελάχιστος δυνατός αναπόφευκτος πόνος, ταλαιπωρία ή αγωνία.

Κριτήρια καταλληλότητας των πειραματιών προτύπων

Όσον αφορά την πειραματική μελέτη της οστεοπόρωσης, για τη σωστή επιλογή του ζωικού είδους θα πρέπει να είναι γνωστές κάποιες συγκεκριμένες παράμετροι της φυσιολογίας των ζώων, όπως το ορμονικό προφίλ του οιστρικού κύκλου. Επίσης, θα πρέπει να είναι γνωστά η ηλικία στην οποία κάθε ζωικό είδος αποκτά την κορυφαία οστική πυκνότητα και εάν η απώλεια της οστικής μάζας εξαρτάται από την ηλικία και τα επίπεδα των οιστρογόνων. Σημαντικό είναι, επίσης, εάν στο ζωικό είδος εμφανίζονται αυθόρμητα ή χαμηλής έντασης κατάγματα και το πως επηρεάζονται τα ζώα από την ωοθηκεκτομή.

| Ζωικό Πρότυπο | Προτεινόμενο | Προτεινόμενο υπό συνθήκες |
|----------------------------------|---------------------|----------------------------------|
| Εγκατάσταση κορυφαίας πυκνότητας | Μυς, επίμυς | |
| Γενετικές συνθήκες | Μυς | |
| Μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση | Επίμυς | Πρωτεύοντα |
| Επούλωση καταγμάτων | Σκύλος, επίμυς | |
| Ανενεργησία | Σκύλος, επίμυς | Μυς |
| Κορτικοστεροειδή | | Μυς |
| Κατάχρηση Αλκοόλ | Επίμυς | |
| Γεροντική οστεοπόρωση | Μυς | Επίμυς, πρωτεύοντα |

Πίνακας 2. Αλγόριθμος των προτεινόμενων και υπό συνθήκες προτεινόμενων ζωικών προτύπων στην έρευνα της οστεοπόρωσης.

Τα περισσότερα ζωικά πρότυπα παρουσιάζουν ένα βασικό μειονέκτημα όσον αφορά τη μελέτη της οστεοπόρωσης, δεν εμφανίζουν αυθόρμητα ή χαμηλής έντασης κατάγματα. Για το λόγο αυτό, είναι ορθότερο να αναφέρονται ως ζωικά πρότυπα αναπαραγωγής οστεοπενίας και όχι οστεοπόρωσης.

Η καταλληλότητα του ζωικού είδους εξαρτάται τόσο από το πρωτόκολλο πρόληψης της οστεοπόρωσης, όσο και από τα ζωοτεχνικά χαρακτηριστικά κάθε είδους (Turner et al., 2001).

Επίμυες- Πειραματικό πρότυπο οστεοπόρωσης

Οι επίμυες ως πειραματικό πρότυπο για τη μελέτη της οστεοπόρωσης

Ο επίμυς αποτελεί το δημοφιλέστερο πρότυπο για την μελέτη τη οστεοπόρωσης (Turner et al., 2001). Στο σκελετό του ενήλικου ανθρώπου παρουσιάζεται σύζευξη, τόσο χρονική όσο και τοπική, στο σχηματισμό νέου οστού. Το παλαιό οστό απορροφάται και κατόπιν ακολουθεί η αλληλουχία οστική ενεργοποίηση, απορρόφηση, αναστροφή και σχηματισμός (Lelovas et al., 2008). Η αλληλουχία αυτή καλείται οστική ανακατασκευή.

Η οστική κατασκευή, σε αντίθεση με την οστική ανακατασκευή, είναι ο σχηματισμός και η απορρόφηση του οστού σε διαφορετικά σημεία του σκελετού, οι διαδικασίες αυτές είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους. Οι δυο διαφορετικοί μηχανισμοί μπορούν να διακριθούν ιστολογικά (Lelovas et al., 2008).

Στο παρελθόν πολλοί ερευνητές υποστήριζαν πως στο σκελετό των επιμύων ο βασικός μηχανισμός είναι η οστική κατασκευή και συνεπώς δεν αποτελεί κατάλληλο πρότυπο για τη μελέτη της οστεοπόρωσης. Μετά από έρευνες αποδείχθηκε ότι στο σκελετό του επίμυος γίνεται σταδιακή μετάβαση από την οστική κατασκευή στην οστική ανακατασκευή (Πίνακας 3). Η μεταβολή αυτή παρατηρείται τόσο στο σπογγώδες όσο και στο φλοιώδες οστό με το πέρασμα της ηλικίας. Για την εγγύς μετάφυση της κνήμης η μετάβαση αυτή πραγματοποιείται μεταξύ 6 και 9 μηνών. Μετά την ηλικία των 12 μηνών, ο βασικός μηχανισμός στο σκελετό του επίμυος τόσο στο σπογγώδες όσο και στο φλοιώδες οστό στους οσφυϊκούς σπονδύλους και στην εγγύς μετάφυση της κνήμης είναι η οστική ανακατασκευή. Η μετάβαση αυτή σχετίζεται με την ελάττωση της αύξησης των μακρών οστών με πολύ αργούς ρυθμούς (Erben, 1996).

| | Σπογγώδες | Ενδοφλοιώδες |
|---------------------------|--------------|---------------|
| Εγγύς μετάφυση της κνήμης | 6 με 9 μήνες | 9 με 12 μήνες |
| Οσφυϊκοί σπόνδυλοι | 3 μήνες | 3 με 6 μήνες |

Πίνακας 3. Χρόνοι μεταβολής από την κατασκευή στην ανακατασκευή στον σκελετό των επιμύων (Jee and Yao, 2001, Erben, 1996)

Έχει βρεθεί, επίσης, πως η ωοθηκιοτομή στον σκελετικά ώριμο επίμυ έχει παρόμοιες συνέπειες με αυτές της εμμηνόπαυσης. Μετά τη χειρουργική αφαίρεση των ωοθηκών παρατηρείται απώλεια στο σπογγώδες και στο ενδοφλοιώδες οστό, η οποία προκαλείται από την αύξηση της οστικής ανακατασκευής και την αύξηση της οστικής απορρόφησης σε σχέση με την οστική κατασκευή.

Στους επίμυος η οστεοπενία που προκαλείται λόγω της ηλικίας, της έλλειψης οιστρογόνων και της ανενεργησίας εμφανίζει στενή ομοιότητα με την ανθρώπινη οστεοπόρωση, τόσο στα ανατομικά χαρακτηριστικά όσο και στις μεταβατικές και σταθερές περιόδους της δυναμικής των οστών. Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά της οστεοπόρωσης στον άνθρωπο είναι τα αυθόρμητα και χαμηλής έντασης κατάγματα, κατάγματα τα οποία δεν εμφανίζονται στους επίμυος (Frost and Jee, 1992). Λαμβάνοντας υπόψιν τον ορισμό του Π.Ο.Υ. για την οστεοπόρωση, σύμφωνα με τον οποίο η οστεοπόρωση είναι παρούσα σε άτομα τα οποία έχουν οστική πυκνότητα χαμηλότερη των 2,5 μονάδων σταθερής απόκλισης από το μέσο όρο νεαρών ενήλικων γυναικών, με ή χωρίς την παρουσία κατάγματος (Kanis, 1994), ο μη καταγματικός, ωοθηκιοτομημένος, οστεοπενικός επίμυος μπορεί να αποτελέσει ένα κατάλληλο ζωικό πρότυπο για την έρευνα της οστεοπόρωσης (Lelovas et al., 2008).

Πρότυπα επιμύων για τη μελέτη της οστεοπόρωσης

Πολλά πειραματικά πρότυπα έχουν χρησιμοποιηθεί για την πρόκληση οστεοπενίας και οστεοπόρωσης στους επίμυς. Ο ρυθμός απώλειας της οστικής μάζας στους αρσενικούς και θηλυκούς επίμυς εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε για την πρόκληση οστεοπόρωσης, από το ανατομικό σημείο που εκτιμάται και από το εάν η απώλεια αφορά στο σπογγώδες ή στο φλοιώδες οστό (Mann et al., 1990).

Όλα τα πειραματικά πρωτόκολλα οστεοπόρωσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ώριμους ή μη επίμυς (Shen et al., 1992). Παρόλο που οι επίμυες φτάνουν σε αναπαραγωγική ωριμότητα σε ηλικία 2.5 μηνών, ο σκελετός τους θεωρείται ώριμος μετά την ηλικία των 10 μηνών (Mann et al., 1990). Εάν χρησιμοποιηθούν σκελετικά ανώριμοι επίμυες, τότε επιτυγχάνεται χαμηλή οστική μάζα, γεγονός που θεωρείται παράγοντας υψηλού κινδύνου για ανθρώπινα οστεοπορωτικά κατάγματα. Για το λόγο αυτό, οι ανώριμοι επίμυες είναι το κατάλληλο μοντέλο για τη μελέτη ενδοκρινικών, διατροφικών και περιβαλλοντικών παραγόντων, οι οποίοι επηρεάζουν την απόκτηση κορυφαίας οστικής μάζας. Ο σκελετικά ώριμος επίμυς αποτελεί το κατάλληλο πρότυπο για την έρευνα της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης και της οστεοπόρωσης που οφείλεται σε ακινητοποίηση (Li et al., 1992).

Το πρότυπο που χρησιμοποιείται πιο συχνά στην έρευνα της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης είναι το μοντέλο του ωθηκεκτομημένου επίμυος. Μετά την ωθηκεκτομή, η οστική απορρόφηση υπερέρχει της οστικής κατασκευής με αποτέλεσμα να υπάρχει απώλεια οστικής μάζας. Λίγο αργότερα, η οστική ανακατασκευή αποκτά ένα σταθερό ρυθμό, όπου η απορρόφηση και η κατασκευή εξισορροπούνται. Στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρείται στην εγγύς μετάφυση της κνήμης μετά από 14 μέρες (Wronski et al., 1988, Wronski et al., 1989), στο σώμα των οσφυϊκών σπονδύλων μετά από 60 μέρες (Wronski et al., 1990) και στον αυχένα του μηριαίου μετά από 30 μέρες (Li et al., 1997). Επιπλέον, ο χρόνος που απαιτείται για την εγγύς μετάφυση της κνήμης να αποκτήσει σταθερό ρυθμό ανακατασκευής είναι 90 μέρες (Wronski et al., 1988, Wronski et al., 1989), σε σύγκριση με το σώμα των οσφυϊκών σπονδύλων και τον αυχένα του μηριαίου που χρειάζονται 270 μέρες (Wronski et al., 1989, Li et al., 1997). Εν αντιθέσει, η ωθηκεκτομή δεν προκαλεί απώλεια οστικής μάζας στις επιφύσεις των μακρών οστών, στην άπω μετάφυση της κνήμης και στους κοκκυγικούς σπονδύλους (Li and Jee, 1991, Li et al., 1996, Ma et al., 1994, Miyakoshi et al., 1999)

Στο φλοιώδες οστό, η μεγέθυνση της κοιλότητας του μυελού αποτελεί έμμεση μέτρηση της οστικής απώλειας. Η μεγέθυνση που παρατηρείται στη διάφυση των μακρών οστών οφείλεται στην αύξηση της ενδοοστικής αναρρόφησης (Turner et al., 1987) και στην περιοριστική οστική εναπόθεση (Miller et al., 1991). Η ενδοοστική απορρόφηση και η ταυτόχρονη περιοριστική οστική εναπόθεση οδηγούν σε έναν αργό ρυθμό απώλειας του φλοιώδους οστού (Kimmel and Wronski, 1990).

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της οστικής μάζας, της αρχιτεκτονικής και του μεταβολισμού στον σκελετό των επιμών είναι, γενικά, οι ίδιες με αυτές που χρησιμοποιούνται για τον άνθρωπο. Η ανάγκη για περαιτέρω έρευνα σε αυτόν τον τομέα έχει οδηγήσει στην χρήση νέων μεθόδων για επίμυς που μπορεί να είναι πιο επεμβατικές και πιο εξειδικευμένες από εκείνες που χρησιμοποιούνται στον άνθρωπο.

Μη επεμβατικές μέθοδοι

Βιοχημικοί δείκτες

Οι μετρήσεις ασβεστίου, φωσφόρου και μαγνησίου στο αίμα και στα ούρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στα ζώα εργαστηρίου. Οι βιοχημικοί δείκτες της οστικής μεταβολής περιλαμβάνουν πεπτίδια που προέρχονται από οστεοβλάστες ή οστεοκλάστες και οργανικές ενώσεις που απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της σύνθεσης και απορρόφησης της οστικής μήτρας (Loeb, 1999). Οι δείκτες μπορούν να μετρηθούν χρησιμοποιώντας μια ποικιλία μεθόδων, όπως υγρή χρωματογραφία, ραδιοανοσοπροσδιορισμό, ανοσοραδιομετρική ανάλυση και ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (Loeb, 1999, Seibel, 2000).

Οστική Πυκνομετρία

Η οστική πυκνομετρία συχνά χρησιμοποιείται σε ζώα εργαστηρίου για τον υπολογισμό της BMD και των αλάτων των οστών. Η DEXA χρησιμοποιείται συχνά στα πρωτοκόλλα οστεοπόρωσης στα ζώα εργαστηρίου, για την εκτίμηση της BMD και της οστικής μάζας (Bone Mineral Content / BMC) (Cavolina et al., 1997, Li et al., 1990). Χάρη στην εξέλιξη των μηχανήματων DEXA τα τελευταία χρόνια είναι πλέον δυνατή η εκτίμηση συγκεκριμένων σημείων των οστών ακόμα και σε πρωτοκόλλα οστεοπόρωσης σε μικρόσωμα ζώα. Ωστόσο, η BMD δεν αποτελεί το μοναδικό μέτρο της ισχύς των οστών. Η μέτρηση της BMD εκτιμάται πως αντιστοιχεί στο 60 με 70% της διακύμανσης της οστικής δύναμης (Ammann and Rizzoli, 2003).

Η DEXA χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της BMD σε ένα καθορισμένο σημείο του σκελετού χρησιμοποιώντας ROI (περιοχές ενδιαφέροντος, regions of interest), ενώ οι μαλακοί ιστοί αποκλείονται από τα αποτελέσματα (Rosen et al., 1995, Breen et al., 1998).

Η οστική αντοχή εξαρτάται σε μεγάλο ποσοστό από την οστική πυκνότητα, περίπου 60-70%. Άλλοι παράγοντες που συνεισφέρουν στην μηχανική αντοχή είναι οι διαστάσεις, η αρχιτεκτονική και η ποιότητα του οστού (Lelovas et al., 2008).

Οι μετρήσεις οστικής πυκνότητας με τη μέθοδο DEXA απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή στην τοποθέτηση του εξεταζόμενου καθώς και στην ανάλυση της εικόνας ώστε να αποτελέσματα να είναι σωστά (Watts, 2004). Στα μικρότερα ζώα, όπως οι επίμυες, το σφάλμα τοποθέτησης επηρεάζει το τελικό αποτέλεσμα σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι θα επηρέαζε ανθρώπους (Katikaneni et al., 2009). Ως εκ τούτου είναι ιδιαίτερα σημαντικό στις μελέτες μικρών ζώων να λαμβάνονται εικόνες υψηλής ποιότητας με σωστή τοποθέτηση.

Όπως αναφέρθηκε, η αντοχή των οστών εξαρτάται από περισσότερες παράμετρος. Το γεγονός αυτό έχει οδηγήσει στην εισαγωγή νέων διαγνωστικών μεθόδων, οι οποίες προσφέρουν πρόσθετες πληροφορίες σχετικές με τους παράγοντες που καθορίζουν την ισχύ των οστών (Ammann and Rizzoli, 2003).

Η περιφερική ποσοτική ηλεκτρονική τομογραφία (Peripheral quantitative computed tomography, pQCT) αποτελεί μια ισχυρή απεικονιστική τεχνική η οποία αποτυπώνει μια τρισδιάστατη εικόνα του πάχους του οστού (Genant and Jiang, 2006).

Η μικρο-υπολογιστική τομογραφία (microcomputerized tomography, μ CT) παρέχει εικόνες υψηλής ανάλυσης. Με την μ CT μπορούν να ληφθούν δεδομένα από μικρές περιοχές του οστού, ακόμα και από μια μεμονωμένη δοκίδα.

Η μικροσκοπία μαγνητικού συντονισμού (magnetic resonance microscopy) είναι μια μη επεμβατική τεχνική που δεν χρησιμοποιεί ιοντίζουσα ακτινοβολία. Η τεχνική αυτή μπορεί να αξιολογήσει το λίπος και το νερό στον μυελό των οστών, ως εκ τούτου παρουσιάζει το σπογγώδες οστό ως αρνητική εικόνα. Η μικροσκοπία μαγνητικού συντονισμού μπορεί να εφαρμοστεί τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* και είναι πολύ υποσχόμενη για την αξιολόγηση της δομής του σπογγώδους οστού (Genant and Jiang, 2006).

Επεμβατικές μέθοδοι

Ιστομορφομετρία

Η ιστομορφομετρία παρέχει δισδιάστατη μελέτη της μάζας και της αρχιτεκτονικής των οστών με

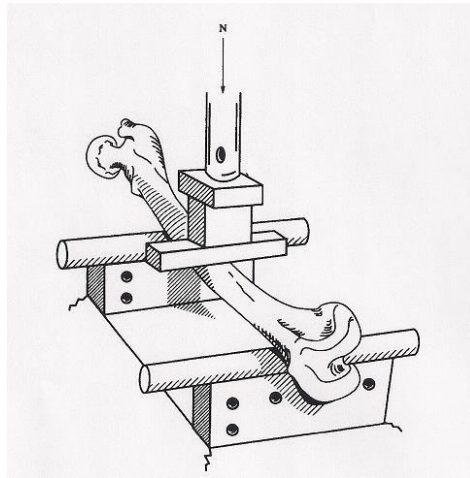
πολύ μεγαλύτερη ακρίβεια συγκριτικά με τις απεικονιστικές μεθόδους. Η ιστομορφομετρία αξιολογεί με ακρίβεια την αρχιτεκτονική των οστών και τους δείκτες ευθραυστότητας των οστών ανεξάρτητα από τη μάζα των οστών (Dalle Carbonare et al., 2005). Οι παράμετροι που μετρούνται με την ιστομορφομετρία περιλαμβάνουν τον αριθμό των οστεοβλαστών, των οστεοκλαστών, των οστεοκυττάρων, των ενεργών οστεοβλαστών σε σχέση με την περίμετρο των οστών και αρκετές άλλες παραμέτρους (Meunier, 1988). Η χρήση φθορίζουσας σήμανσης είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την εκτίμηση των οστικών αλλαγών. Ωστόσο, η ιστομορφομετρία δεν είναι απαλλαγμένη από περιορισμούς. Η ιστολογική αξιολόγηση ενός σημείου δεν αντιπροσωπεύει αλλαγές σε ολόκληρο τον σκελετό. Επιπλέον, εξ ορισμού, μπορεί να εκτιμηθεί μόνο μια πολύ μικρή περιοχή δειγματοληψίας και κατόπιν να αναχθεί για όλη την περιοχή της δειγματοληψίας. Η μέθοδος παρέχει αξιοπιστία όταν η περιοχή δειγματοληψίας είναι συγκρίσιμη σε όλες τις ομάδες (Cavolina et al., 1997, Rosen et al., 1995). Αν και πολλές ιστομορφομετρικές παράμετροι εκφράζονται σε όγκο, τα δεδομένα έχουν αξιολογηθεί σε δισδιάστατα τμήματα. Παρ' όλα αυτά, τα ιστομορφομετρικά δεδομένα παρέχουν μια τεκμηριωμένη αξιολόγηση της στερεολογικής οργάνωσης ενός οστού (Dalle Carbonare et al., 2005). Ο συνδυασμός της BMD και των ιστομορφομετρικών μετρήσεων μπορεί να εξηγήσει το 90% της μεταβλητότητας της οστικής δύναμης (Dempster, 2003).

Αξιολόγηση μηχανικής αντοχής

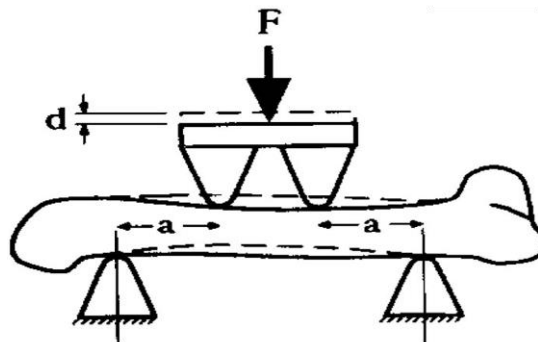
Η αύξηση της οστικής μάζας δεν αντιστοιχεί πάντα σε μείωση των καταγμάτων. Στα ζωικά πρότυπα δεν είναι εφικτή η παρατήρηση καταγμάτων χαμηλής έντασης και για το λόγο αυτό η *ex vivo* μηχανική δοκιμή είναι επιτακτική (Jee and Yao, 2001). Οι δοκιμές κάμψης τριών και τεσσάρων σημείων καθώς και η δοκιμή στρέψης χρησιμοποιούνται συχνά για την εκτίμηση της μηχανικής αντοχής του οστού (Turner et al., 1987). Ωστόσο, οι δοκιμασίες αυτές πραγματοποιούνται μόνο στις διαφύσεις των μακρών οστών, σημεία που οστεοπορωτικά κατάγματα παρατηρούνται σπάνια. Νέες τεχνικές έχουν αναπτυχθεί για την εκτίμηση της μηχανικής αντοχής των σπονδύλων (θλιπτικές δοκιμές) και της κεφαλής των μηριαίων (δοκιμή υπομοχλίου), σημεία στα οποία παρατηρούνται συχνά οστεοπορωτικά κατάγματα στους ανθρώπους (Sogaard et al., 1994, Yao et al., 2005).

Ιδιαίτερα χρήσιμες για τον υπολογισμό των εμβιομηχανικών ιδιοτήτων των οστών μικρόσωμων ζωικών προτύπων όπως τα τρωτικά είναι οι δοκιμές κάμψης. Στις δοκιμές κάμψης το οστό φορτίζεται μέχρι να προκληθεί κάταγμα. Οι δοκιμές αυτές προκαλούν θλίψη στη μια πλευρά του οστού και εφελκυσμό στην αντίθετη. Καθώς το οστό είναι πιο ανθεκτικό στη θλίψη παρά στον εφελκυσμό,

αποτυγχάνει συνήθως από την πλευρά που υφίσταται τον εφελκυσμό (Keller et al., 1986). Οι δοκιμές κάμψης είναι τριών ή τεσσάρων σημείων (Εικόνες 2 και 3).



Εικόνα 2. Δοκιμασία κάμψης τριών σημείων.



Εικόνα 3. Δοκιμασία κάμψης τεσσάρων σημείων.

Η δοκιμή κάμψης τριών σημείων έχει το πλεονέκτημα της απλότητας, αλλά μειονεκτητεί στο ότι δημιουργεί υψηλές διατμητικές τάσεις στη μεσότητα των οστών. Αντίθετα, η δοκιμή τεσσάρων σημείων δεν προκαλεί διατμητικές τάσεις αλλά για την πραγματοποίηση της απαιτεί τα δυο σημεία που ασκούν φόρτιση στο οστό να είναι ισοδύναμα, γεγονός το οποίο είναι πρακτικά δύσκολο να επιτευχθεί σε δοκίμια όπως τα οστά, τα οποία έχουν ακανόνιστο σχήμα. Για τους ανωτέρους λόγους, η δοκιμή κάμψης τριών σημείων αποτελεί πιο δημοφιλή μέθοδο για την καταγραφή των εμβιομηχανικών ιδιοτήτων των οστών των επιμύων (Turner and Burr, 1993).

Συλλογή κολπικών επιχρισμάτων

Ο όρος οίστρος χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά σε δημοσίευση του Hearpe το 1900. Ο Hearpe βασισμένος στη λέξη αυτή ονόμασε και όρισε τις φάσεις του κύκλου των θηλαστικών. Την εποχή εκείνη, οι φάσεις ορίζονται σύμφωνα με τις αλλαγές στη συμπεριφορά καθώς και σε αδρές μορφολογικές και ιστολογικές αλλαγές του αναπαραγωγικού συστήματος των θηλυκών.

Για τη διευκρίνιση της διάρκειας, και ακολούθως των φάσεων του αναπαραγωγικού κύκλου, συλλέγονται κολπικά επιχρίσματα για τουλάχιστον 14 διαδοχικές μέρες (Cooper and Goldman, 1999). Η συλλογή των επιχρισμάτων μπορεί να πραγματοποιηθεί οποιαδήποτε ώρα της ημέρας, αλλά το πρωτόκολλο που ακολουθείται στα περισσότερα εργαστήρια είναι η συλλογή να πραγματοποιείται νωρίς το πρωί, όταν τα φώτα έχουν ανάψει. Ανεξάρτητα από την ώρα συλλογής των δειγμάτων, η λήψη θα πρέπει να πραγματοποιείται περίπου την ίδια ώρα καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας ώστε να αποφευχθούν οι διακυμάνσεις.

Η συλλογή των δειγμάτων μπορεί να γίνει με δυο τρόπους, είτε με κολπικές πλύσεις είτε με λήψη επιχρίσματος με βαμβανοφόρο στυλέο (swabbing). Οι κολπικές πλύσεις τυπικά αποφέρουν μεγαλύτερο κυτταρικό δείγμα. Με τις κολπικές πλύσεις, τυπικά, έχουμε μεγαλύτερο κυτταρικό δείγμα και αποτελεί τη μέθοδο επιλογής των συγγραφέων.

Ανεξάρτητα από τη μέθοδο συλλογής, η ακρίβεια της ερμηνείας των δειγμάτων/επιχρισμάτων εξαρτάται από την ποιότητα της προετοιμασίας του δείγματος.

Ο αναπαραγωγικός κύκλος των επιμύων διαρκεί 4 με 5 μέρες, ενώ μπορεί να παρατηρηθεί κύκλος 6 ημερών σε μεμονωμένα ζώα (Goldman et al., 2007). Πολλοί παράγοντες επηρεάζουν τη διάρκεια του κύκλου, όπως το φως, η ηλικία, η θερμοκρασία, ο θόρυβος, η διατροφή, το στρες και οι κοινωνικές σχέσεις (Goldman et al., 2007).

Ο αναπαραγωγικός κύκλος των επιμύων είναι πολύ ευαίσθητος στις εναλλαγές φωτός-σκοτούς. Στα περισσότερα εργαστήρια, όπως και στο δικό μας, χρησιμοποιείται κύκλος 12 ώρες φως-12 ώρες σκοτάδι. Στα εργαστήρια που χρησιμοποιούν κύκλο 14 ώρες φως-10 ώρες σκοτάδι παρατηρείται διαφορετική αναλογία στον αριθμό των επιμύων με κύκλο 5 ημερών (OECD n.d.).

Η διάρκεια των 4 φάσεων ποικίλει από 6 έως 72 ώρες, ανάλογα τη φάση και τον επίμυ. Εξαιτίας αυτού κάποιες φάσεις μπορεί να "χαθούν", ιδιαίτερα όταν τα δείγματα συλλέγονται πολύ νωρίς ή πολύ αργά μέσα στη μέρα. Για παράδειγμα, ο προοίστος, με μέση διάρκεια 14 ωρών, μπορεί να χαθεί όταν η συλλογή γίνεται πολύ νωρίς το πρωί, καθώς στους περισσότερους θηλυκούς επίμυες ο προοίστρος ξεκινά αργά το πρωί και τελειώνει πριν την επόμενη συλλογή. Η συλλογή των δειγμάτων μπορεί να γίνει αργά το πρωί ή νωρίς το απόγευμα, ώστε να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα να χαθούν φάσεις.

Τύποι κυττάρων του αναπαραγωγικού κύκλου

1. Ουδετερόφιλα

2. Μικρά εμπύρρηνα επιθηλιακά κύτταρα
3. Μεγάλα εμπύρρηνα επιθηλιακά κύτταρα
4. Κερατινοποιημένα επιθηλιακά κύτταρα

Οι φάσεις του κύκλου ταυτοποιούνται από την απουσία, την παρουσία και το ποσοστό των 4 βασικών κυτταρικών τύπων και τη διάταξή τους στην αντικειμενοφόρο πλάκα.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Ειδικό Μέρος

Σκοπός της μελέτης

Η οστεοπόρωση είναι μια χρόνια μεταβολική νόσος του σκελετού που χαρακτηρίζεται από χαμηλή οστική πυκνότητα και διαταραχή της μικροαρχιτεκτονικής του οστίτη ιστού με επακόλουθη αύξηση της ευθραυστότητας των οστών (Office of the Surgeon General, 2004).

Το φάσμα των θεραπευτικών προσεγγίσεων κατά της οστεοπόρωσης είναι ιδιαίτερα ευρύ. Οι θεραπευτικές αγωγές μπορεί να επάγουν την οστική κατασκευή ή να έχουν αντιοστεοκλαστική δράση (Pageau, 2009). Οι παρενέργειες που συνοδεύουν τις θεραπευτικές αυτές προσεγγίσεις ποικίλουν σε βαρύτητα, και σε ορισμένες περιπτώσεις ασθενών αποτελούν την αιτία μη συμμόρφωσης με την θεραπευτική αγωγή (Beral, 2007). Για το λόγο αυτό, η χρήση εναλλακτικών μεθόδων πρόληψης προερχόμενων από φυτά για την αποφυγή των παρενεργειών είναι ελκυστική και αποδεκτή από τις γυναίκες (Dontas et al., 2006).

Σκοπός της μελέτης είναι η ανακάλυψη εναλλακτικών θεραπευτικών προϊόντων φυσικής προέλευσης, από εδώδιμα είδη της Μεσογειακής διατροφής, για την προστασία του γυναικείου πληθυσμού από ανεπιθύμητες καταστάσεις που σχετίζονται με την εμμηνόπαυση και ειδικότερα την οστεοπόρωση.

Η Μαστίχα Χίου παράγεται από την Πιστακία λεντίσκος ποικ. η Χία της οικογένειας των Ανακαρδιοειδών (*Pistacia lentiscus var Chia* cv Anacardiaceae), ένα φυτό το οποίο συναντάται κυρίως στη Χίο. Οι ευεργετικές και θεραπευτικές ιδιότητες της Μαστίχας Χίου είναι γνωστές από την αρχαιότητα, όπου αρχαίοι Έλληνες ιατροί όπως ο Ιπποκράτης, ο Θεόφραστος, ο Διοσκουρίδης και ο Γαληνός ανέφεραν τις ιδιότητες της (Pachi et al., 2020, Mills and White 1977, Duke JA 1983, Mills and White 1989, Dalby 2003). Το 2015 η Μαστίχα Χίου αναγνωρίστηκε ως παραδοσιακό φυτικό φαρμακευτικό προϊόν από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (EMA, 2015). Η Μαστίχα Χίου αποτελείται κατά το 65-70% από τερπένια, γεγονός που την κάνει μοναδική ανάμεσα σε όλες τις φυσικές ρητίνες. Τα πιο χαρακτηριστικά τερπένια ανήκουν στην κατηγορία των τριτερπενίων (Giaginis and Theocharis, 2011) τα οποία έχουν αποδειχθεί πως έχουν μια σημαντική προστατευτική δράση στην οστική πυκνότητα των ωοθηκιομημένων μυών (Li et al., 2007). Τις τελευταίες δεκαετίες η Μαστίχα Χίου έχει αποτελέσει το επίκεντρο μελέτης πολλών ερευνητικών ομάδων, όμως είναι η πρώτη φορά που ελέγχεται η δράση της στην μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση.

Υλικά και μέθοδοι

Ζωικά πρότυπα –στέγαση και ομαδοποίηση

Για την παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκαν 30 θήλεις επίμυς Wistar, η παραλαβή των οποίων έγινε από το Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ σε ηλικία 3 μηνών και μεταφέρθηκαν με ειδικούς κλωβούς στο Εργαστήριο «Έρευνας Παθήσεων Μυοσκελετικού Συστήματος» του Νοσοκομείου ΚΑΤ. Η έγκριση του πρωτοκόλλου έγινε από την Αρμόδια Περιφερειακή Κτηνιατρική Αρχή με αρ. πρωτ. ΔΑΚΠ 2158/18.062015. Το πρωτόκολλο εγκρίθηκε και από την επιστημονικό συμβούλιο του Νοσοκομείου ΚΑΤ.

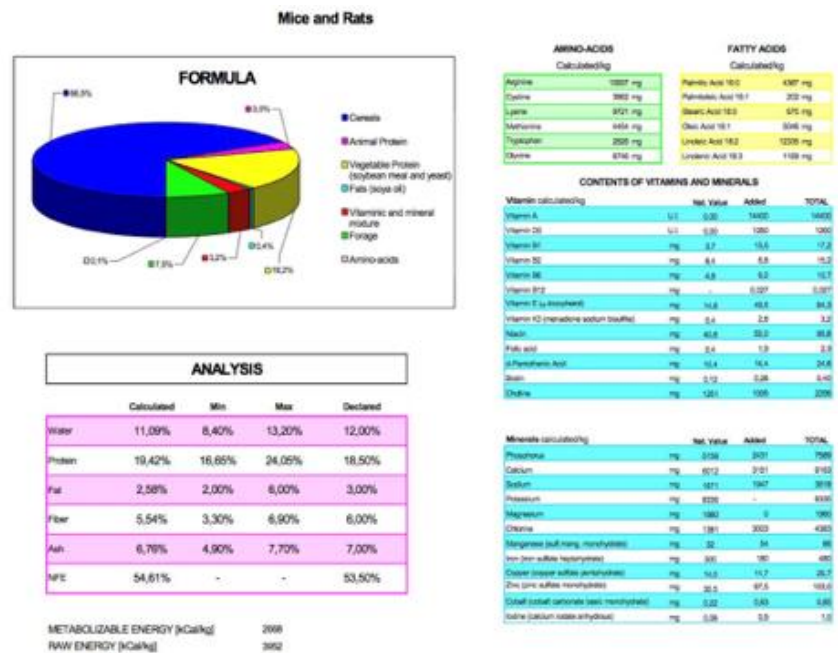
Τα ζώα ετέθησαν σε ομάδες των τριών, σε ειδικούς πλαστικούς κλωβούς διεθνών προδιαγραφών υπό πρότυπες συνθήκες και υπό αυστηρή επίβλεψη των υπευθύνων κτηνιάτρου και ζωοκόμου του εργαστηρίου (Εικόνα 4). Στο χώρο φύλαξης υπήρχε σταθερή θερμοκρασία 22°C (+/-2°C), και με σχετική υγρασία περιβάλλοντος 55%, ενώ υπήρχε εναλλαγή αέρος 15 φορές/ώρα. Επίσης υπήρχε εναλλαγή φωτός (ημέρα/νύχτα) ανά 12ωρο. Τα ζώα τοποθετήθηκαν αρχικά σε ήρεμο περιβάλλον για περίπου 2 εβδομάδες και χωρίς καμία στρεσογόνο παρέμβαση με σκοπό τον εγκλιματισμό τους.



Εικόνα 4. Χώρος φύλαξης των επιμύων στο Εργαστήριο «Έρευνας Παθήσεων Μυοσκελετικού Συστήματος» του Νοσοκομείου ΚΑΤ.

Κατά τους έξι πρώτους μήνες οι επίμυς σιτίζονταν και δραστηριοποιούνταν εντός των κλωβών σε στρωμνή από ειδικό προιονίδι, το οποίο αλλαζόταν τακτικά. Την περίοδο αυτή, τα ζώα σιτίζονταν με

ειδική τροφή συντήρησης 4RF21 GPL, η σύσταση της οποίας φαίνεται στην Εικόνα 5. Τα ζώα ζυγίζονταν και εξετάζονταν σε μηνιαία βάση, για την αξιολόγηση της ανάπτυξης τους.



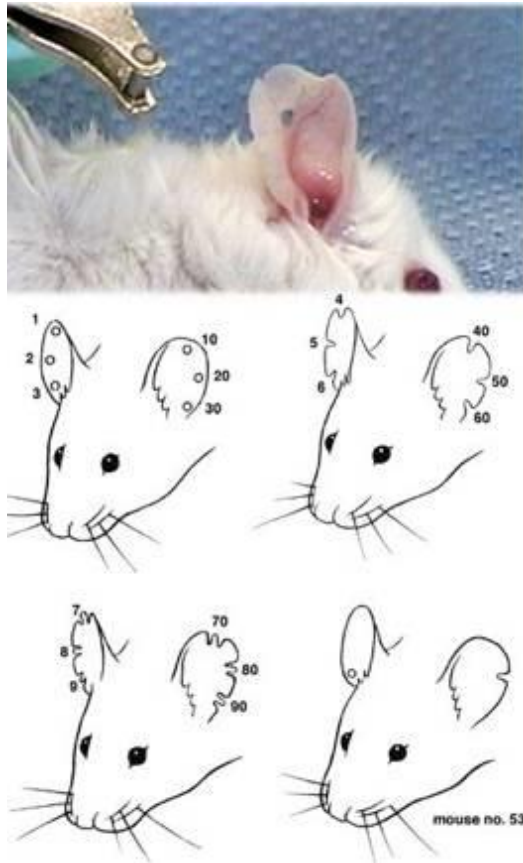
Εικόνα 5. Σύσταση της ειδικής τροφής συντήρησης 4RF21 GPL που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη των επιμύων από την ηλικία των 3 μηνών έως την ηλικία των 6 μηνών.

Για το ζύγισμα χρησιμοποιήθηκε ψηφιακός ζυγός και μεταλλικός κλωβός εντός του οποίου τοποθετούνταν το προς ζύγισμα ζώο. Το περιβάλλον των ζώων εμπλουτιζόταν με γάζες – χαρτοβάμβακα κ.α. επιβραβεύοντάς τα, έτσι ώστε να ελαχιστοποιούμε το στρεσογόνο ερέθισμα, στην προκειμένη περίπτωση το ζύγισμα (Loukavenko et al., 2016).

Ταυτοποίηση και αρίθμηση επιμύων

Η αρχική αρίθμηση των επιμύων πραγματοποιήθηκε με την αναγραφή του αριθμού στην ουρά των επιμύων με ειδικά ανεξίτηλα χρώματα.

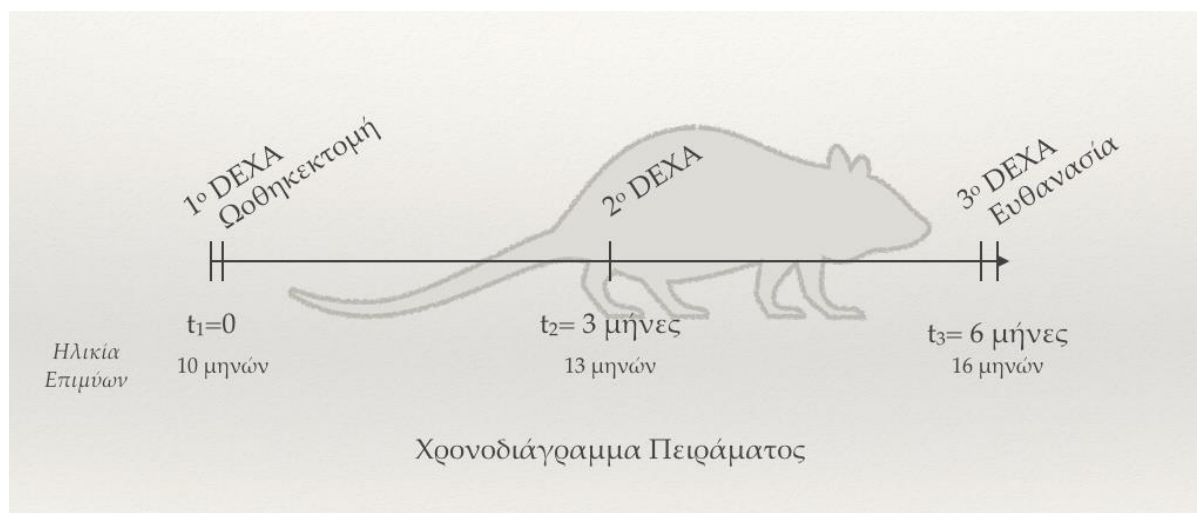
Η μόνιμη αρίθμηση των επιμύων πραγματοποιήθηκε με τη χορήγηση της πρώτης αναισθησίας, κατά την πρώτη μέτρηση οστικής πυκνότητας, με την τεχνική που παρουσιάζεται στην Εικόνα 6.



Εικόνα 6. Μέθοδος αριθμησης και ταυτοποίησης των επιμύων με τις μονάδες να σημαίνονται στο δεξιό ούς και τις δεκάδες στο αριστερό (Δοντά, 1993).

Μέτρηση οστικής πυκνότητας

Η μέτρηση της οστικής πυκνότητας (BMD) των επιμύων πραγματοποιήθηκε τρεις φορές. Η πρώτη μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε ηλικία 10 μηνών, πριν την ωθηκεκτομή. Οι δυο επόμενες μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν μετά από τρεις και έξι μήνες, αντίστοιχα (εικόνα 7).

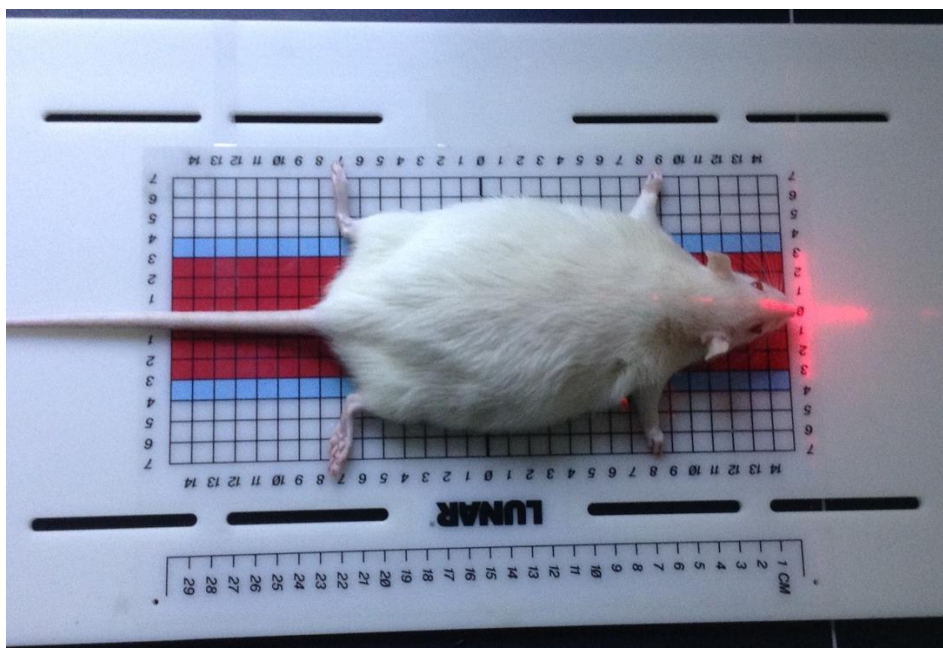


Εικόνα 7. Χρονοδιάγραμμα πειραματικής διαδικασίας.

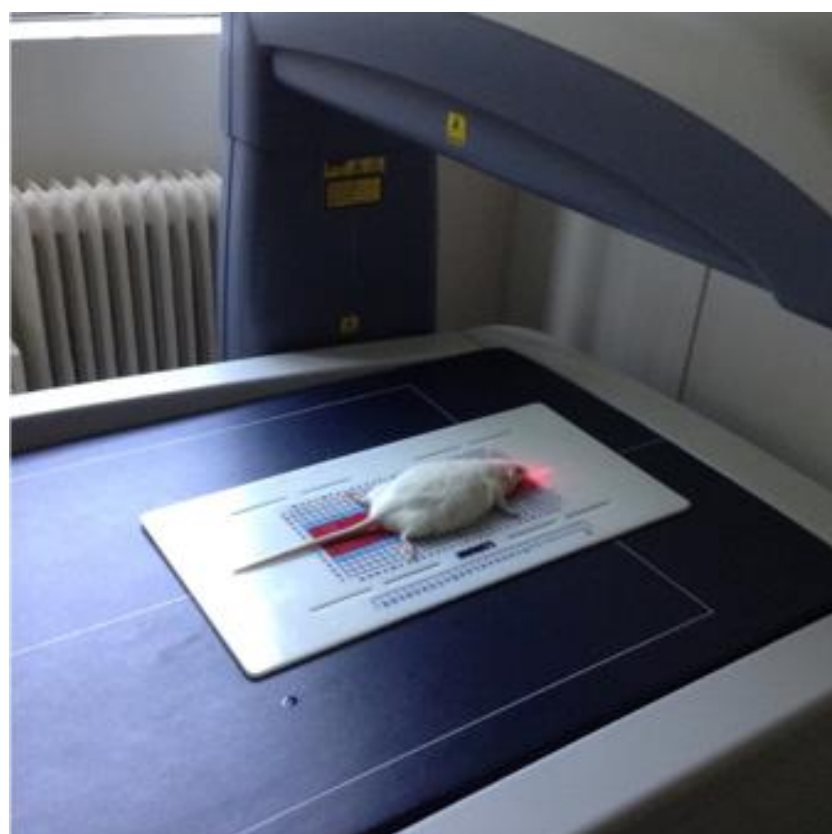
Η μέτρηση οστικής πυκνότητας πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Οστικής Πυκνομετρίας (D.E.X.A.) και Ποσοτικής Υπολογιστικής Τομογραφίας (pQCT) του Εργαστηρίου Έρευνας Παθήσεων του Μυοσκελετικού Συστήματος της Ιατρικής Σχολής στο Νοσοκομείο ΚΑΤ. Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ολόσωμης απεικόνισης με προβολή και χρήση D.E.X.A., της εταιρείας GE, τύπου Prodigy Advance, στο οποίο είναι εγκατεστημένο ειδικό λογισμικό για τη μέτρηση της οστικής πυκνότητας μικρών θηλαστικών.

Η εξέταση πραγματοποιήθηκε υπό γενική αναισθησία. Την ημέρα της εξέτασης τα ζώα ζυγίζονται ώστε να μπορεί να γίνει σωστά ο υπολογισμός της δόσης των φαρμάκων. Μετά τη ζύγιση των ζώων έγινε ενδομυϊκή χορήγηση των φαρμάκων για την εγκατάσταση γενικής αναισθησίας. Τα φάρμακα που χορηγήθηκαν ήταν δεξμεδετομιδίνη στη δόση 0.25 mg/Kg σωματικού βάρους (Dexdomitor 0,5 mg/ml) και κεταμίνη στη δόση 50 mg/Kg σωματικού βάρους (Imalgene 100 mg/ml). Κάθε φορά που τα ζώα βρίσκονταν υπό γενική αναισθησία τα μάτια τους διατηρούνταν ενυδατωμένα με κολλύριο σε μορφή τζελ. Μετά την πλήρη αναισθητοποίηση των επιμύων, τοποθετούνταν σε ειδικό βαθμονομημένο υπόστρωμα το οποίο βοηθά στη σωστή τοποθέτησή τους, όπως φαίνεται στην Εικόνα 8 και κατόπιν πραγματοποιήθηκε η μέτρηση στο μηχάνημα D.E.X.A. (Εικόνα 9).

Μετά το πέρας της εξέτασης χορηγείται στους επίμυς αντίδοτο της αναισθησίας, ατιπαμεζόλη με δόση 1 mg/Kg σωματικού βάρους (Antisedan 5 mg/kg).



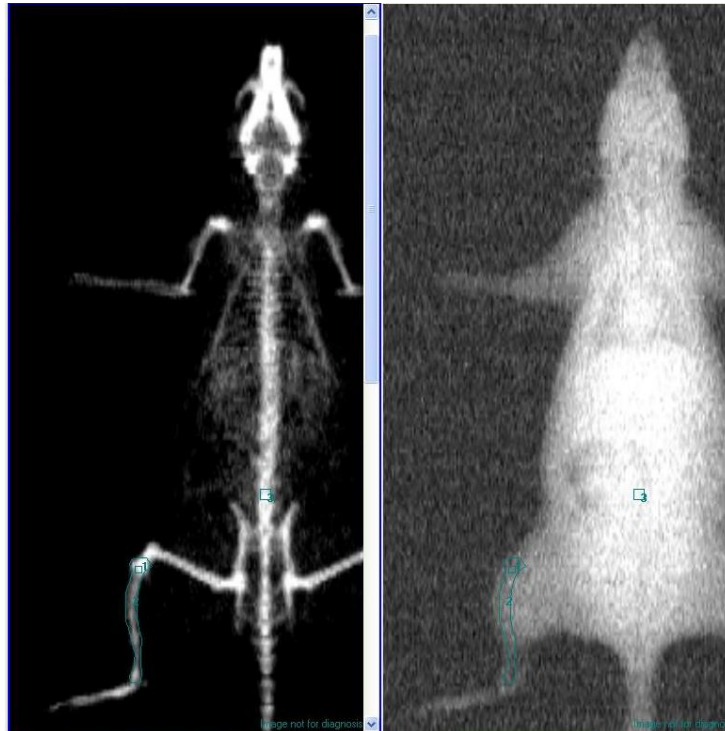
Εικόνα 8. Τοποθέτηση αναισθητοποιημένου επίμους στο ειδικό υπόστρωμα για τη μέτρηση της BMD.



Εικόνα 9. Τοποθέτηση αναισθητοποιημένου επίμους στο μηχανήμα D.E.X.A. για τη μέτρηση της BMD.

Κατόπιν, εκτιμήθηκε η οστική πυκνότητα (BMD) των επιμύων με την τοποθέτηση ROIs στην περιοχή της κνήμης και του 6^{ου} οσφυϊκού σπονδύλου. Εκτιμήθηκε η BMD της κνήμης, στην οποία

συμπεριλαμβάνονται τόσο φλοιώδες όσο και σπογγώδες οστό, με την ROI να περιλαμβάνει όλη την αριστερή κνήμη. Η εκτίμηση της BMD του σπογγώδους οστού έγινε στην εγγύς μετάφυση της αριστερής κνήμης, σημείο το οποίο θεωρείται αντιπροσωπευτικό δείγμα του σκελετού του επίμυος ταχείας οστικής εναλλαγής πλούσιο σε σπογγώδες οστό. Η τοποθέτηση της ROI (0.19 mm × 0.19 mm) έγινε 3 mm περιφερικά της κνημιαίας αρθρικής επιφάνειας. Στον 6^ο οσφυϊκό σπόνδυλο η ROI είχε μέγεθος 0.32 mm×0.32 mm (Εικόνα 10). Πριν από την μέτρηση της BMD κάθε ομάδα το σύστημα βαθμονομείται με ειδικό ομοίωμα.



Εικόνα 10. ROIs στην περιοχή της κνήμης και του 6^{ου} οσφυϊκού σπονδύλου.

Ωοθηκεκτομή

Η ωοθηκεκτομή πραγματοποιήθηκε στο χειρουργείο υπό άσηπτες συνθήκες. Την ημέρα της ωοθηκεκτομής τα ζώα ζυγίσθηκαν ώστε να γίνει σωστός υπολογισμός των δόσεων των φαρμάκων.

Μετά τη ζύγιση, τα ζώα μεταφέρθηκαν στο επίπεδο του χειρουργείου σε ειδικό δωμάτιο δίπλα στην αίθουσα του χειρουργείου. Εκεί τα ζώα αναισθητοποιήθηκαν με τη χορήγηση δεξμεδετομιδίνης με δόση 0.25 mg/Kg σωματικού βάρους (Dexdomitor 0,5 mg/ml) και κεταμίνη με δόση 50 mg/Kg σωματικού βάρους (Imalgene 100 mg/ml).



Εικόνα 11. Ακίνητοποίηση του αναισθητοποιημένου επίμους για την πραγματοποίηση της ωθηκεκτομής.

Όταν τα ζώα αναισθητοποιήθηκαν πλήρως έγινε ευπρεπισμός, ακίνητοποιήθηκαν όπως φαίνεται στην Εικόνα 11 και έγινε άσηπτη προετοιμασία του εγχειρητικού πεδίου. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε τομή στη μέση γραμμή του δέρματος στο ουραίο τρίτο της απόστασης ομφαλού-ηβοϊσχιακής σύμφυσης. Ο υποδόριος ιστός αποχωρίστηκε με κυρτό ψαλίδι και αποκαλύφθηκε η λευκή γραμμή. Έγινε τομή της λευκής γραμμής και αποκαλύφθηκε η περιτοναϊκή κοιλότητα. Μετά τον εντοπισμό της αριστερής ωθήκης διαχωρίστηκε ο πλατύς σύνδεσμος σε σημείο όπου δεν υπάρχουν αγγεία. Στο σημείο αυτό πραγματοποιήθηκε απολίνωση της ωθήκης με απορροφήσιμο ράμμα 4-0 και τομή κεφαλικά της ωθήκης.

Στη συνέχεια τα ωθηκικά αγγεία απολινώθηκαν στο ύψος του κρεμαστήρα συνδέσμου της ωθήκης και διατμήθηκαν περιφερικά της απολίνωσης. Κατόπιν, το κολόβωμα επιθεωρήθηκε για τον έλεγχο αιμορραγιών και αφέθηκε να επιστρέψει στην κοιλιακή κοιλότητα. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε και για τη δεξιά ωθήκη. Η σύγκλιση των κοιλιακών τοιχωμάτων πραγματοποιήθηκε με απλές χωριστές ραφές και απορροφήσιμο ράμμα 4-0 ενώ η σύγκλιση του δέρματος πραγματοποιήθηκε με Π οριζόντιες ραφές και μεταξωτό ράμμα 4.0. Μετά το πέρας της ωθηκεκτομής χορηγήθηκε στους επίμους αντίδοτο, ατιπαμεζόλη με δόση 1 mg/Kg σωματικού βάρους (Antisedan 5 mg/kg), και τα ζώα τοποθετήθηκαν σε θερμαινόμενο υπόστρωμα μέχρι να συνέλθουν πλήρως.

Χορήγηση Μαστίχας Χίου

Ανάλυση Μαστίχας Χίου

Για την ανάλυση της Μαστίχας Χίου χρησιμοποιήθηκε ένα AQUITY UPLC σύστημα (Waters) ενωμένο με ένα υβριδικό LTQ-Orbitrap XL φασματογράφο μάζας (Thermo Scientific). Χρησιμοποιήθηκε ως μέθοδος ιονισμός ο ηλεκτροψεκασμός (ESI), σε αρνητική λειτουργία. Το σύστημα διαλυτών αποτελείται από (A) 0,1% μυρμηκικό οξύ και (B) ακετονιτρίλιο, και ο ρυθμός ροής ρυθμίστηκε στα 0,4 ml / min. Για το διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε μια στήλη Supelco Ascentis Express C18 (100 x 2.1 mm.i.d, 2.7 μ m particlesize). Το σύστημα βαθμιδωτής έκλουσης ρυθμίστηκε ως εξής: 5-70% B για 3 λεπτά, 70-100% B για 17 λεπτά, διακοπή για 4 λεπτά, 100-5% B για 1 λεπτό και 3 λεπτά χρόνο εξισορρόπησης. Επιπλέον, ο όγκος της ένεσης ρυθμίστηκε στα 10 μ L.

Πριν την ανάλυση της Μαστίχας Χίου προηγήθηκε η προετοιμασία του δείγματος. Το βήμα αυτό απαιτείται για την απομάκρυνση του πολυμερούς της Μαστίχας Χίου (poly- β -myrcene) το οποίο εμποδίζει την ανίχνευση των τριτερπενίων. Συγκεκριμένα, η μαστίχα Χίου διαλύεται σε οξικό αιθυλεστέρα και μεθανόλη και μετά από περίοδο δυο ημέρων το πολυμερές μεταγγίζεται (Paraschos et al., 2007). Το υπερκείμενο διάλυμα διηθείται από φίλτρο PVDF, 0.45 μ m, και μετά εξατμίζεται μέχρι ξηρού. Για την αραιώση του δείγματος σε συγκέντρωση 100 μ g / ml χρησιμοποιήθηκε διάλυμα νερού : ακετονιτρίλιου (1: 1). Όλα τα δεδομένα από την πλήρη σάρωση HRMS & HRMS / MS αποκτήθηκαν σε εύρος μαζών m / z 115-1000.

Για την ταυτοποίηση των συστατικών του εκχυλίσματος χρησιμοποιήθηκαν χρωματογραφικά και φασματομετρικά χαρακτηριστικά και συγκεκριμένα ο χρόνος κατακράτησης, η προτεινόμενη στοιχειακή ανάλυση (EC), ο βαθμός ακορεστότητας (ring double bond equivalent - RDBeq.) καθώς και φάσματα HRMS / MS, ο τρόπος θραυσματοποίησης και η σύγκριση με δημοσιευμένες πληροφορίες (Andreadou et al., 2016, Lemonakis et al., 2011, Xynos et al., 2018) και βάσεις δεδομένων φυσικών προϊόντων (PubChem, ChemSpider). Τα ανεπεξέργαστα δεδομένα αποκτήθηκαν και υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με τη χρήση του λογισμικού XCalibur έκδοση 2.2 TM από την Thermo Scientific.

Προετοιμασία εκχυλίσματος

Η Μαστίχα Χίου χορηγείται στους επίμους από του στόματος με φορέα την τροφή. Ο εμπλουτισμός της τροφής με την Μαστίχα Χίου έγινε στη Φαρμακευτική Σχολή του Πανεπιστημίου Αθηνών και στη Σχολή Επιστήμης των Ζώων του Πανεπιστημίου Αθηνών. Το πρώτο στάδιο εμπλουτισμού της τροφής ήταν η κιονιορροποίηση της ειδικής τροφής χωρίς σόγια (Εικόνα 12), διαδικασία η οποία πραγματοποιήθηκε στη Φαρμακευτική Σχολή. Η τροφή αναμιχθηκε με τη σκόνη Μαστίχας Χίου σε ειδικό αναδευτήρα στη Σχολή Επιστήμης των Ζώων και κατόπιν, μεταφέρθηκε σε μηχανήμα σχηματισμού πέλλετ.

Complete feed for MICE and RATS
4RF21 modified
WITHOUT SOY and SOY BY-PRODUCTS

Directions for use: Administer the dry product *ad libitum* to mice and rats with drinking water always at disposal.

Composition: Wheat, maize, maize gluten, corn gluten feed, wheat straw, lucerne meal, fish meal, mineral dicalcium phosphate, calcium carbonate, corn oil, sodium chloride, whey powder, sucrose, magnesium oxide, corn starch, yeasts.

ADDITIVES (per kg)

| Nutritional additives | | | | Analytical constituents | | % | |
|-----------------------|------------|------|-------|-------------------------|--|-------|--|
| E672 | Vitamin A | I.U. | 14400 | | | | |
| E671 | Vitamin D3 | I.U. | 1260 | | | | |
| E1 | Fe | mg | 180 | Crude protein | | 18.50 | |
| E5 | Mn | mg | 54 | Crude oils and fats | | 3.00 | |
| E6 | Zn | mg | 67.5 | Crude fibres | | 6.00 | |
| E4 | Cu | mg | 11.7 | Crude ash | | 7.00 | |
| E2 | I | mg | 0.90 | | | | |
| 3b302 | Co | mg | 0.63 | | | | |

Contains fish meal
shall not be fed to ruminants

Εικόνα 12. Σύσταση τροφής χωρίς σόγια.

Η σκόνη Μαστίχας Χίου που αναμιχθηκε με την τροφή των επιμύων είναι εμπορικά διαθέσιμη και ήταν δωρεά της Ένωσης Μαστιχοπαραγωγών Χίου.

Δοσολογία εκχυλίσματος

Η δοσολογία της Μαστίχας Χίου που χορηγήθηκε στους επίμους στην παρούσα μελέτη ήταν 0.83g / Kg of BW / day και υπολογίστηκε με βάση τον τύπο

$$HED \left(\frac{mg}{kg} \right) = Animal Dose \left(\frac{mg}{kg} \right) * \frac{Animal Km}{Human Km}$$

ο οποίος δημοσιεύτηκε από των Reagan- Shaw και τους συνεργάτες του στο “Dose translation from animal to human studies revisited” (Reagan – Shaw et al., 2008), όπου:

HED: ισοδύναμη ανθρώπινη δόση (human equivalent dose, HED) και

Animal Km: ο συντελεστής για το πειραματόζωο. Ο συντελεστής για τους επίμους έχει τιμή 6.

Human Km: ο συντελεστής για τον άνθρωπο. Για ενήλικες η τιμή του συντελεστή είναι 37.

Η δόση για έναν ενήλικα άνθρωπο 60 Kg είναι 8g/day ή 0.13g/kg. Η Μαστίχα Χίου χορηγήθηκε για έξι μήνες και η ημερήσια κατανάλωση τροφής ήταν 20 gr ανά ημέρα.

Παρακολούθηση σωματικού βάρους

Από την ημέρα που οι επίμυς μεταφέρθηκαν στο χώρο του εργαστηρίου μέχρι και το τέλος της πειραματικής διαδικασίας γίνεται συστηματική παρακολούθηση του βάρους των ζώων. Το βάρος των επιμύων μετρούνταν και καταγράφονταν κάθε μήνα. Η ζύγιση γίνεται σε ψηφιακό ζυγό και τα ζώα τοποθετούνταν σε μεταλλικό κλωβό.

Παρακολούθηση κατανάλωσης νερού και τροφής

Η κατανάλωση τροφής και νερού παρακολουθούνταν συστηματικά από την ημέρα της μεταφοράς των ζώων στο χώρο του εργαστηρίου μέχρι και το πέρας της πειραματικής διαδικασίας. Η καταμέτρηση της κατανάλωσης της τροφής και του νερού πραγματοποιούνταν δυο φορές την εβδομάδα.

Η χορήγηση της Μαστίχας Χίου γίνονταν με φορέα την τροφή. Για το λόγο αυτό η παρακολούθηση της κατανάλωσης τροφής, πριν την ωοθηκιοτομή, αποσκοπούσε στον υπολογισμό της μέσης κατανάλωσης ανά επιμύ και το σωστό εμπλουτισμό της τροφής.

Συλλογή κολπικών επιχρισμάτων

Μεθοδολογία

Λήψη κολπικού επιχρίσματος και εκτίμηση της ωρίμανσης του κολπικού επιθήλιου.

Η εκτίμηση του επιθήλιου του κόλπου των επιμύων προσδιορίζονταν από τα κολπικά τους επιχρίσματα. Η λήψη του κολπικού επιχρίσματος γίνεται με ήπιες κινήσεις για την αποφυγή τραυματισμού ή ερεθισμού του κόλπου, με τη χρήση αποστειρωμένων βαμβάκοφόρων στυλεών εμποτισμένων σε φυσιολογικό ορό. Τα κολπικά επιχρίσματα επιστρώνονταν σε αντικειμενοφόρους πλάκες και μονιμοποιούνταν αμέσως με σπρέι. Οι λήψεις των επιχρισμάτων πραγματοποιούνταν κάθε μέρα στις 10.00 π.μ.

Ευθανασία, συλλογή και ζύγιση οργάνων

Την ημέρα της ευθανασίας τα ζώα ζυγίζονταν ώστε να γίνει σωστός υπολογισμός των δόσεων των φαρμάκων. Τα ζώα μεταφέρονταν στο επίπεδο του χειρουργείου και η προετοιμασία τους γίνονταν σε διαφορετικό θάλαμο. Στα ζώα χορηγούνταν αναισθησία ενδομυϊκά, δεξμεδετομιδίνη με δόση 0.25 mg / Kg σωματικού βάρους (Dexdomitor 0,5 mg/ml) και κεταμίνη με δόση 50 mg / Kg σωματικού βάρους (Imalgene 100 mg/ml). Τα ζώα κατόπιν, ευπρεπίζονταν και μεταφέρονταν στο χώρο του χειρουργείου. Αρχικά λαμβάνονταν αίμα από την οπίσθια κοίλη φλέβα το οποίο φυγοκεντρήθηκε (3000 στροφές για 10 λεπτά) και ο ορός που συλλέχθηκε διαχωρίστηκε και φυλάχθηκε στους -80°C. Κατόπιν, χορηγούνταν ενδοφλέβια ικανή δόση pentobarbital sodium BP 20% για την ευθανασία των επιμύων.

Κατά τη νεκροψία έγινε έλεγχος των ωοθηκών έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί ή όχι η επιτυχία της ωοθηκεκτομής με την απουσία ωοθηκικού ιστού και την παρατήρηση σημαντικής ατροφίας των κερμάτων της μήτρας. Τα ζώα ελέγχθηκαν, επίσης, για τυχόν κακοήθειες ή άλλες παθολογικές καταστάσεις. Κατόπιν συλλέχθηκαν οι μήτρες και ζυγίσθηκαν άμεσα στο μικροζυγό ακριβείας (Sartorius handy microbalance). Εκτός από τις μήτρες συλλέχθηκαν και άλλα όργανα τα οποία αναφέρονται στον Πίνακα 4. Τα όργανα ζυγίσθηκαν άμεσα σε μικροζυγό ακριβείας. Μέρος των οργάνων που συλλέχθηκαν, τοποθετήθηκαν σε φορμόλη 60% και μέρος στους -80 °C.

| | | | | |
|----------------|-----------------------|-----------------|--------|-----------|
| Δεξιά κνήμη | Ενδοπεριτοναϊκό Λίπος | Ουροδόχος κύστη | Μήτρα | Εγκέφαλος |
| Αριστερή κνήμη | Αριστερό Μηριαίο | Δεξιό Μηριαίο | Μαστός | |
| Ήπαρ | Γαστροκνήμιος | Καρδιά | Νεφρός | |

Πίνακας 4. Όργανα που συλλέχθηκαν κατά την ευθανασία.

Τα μηριαία οστά των επιμύων αμέσως μετά τη συλλογή τους τοποθετήθηκαν σε πλαστικούς σωλήνες αφού πρώτα τυλίχθηκαν με γάζα εμπλουτισμένη σε φυσιολογικό ορό (Turner and Burr, 1993). Τα δεξιά μηριαία οστά εκτιμήθηκαν στη συνέχεια με τη μηχανική δοκιμή κάμψης τριών σημείων (three-point-bending).

Οι δεξιές κνήμες τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε φορμόλη, ενώ οι αριστερές κνήμες τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε αιθανόλη 70%.

Οι μαστοί των επιμύων ελέγχθηκαν για την ύπαρξη όγκων ή κυστών και διαπιστώθηκε πως δεν υπήρξε κάποιο παθολογικό εύρημα.

Δοκιμή μηχανικής αντοχής των οστών

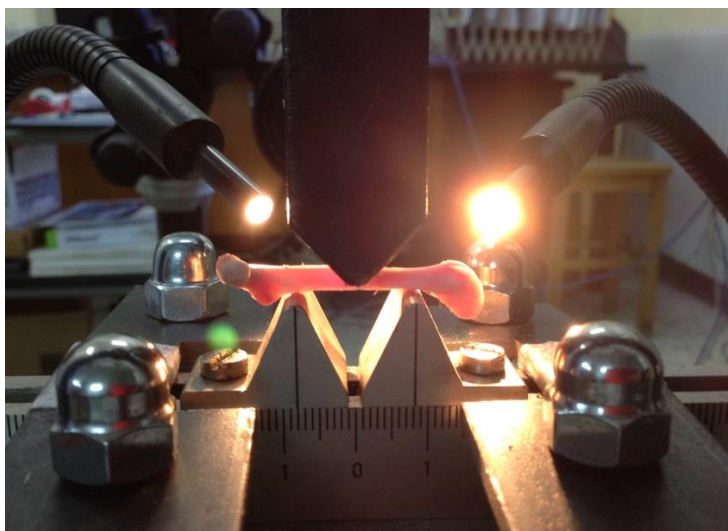
Θραύση οστών

Στην παρούσα μελέτη για την αξιολόγηση της αντοχής των οστών, τα δοκίμια υποβλήθηκαν σε δοκιμασία κάμψης τριών σημείων.

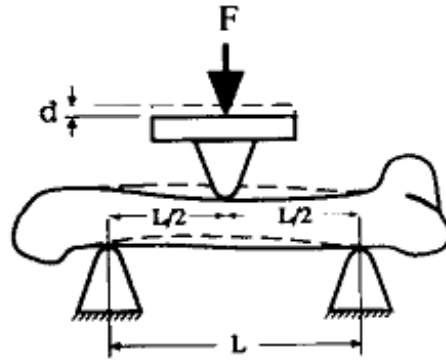
Από τους επίμυς λήφθηκαν τα δεξιά μηριαία οστά, τα οποία καταψύχθηκαν τυλιγμένα με γάζα εμποτισμένη από φυσιολογικό ορό και αποθηκεύτηκαν σε πλαστικά φιαλίδια στους -70°C .

Στη δοκιμασία κάμψης χρησιμοποιήθηκε το δεξί μηριαίο από κάθε επίμυ. Τα μηριαία οστά αριθμήθηκαν και καταχωρήθηκαν σε πίνακες αναφοράς με βάση την ομάδα που ανήκουν. Κατά την αρίθμηση των οστών των επιμύων πριν τον αριθμό χρησιμοποιήθηκε ο συμβολισμός RF (Right Femur). Στους συγκεκριμένους πίνακες αναγράφεται το αρχικό μήκος και η μέση διάμετρος κάθε οστού.

Τα πειράματα υλοποιήθηκαν στο ηλεκτρομηχανικό πλαίσιο φόρτισης MTS Insight 10 kN χρησιμοποιώντας ειδικά σχεδιασμένες στηρίξεις, πάνω στις οποίες εδράσθηκε το οστό. Η απόσταση μεταξύ των στηρίξεων ήταν ίση με 16 mm και διατηρήθηκε σταθερή για όλα τα δοκίμια (Εικόνα 13, Εικόνα 14). Όλα τα οστά φορτίστηκαν υπό "οιονει" στατικές συνθήκες στο μέσο του μήκους τους με σταθερό ρυθμό επιβολής μετατόπισης ίσο με 0.1 mm/min. Η φόρτιση ήταν μονοτονική μέχρι τη θραύση του οστού. Τα οστά τοποθετούνταν στην αρπάγη πάντα με τον ίδιο τρόπο. Αυτό γινόταν ώστε το κάθε πείραμα να γίνεται κάτω από τις ίδιες συνθήκες για να γίνει πιο σωστή στατιστική μελέτη των αποτελεσμάτων.



Εικόνα 13. Τοποθέτηση μηριαίου οστού



Εικόνα 14. Τοποθέτηση του οστού στην αρπάγη, πάντα με καθορισμένη απόσταση $L=16\text{mm}$, το οστό δέχεται πίεση από ένα έμβολο με μια δύναμη F . d είναι η μετατόπιση (displacement) του εμβόλου καθώς κατεβαίνει σταδιακά μέχρι να επέλθει πλήρης αστοχία.

Δεδομένου της πολύπλοκης γεωμετρίας του οστού και προκειμένου να γίνει ακριβής υπολογισμός των τάσεων που αναπτύσσονται στο οστό, ήταν απαραίτητη η γνώση του άξονα φόρτισης. Για το λόγο αυτό, μετά την τοποθέτηση του δοκιμίου στις στηρίξεις και πριν την έναρξη του πειράματος, σημειώθηκαν με μαρκαδόρο επάνω στο οστό το κατώτατο σημείο στο μέσο του μήκους τους και το σημείο επιβολής της δύναμης. Κατά την διεξαγωγή του πειράματος κάμψης πάρθηκαν αρκετές φωτογραφίες και βίντεο για κάθε οστό, από την εκκίνηση του εμβόλου που κατέβαινε σταδιακά και πίεζε το οστό μέχρι την αστοχία του. Σκοπός της καταγραφής ήταν ώστε αργότερα να μπορεί να γίνει έλεγχος για την ορθότητα της διαδικασίας.

| Test Method | ified Compression - Donta.msm | |
|-----------------|-------------------------------|----------|
| Sample I. D. | Sample11.mss | |
| Specimen Number | 10 | |
| Time (s) | Crosshead (mm) | Load (N) |
| 0.500 | 0.000 | 4.68 |
| 0.900 | 0.001 | 4.70 |
| 1.300 | 0.001 | 5.03 |
| 1.700 | 0.002 | 5.18 |
| 2.100 | 0.003 | 5.37 |
| 2.500 | 0.003 | 5.68 |
| 2.900 | 0.004 | 5.98 |
| 3.300 | 0.005 | 6.04 |
| 3.700 | 0.005 | 6.33 |
| 4.100 | 0.006 | 6.57 |
| 4.500 | 0.006 | 6.79 |
| 4.900 | 0.007 | 6.86 |
| 5.300 | 0.008 | 7.26 |
| 5.700 | 0.009 | 7.38 |
| 214,500 | 0.356 | 117.00 |
| 214,900 | 0.357 | 117.10 |
| 215,300 | 0.358 | 117.52 |
| 215,700 | 0.358 | 117.48 |
| 216,100 | 0.359 | 117.88 |
| 216,500 | 0.360 | 117.92 |
| 216,900 | 0.361 | 118.32 |
| 217,300 | 0.361 | 118.36 |
| 217,570 | 0.362 | -19.00 |

Εικόνα 15. Δεδομένα από την δοκιμασία κάμψης 3 σημείων του οστού LF45 που ανήκει στην ομάδα CMG.

Σταθεροποίηση οστών σε ρητίνη

Για τον ακριβή υπολογισμό των τάσεων μελετήθηκε η ακριβής γεωμετρία και διατομή του οστού μετά τη θραύση (Εικόνα 16).



Εικόνα 16. Διαφορετικές διατομές οστών.

Αρχικά έγινε η σταθεροποίηση του οστού στη βάση από το ειδικό καλούπι με τη χρήση κατάλληλου υλικού (Εικόνα 17). Σημαντικό στο βήμα αυτό είναι το οστό να σταθεροποιηθεί κατακόρυφα.

Κατόπιν παρασκευάστηκε η ρητίνη με προσοχή, ώστε να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες. Η ρητίνη που χρησιμοποιήθηκε χρειάστηκε 24 ώρες για να σταθεροποιηθεί πλήρως. Μετά το πέρας των 24 ωρών αφαιρέθηκε η ρητίνη μαζί με το οστό από το καλούπι (Εικόνα 18).



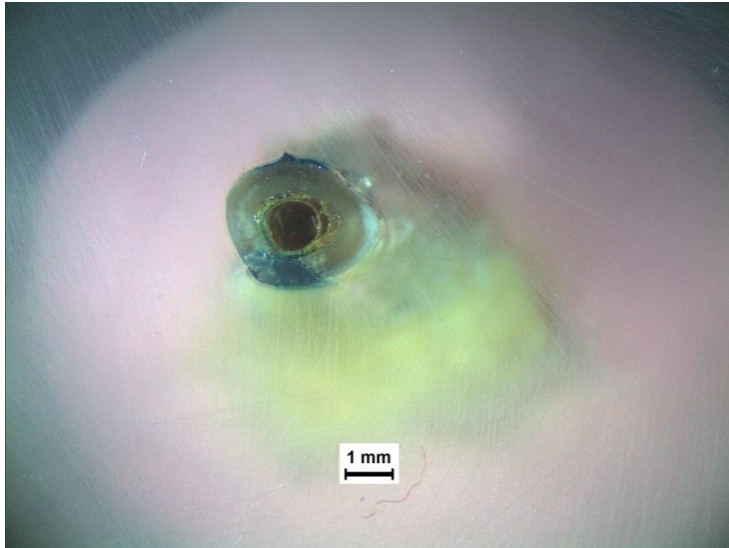
Εικόνα 17. Σταθεροποίηση του οστού.



Εικόνα 18. Οστό σε ρητίνη (RF45).

Λείανση και φωτογραφίες στο στερεοσκόπιο

Για να μπορέσουν να υπολογιστούν οι τάσεις που αναπτύσσονται στο οστό, ήταν απαραίτητη η δημιουργία επίπεδης επιφάνειας. Για το λόγο αυτό έγινε λείανση του οστού και της ρητίνης που το περιέβαλε με λειαντικά χαρτιά κατάλληλης ομαλότητας. Ακολούθησε η εξέταση των δοκιμών οστό-ρητίνης στο στερεοσκόπιο. Το στερεοσκόπιο που χρησιμοποιήθηκε ήταν συνδεδεμένο με Η/Υ και οι φωτογραφίες που ελήφθησαν από τα οστά-ρητίνη αποθηκευτήκαν εκεί (Εικόνα 19). Για τα δοκίμια οστό-ρητίνη οι φωτογραφίες πάρθηκαν με τον ίδιο τρόπο και τις ίδιες ρυθμίσεις και σε όλες χρησιμοποιήθηκε κλίμακα του 1 mm.



Εικόνα 19. Φωτογραφία από το στερεοσκόπιο του δεξιού μηριαίου του επίμουσ 57.

Υπολογισμός των τάσεων που δημιουργούνται στο οστό κατά την κάμψη

Όπως αναφέρθηκε με τη χρήση του στερεοσκοπίου πάρθηκαν φωτογραφίες των οστών ως προς την διατομή τους. Οι φωτογραφίες των δοκιμίων επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα AutoCAD. Στο πρόγραμμα έγινε ο σχεδιασμός της εσωτερικής και της εξωτερικής περιμέτρου στη διατομή του οστού καθώς και του άξονα φόρτισης. Από την επεξεργασία των φωτογραφιών υπολογίστηκαν το εμβαδό διατομής, το γεωμετρικό κέντρο της διατομής και η εκκεντρότητα του άξονα φόρτισης, το μέσο πάχος του φλοιώδους οστού και η περιοχή που περιλείεται από τη διάμεση γραμμή. Κατόπιν, εισήχθη ένα σύστημα αναφοράς x_c - y_c με τον y_c -άξονα να είναι παράλληλος με τη γραμμή φόρτισης. Στη συνέχεια, προσδιορίστηκαν ο ταυστής των επιφανειακών ροπών δευτέρας τάξης (δηλ., οι ποσότητες $I_{x_c x_c}$, $I_{y_c y_c}$, $I_{x_c y_c}$) και οι κύριες επιφανειακές ροπές δευτέρας τάξης της διατομής (δηλ., $I_{x_{pp}}$ = I_{min} , $I_{y_{pp}}$ = I_{max}) μαζί με τις κατευθύνσεις τους.

Βάσει των ανωτέρω δεδομένων, υπολογίστηκαν οι ροπές κάμψης περίξ των κυρίων αξόνων (Eqs. (1)) και οι αντίστοιχες (παρασιτικές) ροπές στρέψης (Eq. (2)).

$$M_y = \frac{P L}{4}, M_x = \frac{P L}{4} \quad (1)$$

$$M_{torsional} = P e \quad (2)$$

Υποθέτοντας τη γραμμική απόκριση των οστών και υιοθετώντας την τεχνική θεωρία κάμψης των Bernoulli-Euler προσδιορίστηκε η ουδέτερη γραμμή (Εξίσωση 3).

Τέλος, υπολογίστηκε η μέγιστη ορθή (εφελκυστική) τάση στο κρίσιμο σημείο της διατομής, δηλαδή στο σημείο το οποίο απέχει περισσότερο από την ουδέτερη γραμμή, μαζί με την αντίστοιχη (παρασιτική) διατμητική τάση (Εξισώσεις 4, 5) όπου x_k και y_k είναι οι συντεταγμένες του κρίσιμου σημείου. Όσον αφορά τις τάσεις που υπολογίζονται από την εξίσωση (5), διευκρινίζεται ότι προκαλούνται από την παρασιτική ροπή στρέψης, η οποία αναπόφευκτα αναπτύσσεται από την εκκεντρότητα του άξονα φόρτισης σε σχέση με το γεωμετρικό κέντρο της διατομής. Οι τάσεις διάτμησης λόγω της διατμητικής δύναμης αγνοήθηκαν, δεδομένου ότι οι περιορισμοί της τεχνικής θεωρίας κάμψης σχετικά με το λόγο του μήκους ως προς το ύψος πληρούνται σίγουρα από τα δείγματα του παρόντος πειραματικού πρωτοκόλλου.

$$S_{bending} = 0 \text{ } \square \pm \frac{M_x}{I_{x_p x_p}} y \square \frac{M_y}{I_{y_p y_p}} x = 0 \quad (3)$$

$$S_{bending} = 0 \text{ } \square \pm \frac{M_x}{I_{x_p x_p}} y_k \square \frac{M_y}{I_{y_p y_p}} x_k = 0 \quad (4)$$

$$t_{torsional} = \frac{M_{torsional}}{2A_m t} \quad (5)$$

Στατιστική ανάλυση

Οι τιμές των συνεχών μεταβλητών παρουσιάζονται χρησιμοποιώντας τις μέσες τιμές και τις τυπικές αποκλίσεις. Στις κατηγορικές μεταβλητές χρησιμοποιούμε τις συχνότητες (v) και τα αντίστοιχα ποσοστά (%).

Ο έλεγχος της κανονικότητας της κατανομής των μετρήσεων έγινε με τη χρήση του Kolmogorov-Smirnov test.

Χρησιμοποιήσαμε το μικτό μοντέλο της ανάλυσης διακύμανσης κατά 2 παράγοντες, την παρέμβαση (Control – OVX – OVX + CMG) και τον χρόνο πριν την παρέμβαση - 3 μήνες – 6 μήνες) για τον έλεγχο της αλληλεπίδρασης των 2 παραγόντων .

Για την διαχρονική σύγκριση των μεταβλητών ανά ομάδα (πριν την παρέμβαση -3 μήνες - 6 μήνες) χρησιμοποιήσαμε το μοντέλο ανάλυσης διακύμανσης κατά ένα παράγοντα με επαναληπτικές μετρήσεις και το τεστ Bonferroni για τις συγκρίσεις κατά ζεύγη.

Οι συγκρίσεις των δεικτών οστικής πυκνότητας σε κάθε χρονική εκτίμηση, του σωματικού βάρους σε κάθε χρονική εκτίμηση και των βαρών των οργάνων ανάμεσα στις ομάδες πραγματοποιήθηκε

χρησιμοποιώντας το μοντέλο της ανάλυσης διακύμανσης κατά ένα παράγοντα και οι συγκρίσεις κατά ζεύγη έγιναν με το Bonferroni test.

Για την ανάλυση των διαφορών που υπάρχουν ανάμεσα στις ομάδες διαχρονικά, υπολογίστηκε η ποσοστιαία μεταβολή των μεταβλητών από την κατάσταση πριν την παρέμβαση σε κάθε χρονική επίμηση.

Οι συγκρίσεις των ποσοστιαίων αυτών μεταβολών των μεταβλητών ανάμεσα στις ομάδες πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το μοντέλο της ανάλυσης διακύμανσης κατά ένα παράγοντα και οι συγκρίσεις κατά ζεύγη έγιναν με το Bonferroni test. Σε περίπτωση που δεν ικανοποιούνταν η προϋπόθεση της κανονικής κατανομής των δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν τα μη παραμετρικά τεστ Kruskal-Wallis και Mann-Whitney test .

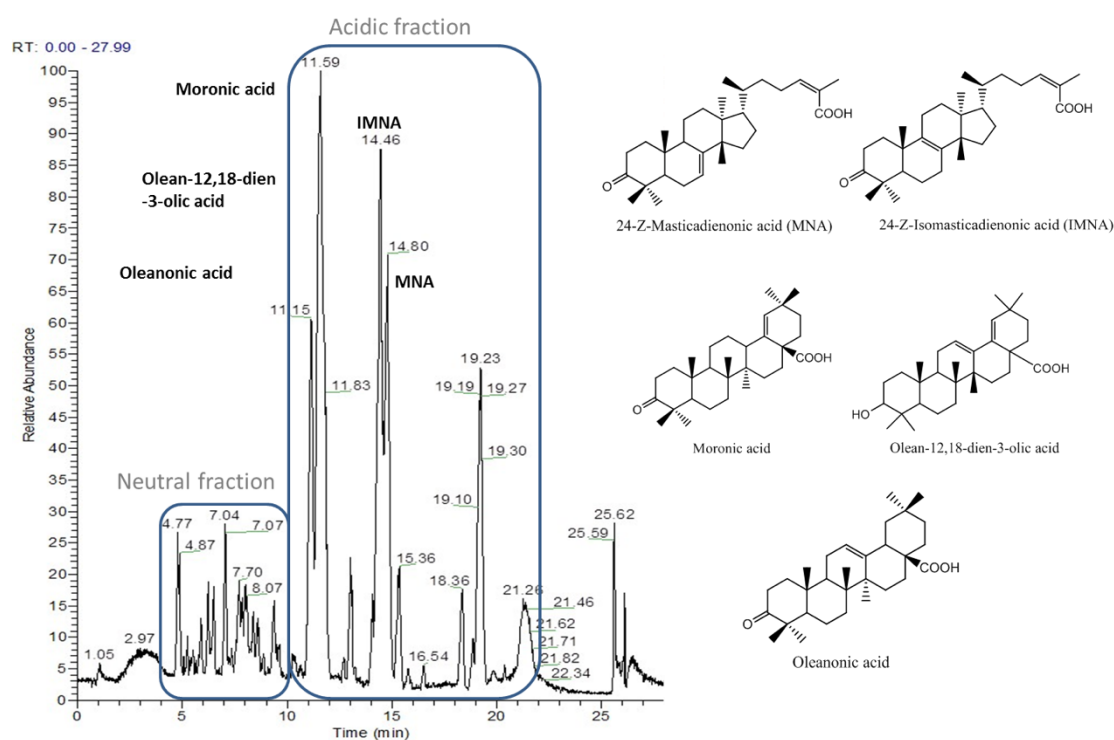
Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το στατιστικό SPSS nr 21.00 (IBM Corporation, Somers, NY, USA). Όλα τα τεστ είναι διπλής κατεύθυνσης (two-sided). Η τιμή p -value < 0.05 καθορίστηκε σαν επίπεδο στατιστικά σημαντικής διαφοράς, επίσης θα καταγραφούν και οι οριακές στατιστικά σημαντικές διαφορές όπου υπάρχουν ($0.05 < p < 0.1$)

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αποτελέσματα

Ανάλυση Μαστίχας Χίου

Τα συστατικά της Μαστίχας Χίου κατηγοριοποιούνται σε τέσσερις κύριες ομάδες. Συγκεκριμένα, θα μπορούσαν να χωριστούν σε όξινο κλάσμα (τριτερπενικά οξέα) το οποίο αποτελεί περίπου το 38%, ουδέτερο κλάσμα (άλλα τριτερπένια) περίπου το 27%, poly- β -myrcene (φυσικό πολυμερές) περίπου το 25-30% και άλλες ενώσεις που ανήκουν σε διάφορες χημικές ομάδες. Οι πιο χαρακτηριστικές ενώσεις είναι τα τριτερπενικά οξέα, το μαστιχαδιενικό και το ισομαστιχαδιενικό (MNA και IMNA, αντίστοιχα). Στην εικόνα 20 παρουσιάζεται το χρωματογράφημα της Μαστίχας Χίου που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη, στο οποίο τα MNA και IMNA επισημαίνονται μαζί με άλλα τριτερπενικά οξέα όπως το μορονικό, το ολεανονικό οξύ και το olean-12,18-dien-3-olic acid.



Εικόνα 20. Πλήρες χρωταμογράφημα UPLC-ESI(-)-HRMS της Μαστίχας Χίου η οποία χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη, στο οποίο φαίνονται οι κορυφές και οι δομές των κύριων τριτερπενικών οξέων.

Σωματικά βάρη επιμύων

Η εμπλουτισμένη τροφή με μαστίχα Χίου δεν προκάλεσε καμία ανεπιθύμητη ενέργεια στα ζώα που χορηγήθηκε. Η κατανάλωση νερού και τροφής δεν διέφερε μεταξύ των τριών ομάδων, Control, OVX και OVX+CMG. Στην έναρξη της πειραματικής διαδικασίας δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στο σωματικό βάρος των τριών ομάδων (μέσο σωματικό βάρος σε γραμμάρια \pm μονάδες σταθερής απόκλισης: Control: 292.50 ± 21.36 , OVX: 297.70 ± 30.19 , OVX+CMG: 278.33 ± 15.62) (Πίνακας 5). Στο τέλος της μελέτης η σύγκριση των σωματικών βαρών των επιμύων δεν ανέδειξε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων OVX+CMG και Control, ενώ το βάρος της ομάδας OVX ήταν σημαντικά στατιστικά μεγαλύτερο της ομάδας Control ($p < 0.05$). Παρόμοιες διαφορές παρατηρήθηκαν και στο ενδοπεριτοναϊκό λίπος/σωματικό βάρος (%) και των τριών ομάδων (Πίνακας 5).

Πίνακας 5. Σωματικό βάρος των επιμύων.

| | baseline | 4 ^η εβδομάδα | 8 ^η εβδομάδα | 12 ^η εβδομάδα | 16 ^η εβδομάδα | 20 ^η εβδομάδα | 24 ^η εβδομάδα |
|------------------|--------------------|------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Control | 292.50 ± 21.36 | 293.60 ± 23.56 | 304.00 ± 28.59 | 317.00 ± 36.30 | 319.00 ± 29.94 | 323.70 ± 34.27 | 352.90 ± 28.50 |
| OVX | 297.70 ± 30.19 | 335.00 ± 38.71 ^{a, b} | 335.40 ± 39.67 ^{a, b} | 358.40 ± 45.32 ^a | 374.20 ± 51.49 ^a | 377.60 ± 55.04 ^a | 399.00 ± 61.68 ^a |
| OVX + CMG | 278.33 ± 15.62 | 287.33 ± 19.21 | 285.22 ± 13.87 | 325.67 ± 18.23 | 343.22 ± 25.39 | 346.78 ± 26.27 | 362.78 ± 30.83 |
| p-value | 0.136 | 0.002 | 0.004 | 0.038 | 0.011 | 0.023 | 0.062 |

OVX: ωοθηκεκτομή, OVX + CMG: ωοθηκεκτομή + CMG, a: $p < 0.05$ vs Control, b: $p < 0.05$ vs OVX+CMG

Βάρη οργάνων

Μήτρα

Κατά την ευθανασία των επιμύων οι μήτρες των ομάδων OVX και OVX+CMG ήταν ατροφικές, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και από τη στατιστική ανάλυση των βαρών τους. Το μέσο βάρος των ομάδων OVX και OVX+CMG ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερο από αυτό της ομάδας Control, ενώ των ομάδων OVX και OVX+CMG δεν είχε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά (Πίνακας 6).

Ήπαρ

Κατά την ευθανασία και τη συλλογή των δειγμάτων δεν παρατηρήθηκε καμία μορφολογική αλλαγή ή αλλαγή στο χρώμα και στην υφή του ήπατος σε κανέναν από τους επίμους της πειραματικής διαδικασίας.

Το μέσο βάρος του ήπατος της ομάδας OVX+CMG ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με τις ομάδες OVX αλλά όχι από την ομάδα Control (Πίνακας 6).

Αριστερός νεφρός

Το μέσο βάρος του αριστερού νεφρού της ομάδας Control ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με τις ομάδες OVX και OVX+CMG. Η διαφορά του μέσου βάρους του αριστερού νεφρού μεταξύ των ομάδων OVX και OVX+CMG δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Πίνακας 6).

Εγκέφαλος

Το μέσο βάρος του εγκεφάλου της ομάδας OVX ήταν στατιστικά μεγαλύτερο από των ομάδων OVX+CMG και Control, ενώ δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων Control και OVX+CMG (Πίνακας 6).

Καρδιά

Το μέσο βάρος της καρδιάς της ομάδας OVX ήταν στατιστικά μεγαλύτερο από της ομάδας OVX+CMG, ενώ δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας Control και των ομάδων OVX+CMG και OVX (Πίνακας 6).

Ενδοπεριτοναϊκό λίπος

Το μέσο βάρος του ενδοπεριτοναϊκού λίπους / BW (%) της ομάδας OVX ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερο από της ομάδας Control. Η διαφορά μεταξύ του μέσου βάρους του ενδοπεριτοναϊκού λίπους / BW (%) μεταξύ των ομάδων OVX και OVX+CMG και των ομάδων Control και OVX+CMG ήταν μη στατιστικά σημαντική (Πίνακας 7).

Γαστροκνήμιος

Το μέσο βάρος του γαστροκνήμιου / BW (%) της ομάδας Control ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερο από της ομάδας OVX. Οι διαφορές στο μέσο βάρος του γαστροκνήμιου / BW (%) μεταξύ των ομάδων OVX και OVX+CMG και μεταξύ των ομάδων Control και OVX+CMG δεν ήταν στατιστικά σημαντικές (Πίνακας 7).

Πίνακας 5. Βάρη οργάνων στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας.

| | Control | OVX | OVX+CMG | p-value |
|----------------|--------------|--------------------------|---------------------------|---------|
| Αριστερό Νεφρό | 1.279±0.153 | 1.057±0.080 ^d | 0.998±0.090 ^d | <0.005 |
| Μήτρα | 0.573±0.107 | 0.197±0.054 ^d | 0.152±0.028 ^d | < 0.005 |
| Ήπαρ | 10.907±1.472 | 9.168±1.231 ^e | 11.890±1.441 ^f | 0.001 |
| Εγκέφαλος | 1.947±0.068 | 2.072±0.087 ^b | 1.930±0.061 ^c | 0.001 |
| Καρδιά | 0.833±0.134 | 0.936±0.098 | 0.765±0.111 ^a | 0.015 |

OVX: ωοθηκτομή, OVX + CMG: ωοθηκτομή + CMG, a: p=0.013 vs OVX, b: p=0.003 vs Control, c: p=0.001 vs OVX, d: p <0.005 vs control, e: p<0,05 vs Control, f: p<0,005 vs OVX

Πίνακας 6. Βάρη οργάνων / BW (%) στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας.

| | Control | OVX | OVX+CMG | p-value |
|-----------------------------|-------------|--------------|-------------|---------|
| Ενδοπεριτοναϊκό λίπος/BW(%) | 6.542±0.646 | 9.281±2.666* | 7.730±1.285 | 0.007 |
| Γαστρονήμιος/BW(%) | 0.506±0.031 | 0.414±0.072* | 0.466±0.056 | 0.006 |

OVX: ωοθηκτομή, OVX + CMG: ωοθηκτομή + CMG, * p<0,005 vs Control.

Μέτρηση οστικής πυκνότητας

Απόλυτες τιμές οστικής πυκνότητας

Η οστική πυκνότητα των επιμύων μετρήθηκε αμέσως μετά την ωοθηκτομή και κατόπιν στους τρεις και έξι μήνες. Οι τιμές υπολογίστηκαν σε γραμμάρια ανά τετραγωνικό εκατοστό (g/cm²). Κατά την έναρξη του πειράματος οι επίμυες χωρίστηκαν τυχαία στις τρεις ομάδες. Οι απόλυτες τιμές της οστικής πυκνότητας της ολικής κνήμης, της εγγύς μετάφυσης και του 6^{ου} οσφυϊκού σπονδύλου των τριών ομάδων δεν παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική απόκλιση.

Αριστερή κνήμη

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της BMD της αριστερής κνήμης παρουσιάζονται στον Πίνακα 8. Στην αρχή της πειραματικής διαδικασίας δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών ομάδων. Η BMD της ομάδας Control αυξήθηκε κατά το πρώτο τρίμηνο της πειραματικής διαδικασίας (p=0.024) και παρέμεινε σχεδόν σταθερή το επόμενο τρίμηνο. Η BMD των ομάδων OVX και OVX+CMG μειώθηκε στατιστικά σημαντικά τόσο στους τρεις όσο και στους έξι μήνες μετά την ωοθηκτομή (p< 0.001). Η BMD της ομάδας OVX+CMG ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη από την ομάδα OVX τόσο στους τρεις (p< 0.001) όσο και στους έξι μήνες (p< 0.001).

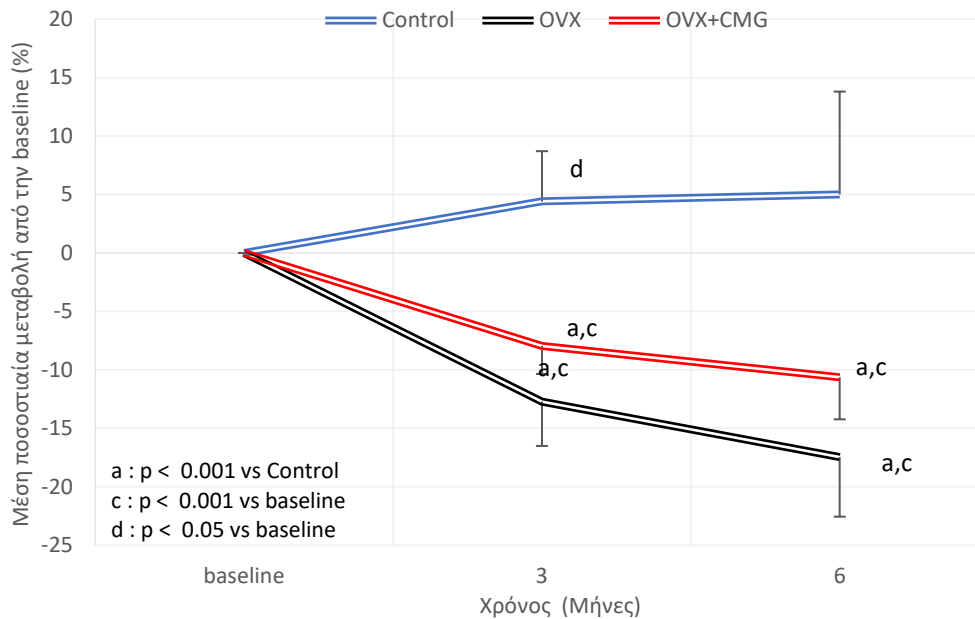
Έγινε υπολογισμός της ποσοστιαίας μεταβολής της BMD από την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας (μέση τιμή \pm SD %) για τις τρεις ομάδες και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 8 και την Εικόνα 21. Τρεις μήνες μετά την ωθηκτομή υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας Control (4.41 ± 4.51 %) και της ομάδας OVX (-12.71 ± 5.08 %, $p < 0.001$) και μεταξύ της ομάδας Control και της ομάδας OVX + CMG (-7.95 ± 6.82 %, $p < 0.001$). Στους έξι μήνες μετά την ωθηκτομή η ποσοστιαία μεταβολή της ομάδας Control (5.01 ± 8.03 %) ήταν στατιστικά σημαντική σε σύγκριση με την ομάδα OVX (-17.46 ± 3.85 %, $p < 0.001$) καθώς και με την ομάδα OVX + CMG (-10.63 ± 6.75 %, $p < 0.001$). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων OVX + CMG και OVX τόσο στους τρεις όσο και στους έξι μήνες ($p = 0.31$ και $p = 0.19$, αντίστοιχα).

Πίνακας 7. Σύγκριση των τιμών BMD της κνήμης μεταξύ των ομάδων κατά την περίοδο των 6 μηνών.

Σύγκριση των απόλυτων τιμών (g/cm^2) και των ποσοστιαίων μεταβολών της BMD της κνήμης μεταξύ των ομάδων στην αρχή της πειραματικής διαδικασίας (πριν την ωθηκτομή), 3 και 6 μήνες μετά την ωθηκτομή.

| Group | Απόλυτες Τιμές (mean \pm SD) | | | p-value μέσα στην ομάδα | % αλλαγές (mean \pm SD) | |
|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------------|---------------------------|---------------------|
| | Baseline | 3 μήνες | 6 μήνες | | baseline-3 μήνες | baseline-6 μήνες |
| Control | 0.243 ± 0.012 | 0.254 ± 0.009^d | 0.255 ± 0.013 | 0.047 | 4.41 ± 4.15 | 5.01 ± 8.03 |
| OVX | 0.248 ± 0.010 | $0.217 \pm 0.015^{a,c}$ | $0.205 \pm 0.007^{a,c}$ | < 0.001 | -12.71 ± 5.08^a | -17.46 ± 3.85^a |
| OVX + CMG | 0.252 ± 0.018 | $0.231 \pm 0.009^{a,b,c}$ | $0.224 \pm 0.007^{a,b,c}$ | < 0.001 | -7.95 ± 6.82^a | -10.63 ± 6.75^a |
| p-value μεταξύ των ομάδων | 0.390 | < 0.001 | < 0.001 | | < 0.0005 | < 0.0005 |

BMD: Οστική πυκνότητα, OVX: ωθηκτομή, OVX + CMG: ωθηκτομή + CMG, a: $p < 0.001$ vs Control, b: $p < 0.001$ vs OVX, c: $p < 0.001$ vs baseline, d: $p = 0.024$ vs baseline.



Εικόνα 21. Διάγραμμα της ποσοστιαίας μεταβολής της BMD (mean ± SD %) της αριστερής κνήμης των τριών ομάδων.

Εγγύς μετάφυση

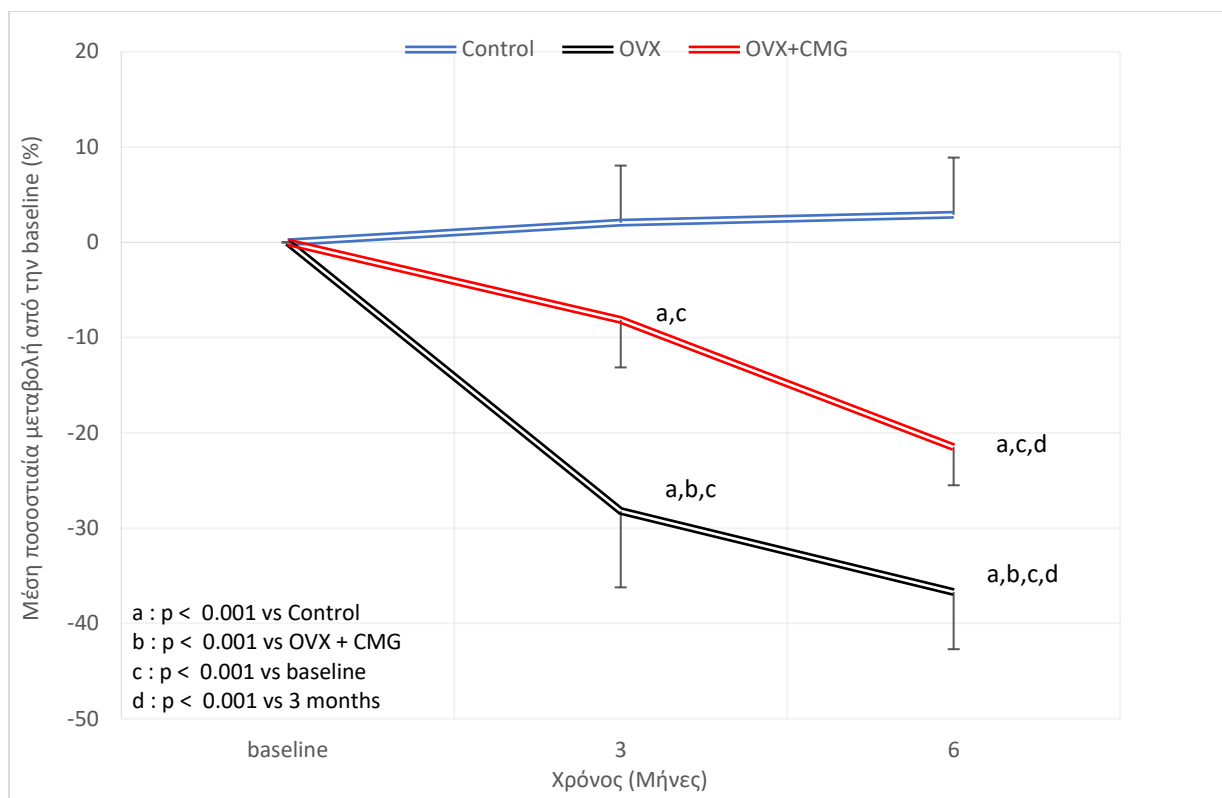
Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της BMD της εγγύς μετάφυσης της αριστερής κνήμης παρουσιάζονται στον Πίνακα 9. Κατά τη διάρκεια των έξι μηνών δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά της BMD της ομάδας Control. Στην ομάδα OVX παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της BMD μετά από τρεις ($p < 0.001$ vs baseline) και έξι μήνες ($p < 0.001$ vs τρεις μήνες). Παρόμοια μεταβολή παρατηρήθηκε και στην ομάδα OVX + CMG ($p < 0.001$ vs baseline). Η BMD της ομάδας OVX + CMG ήταν στατιστικά σημαντική υψηλότερη της ομάδας OVX και στους τρεις ($p < 0.001$) και στους έξι μήνες ($p < 0.001$).

Η ποσοστιαία μεταβολή της BMD της εγγύς μετάφυσης της αριστερής κνήμης από την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας (μέση τιμή ± SD %) για τις τρεις ομάδες παρουσιάζεται στον Πίνακα 9 και την Εικόνα 22. Τρεις μήνες μετά την ωθηκείτομη υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας Control (2.05 ± 5.98 %) και της ομάδας OVX (-28.21 ± 8.43 %, $p < 0.001$) και μεταξύ της ομάδας Control και της ομάδας OVX + CMG (-8.13 ± 4.49 %, $p < 0.001$) αλλά και μεταξύ των ομάδων OVX και OVX + CMG ($p < 0.001$). Στους έξι μήνες μετά την ωθηκείτομη η ποσοστιαία μεταβολή της ομάδας Control (2.89 ± 5.565) ήταν στατιστικά σημαντική σε σύγκριση με την ομάδα OVX (-36.73 ± 5.95 , $p < 0.001$) καθώς και με την ομάδα OVX+CMG (-21.52 ± 3.99 , $p < 0.001$). Αλλά και μεταξύ των ομάδων OVX+CMG και OVX ($p < 0.001$).

Πίνακας 8. Σύγκριση των τιμών BMD της εγγύς μετάφυση της αριστερής κνήμης μεταξύ των ομάδων κατά την περίοδο των 6 μηνών. Σύγκριση των απόλυτων τιμών (g/cm²) και των ποσοστιαίων μεταβολών της BMD της εγγύς μετάφυση της αριστερής κνήμης μεταξύ των ομάδων στην αρχή της πειραματικής διαδικασίας (πριν την ωοθηκεκτομή), 3 και 6 μήνες μετά την ωοθηκεκτομή.

| Ομάδα | Απόλυτες Τιμές (mean ± SD) | | | p-value μέσα στην ομάδα | % αλλαγές (mean ± SD) | |
|---------------------------|----------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| | Baseline | 3 μήνες | 6 μήνες | | baseline-3 μήνες | baseline-6 μήνες |
| Control | 0.413 ± 0.022 | 0.421 ± 0.021 | 0.425 ± 0.027 | 0.328 | 2.05 ± 5.98 | 2.89 ± 5.56 |
| OVX | 0.405 ± 0.024 | 0.290 ± 0.026 ^{a, c} | 0.256 ± 0.021 ^{a, c, d} | < 0.001 | -28.21 ± 8.43 ^a | -36.73 ± 5.95 ^a |
| OVX + CMG | 0.413 ± 0.019 | 0.379 ± 0.021 ^{a, b, c} | 0.323 ± 0.017 ^{a, b, c, d} | < 0.001 | -8.13 ± 4.94 ^{a, b} | -21.52 ± 3.99 ^{a, b} |
| p-value μεταξύ των ομάδων | 0.705 | < 0.001 | < 0.001 | | < 0.0005 | < 0.0005 |

BMD: Οστική πυκνότητα, OVX: ωοθηκεκτομή, OVX + CMG: ωοθηκεκτομή + CMG, a: p < 0.001 vs Control, b: p < 0.001 vs OVX, c: p < 0.001 vs baseline, d: p < 0.001 vs 3 μήνες.



Εικόνα 22. Διάγραμμα της ποσοστιαίας μεταβολής της BMD (mean \pm SD %) της εγγύς μετάφυσης της αριστερής κνήμης των τριών ομάδων.

6^{ος} οσφυϊκός σπόνδυλος

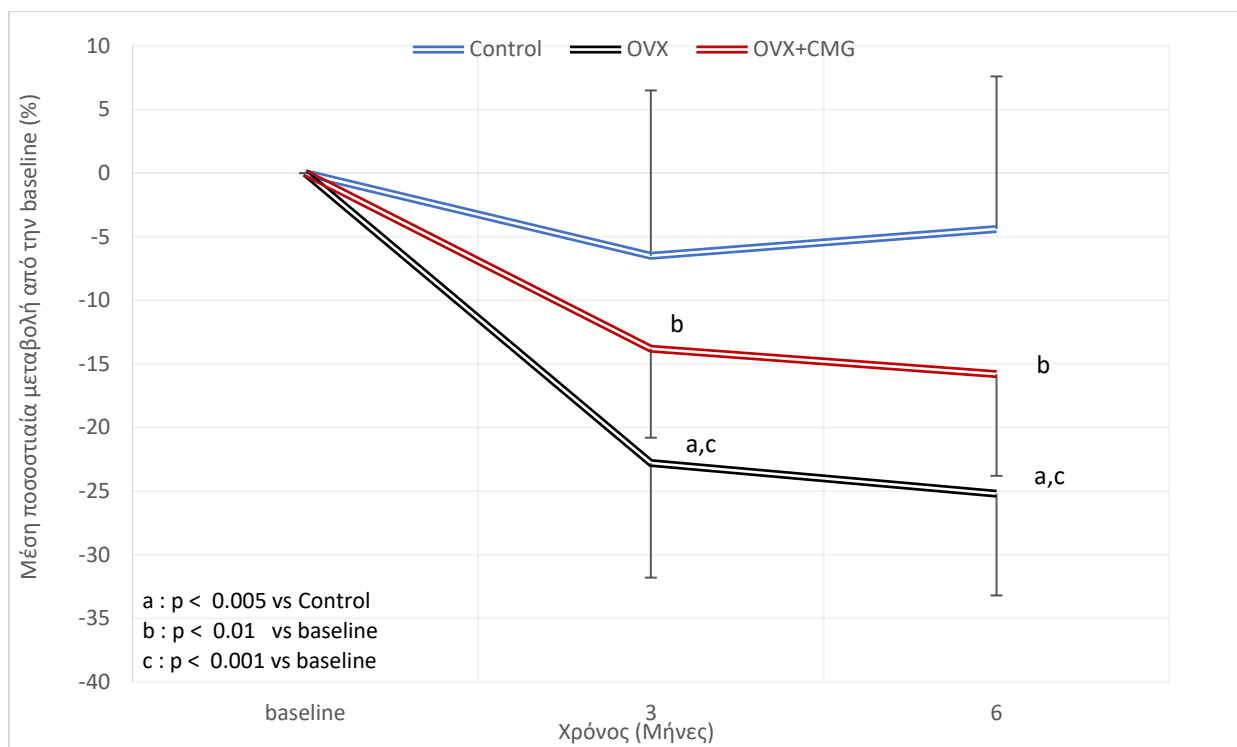
Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της BMD του 6^{ου} οσφυϊκού σπονδύλου παρουσιάζονται στον Πίνακα 10. Στην αρχή της πειραματικής διαδικασίας δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στην BMD των τριών ομάδων. Η BMD της ομάδας Control δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά κατά τους έξι μήνες ($p < 0.238$). Η BMD της ομάδας OVX μειώθηκε στατιστικά σημαντικά κατά τους τρεις πρώτους μήνες ($p < 0.005$ vs baseline) αλλά δεν είχε στατιστικά σημαντική διαφορά κατά τους επόμενους τρεις μήνες ($p < 0.681$ vs three months). Η BMD της ομάδας OVX + CMG, επίσης, μειώθηκε στατιστικά σημαντικά στο πρώτο τρίμηνο ($p < 0.05$ vs baseline) αλλά δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική αλλαγή στο δεύτερο τρίμηνο ($p = 1.000$ vs three months). Στους τρεις μήνες, η BMD της ομάδας OVX + CMG ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη από την BMD της ομάδας OVX ($p < 0.005$), ενώ δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά με την ομάδα Control ($p = 1.000$). Στους έξι μήνες, η BMD της ομάδας OVX + CMG ήταν στατιστικά σημαντική υψηλότερη από την BMD της ομάδας OVX ($p < 0.05$), χωρίς να παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά με την ομάδα Control ($p = 0.599$).

Η ποσοστιαία μεταβολή της BMD του 6^{ου} οσφυϊκού σπονδύλου από την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας (μέση τιμή \pm SD %) και για τις τρεις ομάδες παρουσιάζονται στον Πίνακα 10 και την Εικόνα 23. Τρεις μήνες μετά την ωθηκτομή υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας Control (-6.48 \pm 13.18) και OVX (-22.75 \pm 9.22, $p < 0.05$) αλλά όχι μεταξύ των ομάδων Control και OVX+CMG (-13.79 \pm 7.32, $p = 0.403$). Έξι μήνες μετά την ωθηκτομή η ποσοστιαία μεταβολή της ομάδας Control (-4.36 \pm 12.62) ήταν στατιστικά σημαντική υψηλότερη της ομάδας OVX (-25.14 \pm 8.65, $p < 0.005$) ενώ δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά με την ομάδα OVX+CMG (-15.81 \pm 10.35, $p = 0.083$). Μεταξύ των ομάδων OVX + CMG και OVX δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στους τρεις και στους έξι μήνες ($p = 0.209$ και $p = 0.204$ αντίστοιχα).

Πίνακας 9. Σύγκριση των τιμών BMD του 6^{ου} οσφυϊκού σπονδύλου μεταξύ των ομάδων κατά την περίοδο των 6 μηνών. Σύγκριση των απόλυτων τιμών (g/cm^2) και των ποσοστιαίων μεταβολών της BMD του 6^{ου} οσφυϊκού σπονδύλου μεταξύ των ομάδων στην αρχή της πειραματικής διαδικασίας (πριν την ωθηκτομή), 3 και 6 μήνες μετά την ωθηκτομή.

| Group | Απόλυτες Τιμές (mean \pm SD) | | | p-value μέσα στην ομάδα | % αλλαγές (mean \pm SD) | |
|---------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | Baseline | 3 μήνες | 6 μήνες | | baseline-3 μήνες | baseline-6 μήνες |
| Control | 0.385 \pm 0.039 | 0.358 \pm 0.042 | 0.368 \pm 0.056 | 0.238 | -6.48 \pm 13.18 | -4.36 \pm 12.62 |
| OVX | 0.382 \pm 0.047 | 0.292 \pm 0.023 ^{c, f} | 0.283 \pm 0.021 ^{a, f} | < 0.001 | -22.75 \pm 9.22 ^a | -25.14 \pm 8.65 ^c |
| OVX + CMG | 0.410 \pm 0.032 | 0.352 \pm 0.029 ^{d, e} | 0.3345 \pm 0.047 ^{b, e} | < 0.001 | -13.79 \pm 7.32 | -15.81 \pm 10.35 |
| p-value μεταξύ των ομάδων | 0.284 | < 0.001 | < 0.001 | | 0.006 | 0.001 |

BMD: Οστική πυκνότητα, OVX: ωθηκτομή, OVX+ CMG: ωθηκτομή + CMG, a: $p < 0.05$ vs Control, b: $p < 0.05$ vs OVX, c: $p < 0.005$ vs Control, d: $p < 0.005$ vs OVX, e: $p < 0.05$ vs baseline, f: $p < 0.005$ vs baseline



Εικόνα 23. Διάγραμμα της ποσοστιαίας μεταβολής της BMD (mean \pm SD %) του τελευταίου οσφυϊκού σπονδύλου των τριών ομάδων.

Μηχανική Αντοχή Οστών

Οι εμβιομηχανικές παράμετροι που υπολογίστηκαν από τα πειράματα κάμψης τριών σημείων για το δεξιό οστό ήταν η τάση von Mises, η τάση κάμψης, η τάση στρέψης, το εμβαδόν της διατομής και το πάχος (Πίνακας 11). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών ομάδων για τις τάσεις που εκτιμήθηκαν καθώς και το εμβαδόν της διατομής. Αντίθετα, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων για το πάχος του δεξιού μηριαίου. Το πάχος της ομάδας Control ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερο από την ομάδα OVX.

Πίνακας 10. Εμβιομηχανικές παράμετροι δεξιού μηριαίου οστού.

| | Control | OVX | OVX + CMG | p-value |
|---|--------------------|--------------------|--------------------|---------|
| von Mises stress (MPa) | 191,92 \pm 35,03 | 179,90 \pm 34,75 | 193,40 \pm 19,25 | 0,597 |
| Bending stress (MPa) | 191,81 \pm 34,97 | 179,68 \pm 34,78 | 193,19 \pm 19,29 | 0,594 |
| Torsional stress (MPa) | 3,13 \pm 2,37 | 3,95 \pm 3,26 | 4,78 \pm 2,14 | 0,407 |
| Cross-sectional area (mm ²) | 5,02 \pm 0,45 | 5,07 \pm 0,23 | 5,09 \pm 0,45 | 0,923 |
| Πάχος (mm) | 0,67 \pm 0,09 | 0,58 \pm 0,05* | 0,61 \pm 0,05 | 0,016 |

* p = 0.015 vs Control.

Κυτταρολογική Αξιολόγηση Κολπικών Επιχρισμάτων

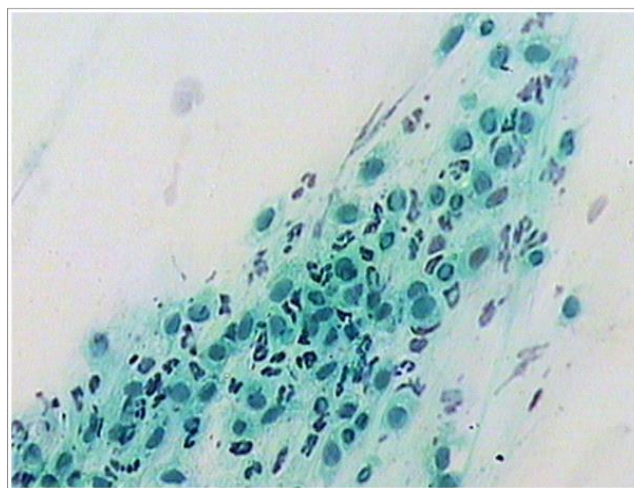
Έγινε εκτίμηση της δράσης της Μαστίχας Χίου στην ωρίμανση του επιθηλίου της μήτρας ως κριτήριο της οιστρογονικής δράσης. Η κυτταρολογική εξέταση των κολπικών επιχρισμάτων πραγματοποιήθηκε για 5 διαδοχικές μέρες ώστε να γίνει εκτίμηση του οιστρογονικού κύκλου. Ως ένδειξη της οιστρογονικής δράσης υπολογίστηκε ο Δείκτης κερατινοποιημένων κυττάρων (Cornified Index, CI).

Η κυτταρολογική εξέταση των κολπικών επιχρισμάτων της ομάδας Control (Πίνακας 12) έδειξε κανονικό μη συγχρονισμένο κύκλο σε όλους τους επίμους με τις αναμενόμενες φάσεις του πρόοιστρου (Εικόνα 24), οίστρου (Εικόνα 25), μέτοιστρου με διάρκεια μιας μέρας και του δίοιστρου με διάρκεια 2 ημερών (Εικόνα 26).

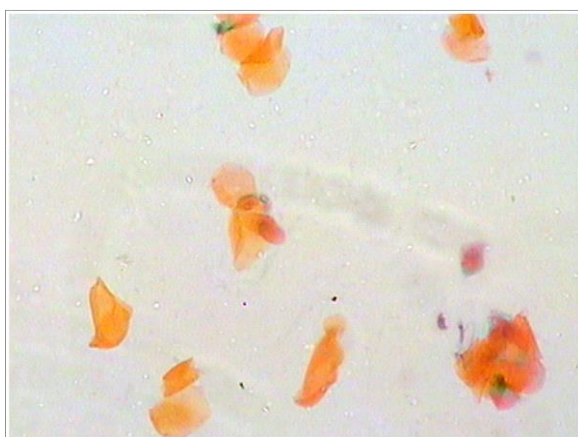
Πίνακας 11. Αξιολόγηση των κολπικών επιχρισμάτων της ομάδας Control.

| Επίμους | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 | C7 | C8 | C9 | C10 |
|----------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|
| Ημέρα | | | | | | | | | | |
| 1 ^η | Δ | Δ | ○ | Μ | ○ | Π | ○ | Μ | Π | Μ |
| 2 ^η | Δ | Π | Μ | Δ | Μ | ○ | Μ | Δ | ○ | Δ |
| 3 ^η | Π | ○ | Δ | Δ | Δ | Μ | Δ | Δ | Μ | Δ |
| 4 ^η | ○ | Μ | Δ | Π | Δ | Δ | Δ | Π | Δ | Π |
| 5 ^η | Μ | Δ | Π | ○ | Π | Δ | Π | ○ | Δ | ○ |

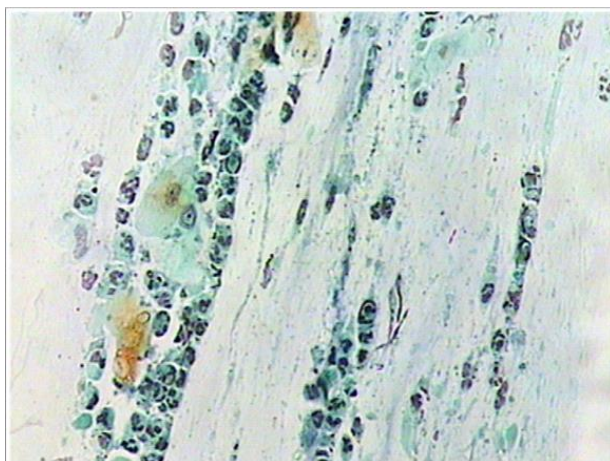
○: οίστρος, Π: πρόοιστρος, Μ: μέτοιστρος, Δ: δίοιστρος. C1-10: ομάδα Control 1-10.



Εικόνα 24. Χρώση Παπανικολάου: κυριαρχούν μικρά εμπύρρηνα επιθηλιακά κύτταρα (Πρόοιστρος).



Εικόνα 25. Χρώση Παπανικολάου: κυριαρχούν απύρηνα κερατινοποιημένα επιθηλιακά κύτταρα (Οίστρος)



Εικόνα 26. Χρώση Παπανικολάου: κυριαρχούν ουδετερόφιλα κύτταρα (Δίοιστρος).

Ένας δείκτης της οιστρογονικής δράσης είναι τα υψηλά ποσοστά των κερατινοποιημένων κυττάρων ($\geq 50\%$), τα οποία βρέθηκαν στην ομάδα Control ενώ απουσίαζαν από τις ομάδες OVX+CMG και OVX. Η χορήγηση της Μαστίχας Χίου δεν είχε καμία δράση στον δείκτη κερατινοποιημένων κυττάρων, όπως εκτιμήθηκε από την κυτταρολογική εξέταση.

| | CI < 50% | CI $\geq 50\%$ |
|---------|----------|----------------|
| Control | 0 | 10 |
| OVX | 10 | 0 |
| OVX+CMG | 10 | 0 |

Πίνακας 12. Δείκτης κερατινοποιημένων κυττάρων, CI

ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συζήτηση

Ο επιπολασμός της οστεοπόρωσης στην Ευρωπαϊκή Ένωση αναμένεται να αυξηθεί από 28 εκατομμύρια το 2010 σε 34 εκατομμύρια το 2025, σύμφωνα με τα κριτήρια που ορίζει ο ΠΟΥ (Hernlund et al., 2013). Παρόλο που η οστεοπόρωση εμφανίζεται με μεγάλη συχνότητα και μπορεί να μειώσει σημαντικά την ποιότητα ζωής των ασθενών, παρατηρείται συχνά μη συμμόρφωση τους με τη θεραπευτική αγωγή γεγονός που οφείλεται εν μέρη στις παρενέργειες των φαρμάκων. Τα τελευταία χρόνια πολλές γυναίκες στρέφονται σε εναλλακτικές μεθόδους όπως είναι η γυμναστική και τα θεραπευτικά προϊόντα φυτικής προέλευσης. Για το λόγο αυτό είναι αναγκαία η μελέτη των προϊόντων φυτικής προέλευσης που μπορούν να βοηθήσουν στη βελτίωση της οστικής πυκνότητας και της αντοχής των οστών.

Η Μαστίχα Χίου έχει γίνει αντικείμενο μελέτης πολλών ερευνητικών ομάδων για τις δράσεις της κυρίως στο γαστρεντερικό σύστημα όσο και σε άλλα συστήματα. Μέχρι στιγμής, όμως, δεν έχει μελετηθεί η δράση της στη μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση. Στην παρούσα έρευνα, μελετήθηκε η επίδραση της Μαστίχας Χίου στο πρότυπο του ωθηκεκτομημένου επίμυος. Το πρότυπο αυτό χρησιμοποιείται εκτεταμένα για την ανάδειξη της προστατευτικής δράσης διαφόρων παραγόντων και προϊόντων φυτικής προέλευσης στο μεταβολισμό των οστών. Πολλά ερευνητικά εργαστήρια χρησιμοποιούν το πρότυπο αυτό για την εκτίμηση της αντιοστεοπορωτικής δράσης πολλών προϊόντων φυτικής προέλευσης, όπως η γλυκύριζα, τα μύρτιλα και το τσάι.

Η χορήγηση της Μαστίχας Χίου για έξι μήνες, παρόλο που δεν απέτρεψε τη μείωση της BMD της κνήμης σε σύγκριση με την baseline τιμή ($p < 0.001$), περιόρισε σε μεγάλο βαθμό την απώλεια της BMD σε σύγκριση με τους επίμυες που δεν έλαβαν θεραπεία (OVX + CMG: 0.224 ± 0.007 vs OVX: 0.205 ± 0.007 , $p < 0.001$ στους έξι μήνες). Παρόμοια δράση είχε και η χορήγηση εκχυλίσματος *Onobrychis ebenoides* σε ωθηκεκτομημένους επίμυες σε σύγκριση με τους επίμυες που δεν πήραν κάποια θεραπεία (total: 0.225 vs 0.203 $p < 0.0005$) (Dontas et al., 2006). Η χορήγηση μύρτιλων περιόρισε την απώλεια της BMD στους ωθηκεκτομημένους επίμυες όπως δείχνουν οι μετρήσεις στην ολική κνήμη (OVX + blueberry : 0.202 ± 0.003 vs OVX : 0.197 ± 0.002 , $p = 0.0032$) (Devareddy et al., 2008). Το εκχύλισμα *Glycyrrhiza glabra* είχε επίσης προστατευτικό ρόλο μετά από έξι μήνες χορήγησης (Galanis et al., 2019). Σε αντίθεση, η χορήγηση του *Amphimas pterocarpoides* δεν ανέδειξε κάποια προστατευτική δράση στην ολική κνήμη (OVX 0.190 ± 0.007 vs OVX + *A. pterocarpoides* 0.193 ± 0.007 , $p = 1.000$) (Patsaki et al., 2016).

Η χορήγηση της Μαστίχας Χίου είχε παρόμοια αποτελέσματα στην εγγύς μετάφυση της κνήμης με την ολική κνήμη. Η BMD της ομάδας OVX + CMG ήταν στατιστικά σημαντικά μειωμένη μετά από έξι μήνες ($p < 0.001$ vs baseline) αλλά παρόλα αυτά στατιστικά σημαντικά υψηλότερη από την BMD της ομάδας OVX (OVX + CMG: 0.323 ± 0.017 vs OVX: 0.256 ± 0.021 , $p < 0.001$). Η χορήγηση του εκχυλίσματος *O. ebenoides* στους ωοθηκεκτομημένους επίμους αύξησε την BMD της εγγύς μετάφυσης της κνήμης σε σχέση με τους επίμους που δεν έλαβαν θεραπεία (proximal: 0.170 vs 0.142 , $p < 0.0005$) (Dontas et al., 2006). Το εκχύλισμα της *G. glabra* είχε προστατευτική δράση στη BMD της εγγύς μετάφυσης της κνήμης μετά από χορήγηση έξι μηνών (Galanis et al. 2019). Παρόμοια, η χορήγηση του *A. pterocarpoides* για έξι μήνες είχε προστατευτική δράση στην BMD της εγγύς μετάφυσης της κνήμης (OVX 0.224 ± 0.024 vs OVX + *A. pterocarpoides* 0.267 ± 0.017 , $p < 0.001$) (Patsaki et al., 2016).

Η BMD του 6^{ου} οσφυϊκού σπονδύλου της ομάδας OVX + CMG παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση κατά τους τρεις πρώτους μήνες της χορήγησης ($p < 0.05$ vs baseline) αλλά δεν είχε σημαντική διαφορά το δεύτερο τρίμηνο χορήγησης ($p = 1.000$ vs τρεις μήνες). Η σύγκριση της ομάδας OVX + CMG με την ομάδα Control δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά τόσο στους τρεις όσο και στους έξι μήνες ($p = 1.000$, $p = 0.599$, αντίστοιχα). Σε αντίθεση η BMD του 6^{ου} οσφυϊκού σπονδύλου της ομάδας OVX + CMG ήταν στατιστικά υψηλότερη της ομάδας OVX και στους τρεις και στους έξι μήνες της χορήγησης της Μαστίχας Χίου ($p < 0.005$, $p < 0.05$, αντίστοιχα).

Στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στις von Mises, Bending και Torsional τάσεις. Στους ωοθηκεκτομημένους επίμους παρατηρείται ενδοοστική απορρόφηση και λέπτυνση του φλοιού από το μέρος του μυελού οδηγώντας σε αύξηση της μυελικής κοιλότητας (Pan et al., 1995). Παράλληλα, η ωοθηκεκτομή διεγείρει την περιοστική αύξηση του φλοιώδους οστού της διάφυσης των μακρών οστών (Miller et al., 1991). Οι δράσεις αυτές οδηγούν στην αργή μεταβολή της αντοχής του μηριαίου οστού (Jee and Yao, 2001). Σύμφωνα με τους Jee και Yao, οι αλλαγές στις εμβιομηχανικές ιδιότητες των οστών γίνονται ορατές εννέα μήνες μετά την ωοθηκεκτομή (Jee and Yao, 2001). Παρόμοια, η μελέτη της *G. glabra* παρόλο που έδειξε προστατευτική δράση στην οστική πυκνότητα δεν είχε σημαντική δράση στην αντοχή των οστών (Galanis et al., 2019). Σε αντίθεση, η μελέτη του εκχυλίσματος *A. pterocarpoides* έδειξε πως η ομάδα παρέμβασης είχε στατιστικά μεγαλύτερη τάση θραύσης από την ομάδα OVX (Patsaki et al., 2016), ενώ η μελέτη του *Sideritis euboica* έδειξε πως η ομάδα που λάμβανε θεραπεία είχε στατιστικά μεγαλύτερη δύναμη θραύσης από την ομάδα OVX (Dontas et al., 2011). Οι Danielsen et al. έδειξαν πως το πάχος της διάφυσης του μηριαίου μειώθηκε τρεις μήνες μετά την ωοθηκεκτομή (Danielsen et al., 1993). Στη δική μας μελέτη το πάχος του δεξιού μηριαίου της ομάδας OVX + CMG είχε ενδιάμεση τιμή από τις ομάδες Control και OVX.

Μετά το πέρας της πειραματικής διαδικασίας έγινε η επεξεργασία των αποτελεσμάτων των οργάνων που συλλέχθηκαν κατά την ευθανασία. Το βάρος της μήτρας των ομάδων OVX + CMG και OVX ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότερο από την ομάδα Control ενώ μεταξύ τους δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά. Σε παρόμοιες μελέτες παρατηρήθηκε πως το βάρος της μήτρας της ομάδας παρέμβασης δεν διέφερε με εκείνο της ομάδας OVX (Dontas et al., 2006, Devareddy et al., 2008, Patsaki et al., 2016, Wang et al., 2017) με εξαίρεση το εκχύλισμα *G. glabra* στο οποίο το βάρος της μήτρας της ομάδας παρέμβασης είχε ενδιάμεση τιμή από τις ομάδες OVX και ομάδα Control, χωρίς να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά με κάποια από τις δυο τιμές (Galani et al., 2019).

Η απουσία επίδρασης της Μαστίχας Χίου στο βάρος της μήτρας είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της κυτταρολογικής εξέτασης των κολπικών επιχρισμάτων, τα οποία δεν ανέδειξαν κάποια οιστρογονική δράση της Μαστίχας Χίου στο επιθήλιο του κόλπου των επιμύων. Ο δείκτης των κερατοποιημένων κυττάρων είναι ένας αποδεικτός δείκτης της δράσης των οιστρογόνων στο κολπικό επιθήλιο των γυναικών (Wood et al., 1961). Επιπλέον, έχει αναφερθεί πως η έκθεση σε οιστρογονικές ουσίες έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του δείκτη κερατινοποίησης και στα τρωκτικά (Goldman et al., 2007). Στην παρούσα μελέτη, η ομάδα OVX + CMG καθώς και η ομάδα OVX είχαν δείκτη κερατινοποιημένων κυττάρων μικρότερο από 50%, γεγονός που δηλώνει την απουσία οιστρογονικής δράσης.

Το σωματικό βάρος, η μυϊκή κατάσταση και η BMD είναι τρεις παράμετροι άμεσα συνυφασμένοι με την πιθανότητα κατάγματος κατά την εμμηνόπαυση. Η απώλεια βάρους έχει συσχετιστεί με τον αυξημένο ρυθμό απώλειας οστικής μάζας από το ισχίο στις γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση και με την αυξημένη πιθανότητα κατάγματος (Ensrud et al., 2003) ενώ το χαμηλό βάρος είναι ανάμεσα στους παράγοντες κινδύνου οστεοπορωτικών καταγμάτων (Kanis et al., 2020). Επιπρόσθετα, η κοιλιακή παχυσαρκία έχει συσχετιστεί με τον κίνδυνο κατάγματος του ισχίου (Sadeghi et al., 2017). Παράλληλα, ο κίνδυνος πτώσης και κατάγματος αυξάνεται με τη μείωση της μυϊκής μάζας (Wickham et al., 1989).

Στην παρούσα μελέτη, παρατηρήθηκε αύξηση στο βάρος των επιμύων και στις τρεις ομάδες. Η ομάδα OVX + CMG είχε μέσο βάρος ενδιάμεσο των δυο άλλων ομάδων χωρίς να παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά με τις ομάδες αυτές, ενώ οι ομάδες Control και OVX είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά, με την ομάδα Control να παρουσιάζει το μικρότερο μέσο βάρος. Ταυτόχρονα, το μέσο ενδοπεριτοναϊκό λίπος/ BW (%) της ομάδας OVX + CMG είχε μια ενδιάμεση τιμή χωρίς να παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά από τις ομάδες Control και OVX. Το μέσο βάρος του γαστροκνήμιου / BW (%) της ομάδας OVX + CMG δεν είχε καμία διαφορά με την ομάδα Control, ενώ ήταν μεγαλύτερο της ομάδας OVX χωρίς όμως η διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν μια ευνοϊκή δράση της μαστίχας στις τρεις αυτές παραμέτρους. Σε

παρόμοιες μελέτες, το μέσο βάρος των επιμύων των ομάδων παρέμβασης αυξήθηκε αρκετά κατά τη διάρκεια της μελέτης (Dontas et al., 2006, Devareddy et al., 2008, Patsaki et al., 2016) με εξαίρεση τη μελέτη του εκχυλίσματος της *G. glabra* στην οποία δεν υπήρχε διαφορά μεταξύ των τριών ομάδων (Galanis et al., 2019).

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν μια ευνοϊκή δράση της Μαστίχας Χίου στο μυοσκελετικό σύστημα. Η μυϊκή δύναμη στους ανθρώπους είναι άμεσα συνδεδεμένη με τον κίνδυνο πτώσης και κατάγματος (Wickham et al., 1989). Κατά συνέπεια, αυτή η ευεργετική επίδραση της Μαστίχας Χίου στους επίμυς μπορεί να προσφέρει επιπλέον ευνοϊκή επίδραση σε άλλους παράγοντες κινδύνου για κατάγματα που σχετίζονται με τη μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση. Η χορήγηση άλλων φυτικών εκχυλισμάτων δεν προστάτευσε τις ομάδες παρέμβασης από την αύξηση του σωματικού βάρους που σχετίζεται με την ωθηκετομή (Devareddy et al., 2008, Dontas et al., 2006, Patsaki et al., 2016).

Η αυξημένη δράση του Nuclear factor-kappa B (NF-kB) έχει αναδειχθεί από πολλές *in vivo* μελέτες ως η κύρια διαδικασία που προκαλεί μυϊκή ατροφία (Thoma and Lightfoot, 2018). Στην παρούσα μελέτη το μέσο βάρος του γαστροκνήμιου / BW (%) της ομάδας OVX + CMG δεν είχε στατιστικά σημαντική διαφορά από την ομάδα Control το οποίο συνάδει με την έρευνα των He et al., οι οποίοι έδειξαν ότι η Μαστίχα Χίου αναστέλλει τη δράση του NF-kB (He et al., 2006).

Σε μια μελέτη των Kang et al. για τον έλεγχο της πιθανής τοξικής δράσης της Μαστίχας Χίου στο ήπαρ χορηγήθηκαν διαφορετικές δόσεις Μαστίχας Χίου σε νέους επίμυς (Kang et al., 2007). Η μελέτη αυτή έδειξε ότι η Μαστίχα Χίου επηρέασε το βάρος του ήπατος χωρίς όμως να επιφέρει μορφολογικές αλλαγές σε αυτό (Kang et al., 2007). Παράλληλα, πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις στις βιοχημικές παραμέτρους του ήπατος, οι οποίες έδειξαν πως οι αλλαγές στο ήπαρ δεν σχετίζονται με κάποια αρνητική δράση της Μαστίχας Χίου (Kang et al., 2007). Στη παρούσα μελέτη, η συγκέντρωση της Μαστίχας Χίου που χρησιμοποιήθηκε ήταν ενδιάμεση των μεγάλων συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη των Kang et al. και τα αποτελέσματα μας ήταν συγκρίσιμα όσον αφορά το βάρος και τη μορφολογία του ήπατος. Για το λόγο αυτό, υποθέτουμε πως οι αλλαγές στο βάρος του ήπατος δεν σχετίζονται με κάποια αρνητική δράση της Μαστίχας Χίου.

Η μελέτη των Das et al. για τη δράση του εκχυλίσματος του μαύρου τσαγιού έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων OVX και Control, ενώ η χορήγηση του μαύρου τσαγιού δεν προκάλεσε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα Control (Das et al., 2004). Παρόλα αυτά, δεν μπορούμε να κάνουμε άμεση σύγκριση των αποτελεσμάτων αυτών με την παρούσα μελέτη λόγω του διαφορετικού χρόνου μελέτης (Das et al., 2004). Διαφορά μεταξύ των ομάδων OVX και Control στο βάρος των νεφρών δεν παρατηρήθηκε σε καμία άλλη μελέτη (Patsaki et al., 2016, Vorland et al., 2019). Παρόλα αυτά, σε μια μελέτη για τον έλεγχο της τοξικολογικής δράσης της Μαστίχας Χίου στους νεφρούς, οι διάφορες που παρατηρήθηκαν στους βιοχημικούς

δείκτες θεωρείται πως δεν οφείλονται σε τοξική δράση της Μαστίχας Χίου στη νεφρική λειτουργία (Kang et al., 2007). Χρειάζεται περαιτέρω έλεγχος για να διευκρινιστεί ο μηχανισμός δράσης της στο βάρος των νεφρών εάν υπάρχει.

Η Μαστίχα Χίου χρησιμοποιείται από την αρχαιότητα και παρόλο που οι ευεργετικές και οι θεραπευτικές τις δράσεις έχουν μελετηθεί εκτεταμένα, η δράση της στον οστικό μεταβολισμό δεν είχε μελετηθεί ως τώρα. Από το 2000 αρκετές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την αντιμικροβιακή, αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και αντικαρκινική δράση της Μαστίχας Χίου (Andrikopoulos et al., 2003, Georgiadis et al., 2015, He et al., 2006, Triantafyllou et al., 2011). Τα φυτικά εκχυλίσματα περιέχουν πολλές ουσίες κάθε μια από τις οποίες διεγείρει ή καταστέλλει διαφορετικά μονοπάτια σε κάθε οργανισμό. Ο οστικός μεταβολισμός επηρεάζεται συχνά από ουσίες με αντιφλεγμονώδη δράση, φυτοοιστογόνα ή από ουσίες που επηρεάζουν το μεταβολικό μονοπάτι του NF-κB (Suzuki et al., 2020). Μια έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε καρκινικά κύτταρα προστάτη που είναι ορμονοεξαρτώμενα από ανδρογόνα έδειξε πως η Μαστίχα Χίου αναστέλλει τη δράση του NF-κB (He et al., 2006). Επιπλέον, μια έρευνα στην πειραματική κολίτιδα έδειξε πως η Μαστίχα Χίου μειώνει τη φλεγμονή μέσω της ρύθμισης του NF-κB (Paralouis et al., 2012). Οι μεταγραφικοί παράγοντες NF-κB ρυθμίζουν την έκφραση διαφόρων γονιδίων που λαμβάνουν μέρος σε φυσιολογικές ή παθολογικές καταστάσεις (Ting and Endy, 2002). Η ενεργοποίηση του NF-κB στα περισσότερα κύτταρα γίνεται από ένα εύρος ερεθισμάτων, όπως κυτοκίνες και ερεθίσματα του ανοσοποιητικού (Jimi et al., 2019). Αρκετά μέλη της οικογένειας του NF-κB εμπλέκονται στην ανάπτυξη και ενεργοποίηση των οστεοκλαστών και των πρώιμων φλεγμονωδών αντιδράσεων (Boyce, 2015, Jimi et al., 2019). Το κλασικό μονοπάτι του NF-κB έχει θεμελιώδη δράση στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των οστεοκλαστών και στη φλεγμονώδη αντίδραση. Επιπρόσθετα, η Μαστίχα Χίου παρουσιάζει μια ισχυρή και καλά μελετημένη αντιοξειδωτική δράση (Andrikopoulos et al., 2003, Georgiadis et al., 2015). Κατά συνέπεια, υποθέτουμε πως η ευεργετική δράση της Μαστίχας Χίου στον οστικό μεταβολισμό και τη μυϊκή μάζα πιθανώς να οφείλεται στην αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση της.

Ένας σημαντικός περιορισμός της παρούσας μελέτης αφορά το χρόνο διάρκειας της πειραματικής διαδικασίας και την επίδραση του στις εμβιομηχανικές παραμέτρους που αξιολογήθηκαν. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, για να μελετηθούν οι εμβιομηχανικές παράμετροι απαιτείται χρόνος παρακολούθησης τουλάχιστον 9 μηνών (Kalu, 1991). Παρ' όλο που ο μέσος χρόνος ζωής ενός θηλυκού αρουραίου είναι 813 ± 214 μέρες (Fukuda and Iida, 2003), οι κλινικές ή υποκλινικές εκφυλιστικές ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικία (όπως κακοήθεις όγκοι, αναπνευστικές λοιμώξεις και νεφρικές ή καρδιακές διαταραχές) που πιθανόν να εμφανιστούν στην ηλικία του ενός έτους θα

επηρέαζαν και θα αλλοίωναν τα αποτελέσματα της μελέτης μας. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε σαν χρόνος παρατήρησης οι έξι μήνες για την παρούσα μελέτη.

Ένας επιπλέον περιορισμός της παρούσας μελέτης είναι η έλλειψη βιοχημικών αναλύσεων στο αίμα και τα ούρα των επιμύων. Οι βιοχημικοί δείκτες θα πρόσφεραν σημαντικές πληροφορίες κυρίως για την πρώτη περίοδο μετά την ωθηκτομή όπου η απώλεια οστικής μάζας είναι ταχεία. Παρόλα αυτά, η συλλογή αίματος και ούρων θα υπέβαλε σε μεγάλο στρες τους επίμους (Hoffman et al., 2018, Sahin et al., 2019), το οποίο θα επηρέαζε τα αποτελέσματα της μελέτης. Επιπρόσθετα, σε ζώα εργαστηρίου με εγκατεστημένη οστεοπόρωση, η ανάλυση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων είναι πιθανό να μην προσφέρουν αξιόπιστες πληροφορίες για το μεταβολισμό των οστών (Turner et al., 2001). Για το λόγο αυτό δεν έγινε ανάλυση των δειγμάτων αίματος που συλλέχθηκαν κατά την ευθανασία.

Ακόμα ένας περιορισμός της πειραματικής διαδικασίας είναι η έλλειψη ιστομορφομετρικής ανάλυσης. Οι στατικές και δυναμικές παράμετροι της ιστομορφομετρίας κατά την ευθανασία θα πρόσφεραν επιπλέον πληροφορίες για τη δράση της Μαστίχας Χίου στα οστά. Παρόλα αυτά, λόγω περιορισμένου εξοπλισμού τέτοιες αναλύσεις δεν ήταν εφικτό να γίνουν.

Συμπεράσματα

Στην παρούσα έρευνα, μελετήθηκε η επίδραση της Μαστίχας Χίου στο πρότυπο του ωοθηκεκτομημένου επίμυος. Το πρότυπο αυτό χρησιμοποιείται εκτεταμένα για την ανάδειξη της προστατευτικής δράσης διαφόρων παραγόντων και προϊόντων φυτικής προέλευσης στο μεταβολισμό των οστών.

Η χορήγηση της Μαστίχας Χίου για έξι μήνες, παρόλο που δεν απέτρεψε τη μείωση της BMD στην ολική κνήμη περιόρισε σε μεγάλο βαθμό την απώλεια της BMD σε σύγκριση με τους επίμυες που δεν έλαβαν θεραπεία. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στην εγγύς μετάφυση της κνήμης. Η BMD της ομάδας OVX + CMG ήταν στατιστικά σημαντικά μειωμένη μετά από έξι μήνες αλλά παρόλα αυτά στατιστικά σημαντικά υψηλότερη από την BMD ομάδας OVX.

Όσον αφορά την BMD του 6^{ου} οσφυϊκού σπονδύλου, η ομάδα OVX + CMG παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση κατά τους τρεις πρώτους μήνες της χορήγησης αλλά δεν είχε σημαντική διαφορά το δεύτερο τρίμηνο χορήγησης. Η BMD του 6^{ου} οσφυϊκού σπονδύλου της ομάδας OVX + CMG ήταν στατιστικά υψηλότερη της ομάδας OVX και στους τρεις και στους έξι μήνες της χορήγησης της Μαστίχας Χίου.

Η ευεργετική επίδραση που παρατηρείται στην BMD συνήθως συνοδεύεται από ανάλογα ευεργετικά αποτελέσματα στην οστική αντοχή. Παρόλα αυτά, στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στις von Mises, Bending και Torsional τάσεις. Παρατηρήθηκε, όμως, πως το πάχος του δεξιού μηριαίου της ομάδας OVX + CMG είχε ενδιάμεση τιμή από τις ομάδες Control και OVX.

Το βάρος της μήτρας των ομάδων OVX + CMG και OVX ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότερο από την ομάδα Control ενώ μεταξύ τους δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά.

Η απουσία επίδρασης της Μαστίχας Χίου στο βάρος της μήτρας ήταν σε συνέπεια με τα αποτελέσματα της κυτταρολογικής εξέτασης των κολπικών επιχρισμάτων, τα οποία δεν ανέδειξαν κάποια οιστρογονική δράση της Μαστίχας Χίου στο επιθήλιο του κόλπου των επιμύων. Οι ομάδες OVX + CMG και OVX είχαν την ίδια εικόνα ωρίμανσης του επιθηλίου και δεν υπήρχε ένδειξη οιστρογονικής δράσης και κύκλου.

Στην παρούσα μελέτη, παρατηρήθηκε αύξηση στο βάρος των επιμύων και στις τρεις ομάδες. Η ομάδα OVX + CMG είχε μέσο βάρος ενδιάμεσο των δύο άλλων ομάδων χωρίς να παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά με τις ομάδες αυτές, ενώ οι ομάδες Control και OVX είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά, με την ομάδα Control να παρουσιάζει το μικρότερο μέσο βάρος. Ταυτόχρονα, το μέσο ενδοπεριτοναϊκό λίπος / BW (%) της ομάδας OVX + CMG είχε μια ενδιάμεση τιμή χωρίς να παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά από τις ομάδες Control και OVX. Το μέσο βάρος του

γαστροκνήμιου / BW (%) της ομάδας OVX + CMG δεν είχε καμία διαφορά με την ομάδα Control, ενώ ήταν μεγαλύτερο της ομάδας OVX χωρίς όμως η διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν μια ευνοϊκή δράση της μαστίχας στις τρεις αυτές παραμέτρους.

Το μέσο βάρος του ήπατος της ομάδας OVX + CMG ήταν στατιστικά υψηλότερο από τις ομάδες Control και OVX.

Η διαφορά του βάρους των νεφρών των ομάδων OVX + CMG και OVX δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας έρευνα ήταν η μελέτη της επίδρασης της Μαστίχας Χίου στην οστική πυκνότητα και αντοχή των οστών ωοθηκιομημένων επιμύων. Η Μαστίχα Χίου είναι μια γνωστή ρητίνη οποία χρησιμοποιείται από την αρχαιότητα για τις ευεργετικές βιολογικές της ιδιότητες.

Τριάντα θήλεις επίμυες Wistar χωρίστηκαν τυχαία σε τρεις ομάδες, την ομάδα Control, η οποία υποβλήθηκε σε εικονική ωοθηκιομή, την ομάδα OVX, η οποία υποβλήθηκε σε ωοθηκιομή και δεν έλαβε κάποια θεραπεία και στην ομάδα OVX + CMG, η οποία υποβλήθηκε σε ωοθηκιομή και έλαβε Μαστίχα Χίου μετά την επέμβαση. Η οστική πυκνότητα των επιμύων στην κνήμη, στην εγγύς μετάφυση της κνήμης και στον 6^ο οσφυϊκό σπόνδυλο μετρήθηκε κατά την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας και τρεις και έξι μήνες μετά την ωοθηκιομή. Η αντοχή των οστών αξιολογήθηκε στο δεξι μηριαίο με τη δοκιμασία κάμψης τριών σημείων.

Στους τρεις και έξι μήνες, η οστική πυκνότητα της ομάδας OVX + CMG ήταν σημαντικά στατιστικά υψηλότερη από την ομάδα OVX και στις τρεις περιοχές ενδιαφέροντος. Το πάχος του μηριαίου οστού αξιολογήθηκε με τη δοκιμασία κάμψης 3 σημείων και για την ομάδα παρέμβασης είχε ενδιαμέση τιμή σε σύγκριση με τις άλλες δυο ομάδες. Η ιστολογική αξιολόγηση των κολπικών επιχρισμάτων και το βάρος της μήτρας της ομάδας OVX + CMG ήταν σε συνέπεια με την έλλειψη οιστρογόνων. Το μέσο βάρος του γαστροκνήμιου / BW (%) και το μέσο βάρος του ενδοπεριτοναϊκού λίπους / BW (%) της ομάδας OVX + CMG δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά από την ομάδα Control.

Η καθημερινή κατανάλωση Μαστίχας Χίου είχε προστατευτική δράση στην οστική πυκνότητα της κνήμης, την εγγύς μετάφυση της κνήμης και του 6^{ου} οσφυϊκού σπονδύλου χωρίς να προκαλέσει ανεπιθύμητες ενέργειες στο κολπικό επιθήλιο και τη μήτρα. Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας κάμψης τριών σημείων έδειξαν ευνοϊκό αποτέλεσμα στο πάχος του μηριαίου. Επιπρόσθετα, η Μαστίχα Χίου είχε ευεργετική δράση τόσο στο μυϊκό σύστημα όσο και στο ενδοπεριτοναϊκό λίπος / BW των επιμύων.

Abstract

The purpose of this study was to examine the potential effect of Chios Mastic Gum (CMG) consumption on bone mineral density (BMD) and strength of ovariectomised rats. CMG is a known resin used from ancient times for its beneficial biological properties.

Thirty mature female Wistar rats were randomised into three equal groups: sham-operated (control), ovariectomised (OVX), ovariectomised and administered CMG per os (OVX + CMG). BMD of the total tibia, proximal tibia and the 6th lumbar vertebra were measured at baseline, and at 3 and 6 months post ovariectomy. Bone strength was assessed with three-point-bending (3pb) of the right femur.

At 3 and 6 months, BMD values of the OVX + CMG group were significantly higher for the anatomical sites evaluated than those of the OVX group. Femoral thickness assessed via 3pb had intermediate values in the treated group compared to the other groups. Cytology of vaginal smears and uterine weight of the OVX + CMG group were consistent with estrogen depletion. Gastrocnemius muscle and intraperitoneal fat ratios to body weight of the OVX + CMG group did not significantly differ from the control group.

Daily consumption CMG had a protective effect on BMD of the total and proximal tibia and the 6th lumbar vertebra of the rats, without causing undesirable effects on the vaginal epithelium and uterus. The 3pb results also demonstrated a favorable effect on the thickness of rat femurs. In addition, CMG was beneficial for both the muscular system and the intraperitoneal fat/body weight ratio of the rats.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βιβλιογραφία

1. Abbasi AA, Rudman D, Wilson CR, Drinka PJ, Basu SN, Mattson DE, Richardson TJ. Observations on nursing home residents with a history of hip fracture. *Am J Med Sci*. 1995 Dec;310(6):229-34. PMID: 7503102.
2. Adler RA. Osteoporosis in men: a review. *Bone Res*. 2014 Apr 29;2:14001. doi: 10.1038/boneres.2014.1. PMID: 26273515; PMCID: PMC4472130.
3. Allen JG, Fotsch C, Babij P. Emerging targets in osteoporosis disease modification. *J Med Chem*. 2010 Jun 10;53(11):4332-53. doi: 10.1021/jm9018756. PMID: 20218623.
4. Ammann P, Rizzoli R. Bone strength and its determinants. *Osteoporos Int*. 2003;14 Suppl 3:S13-8. doi: 10.1007/s00198-002-1345-4. Epub 2003 Mar 19. PMID: 12730800.
5. Andreadou I, Mitakou S, Paraschos S, Efentakis P, Magiatis P, Kaklamanis L, et al. "Pistacia lentiscus L." reduces the infarct size in normal fed anesthetized rabbits and possess antiatheromatic and hypolipidemic activity in cholesterol fed rabbits. *Phytomedicine*. 2016. 23:1220-1226.
6. Andrikopoulos NK, Kaliora AC, Assimopoulou AN, Papapeorgiou VP. Biological activity of some naturally occurring resins, gums and pigments against in vitro LDL oxidation. *Phytother Res*. 2003 May;17(5):501-7. doi: 10.1002/ptr.1185. PMID: 12748987.
7. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. World Health Organization Technical Report Series. 1994;843:1-129.
8. Behre HM, Kliesch S, Leifke E, Link TM, Nieschlag E. Long-term effect of testosterone therapy on bone mineral density in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 Aug;82(8):2386-90. doi: 10.1210/jcem.82.8.4163. PMID: 9253305.
9. Beral V; Million Women Study Collaborators, Bull D, Green J, Reeves G. Ovarian cancer and hormone replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*. 2007 May 19;369(9574):1703-10. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60534-0. PMID: 17512855.
10. Black DM, Rosen CJ. Clinical Practice. Postmenopausal Osteoporosis. *N Engl J Med*. 2016 Jan 21;374(3):254-62. doi: 10.1056/NEJMcp1513724. Erratum in: *N Engl J Med*. ;374(18):1797. PMID: 26789873.
11. Boyce BF, Xing L, Shakespeare W, Wang Y, Dalgarno D, Iuliucci J, Sawyer T. Regulation of bone remodeling and emerging breakthrough drugs for osteoporosis and osteolytic bone

- metastases. *Kidney Int Suppl.* 2003 Jun;(85):S2-5. doi: 10.1046/j.1523-1755.63.s85.2.x. PMID: 12753255.
12. Boyce BF, Xiu Y, Li J, Xing L, Yao Z. NF- κ B-Mediated Regulation of Osteoclastogenesis. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2015 Mar 27;30(1):35-44. doi: 10.3803/EnM.2015.30.1.35. PMID: 25827455; PMCID: PMC4384681.
 13. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003 May 15;423(6937):337-42. doi: 10.1038/nature01658. PMID: 12748652.
 14. 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;32(4):467-76. doi: 10.1258/002367798780599839. PMID: 9807761.
 15. Caplan AI, Correa D. PDGF in bone formation and regeneration: new insights into a novel mechanism involving MSCs. *J Orthop Res*. 2011 Dec;29(12):1795-803. doi: 10.1002/jor.21462. Epub 2011 May 25. PMID: 21618276.
 16. Carey J & Delaney M. T-Scores and Z-Scores. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism*. (2009). 8. 113-121. 10.1007/s12018-009-9064-4. ^[1] _[SEP]
 17. Cavolina JM, Evans GL, Harris SA, Zhang M, Westerlind KC, Turner RT. The effects of orbital spaceflight on bone histomorphometry and messenger ribonucleic acid levels for bone matrix proteins and skeletal signaling peptides in ovariectomized growing rats. *Endocrinology*. 1997 Apr;138(4):1567-76. doi: 10.1210/endo.138.4.5040. PMID: 9075717.
 18. Center JR, Nguyen TV, Schneider D, Sambrook PN, Eisman JA. Mortality after all major types of osteoporotic fracture in men and women: an observational study. *Lancet*. 1999 Mar 13;353(9156):878-82. doi: 10.1016/S0140-6736(98)09075-8. PMID: 10093980.
 19. Choi Y, Faccio R, Teitelbaum SL, Takayanagi H. Chapter 4: osteoclast biology: regulation of formation and function. In: Joseph L, Mark CH, Yongwon C, Hiroshi T, Georg S, Eds. *Osteoimmunology*. 2nd ed. San Diego, CA: Academic Press; 2016:41–70.
 20. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008 Nov;3 Suppl 3(Suppl 3):S131-9. doi: 10.2215/CJN.04151206. PMID: 18988698; PMCID: PMC3152283.
 21. Cooper RL, Goldman JM. Vaginal cytology. In: Daston G, Kimmel C, editors. *An evaluation and interpretation of reproductive endpoints for human health risk assessment*. 1999. Washington, DC: ILSI Press. p 42–56.
 22. Cosman F, de Beur SJ, LeBoff MS, Lewiecki EM, Tanner B, Randall S, Lindsay R; National Osteoporosis Foundation. *Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis*. *Osteoporos Int*. 2014 Oct;25(10):2359-81. doi: 10.1007/s00198-014-2794-2.

Epub 2014 Aug 15. Erratum in: *Osteoporos Int.* 2015 Jul;26(7):2045-7. PMID: 25182228; PMCID: PMC4176573.

23. Dalby A: *Food in the Ancient World. From A to Z.* Taylor and Francis Group, London, UK, 2003.

24. Dalle Carbonare L, Valenti MT, Bertoldo F, Zanatta M, Zenari S, Realdi G, Lo Cascio V, Giannini S. Bone microarchitecture evaluated by histomorphometry. *Micron.* 2005;36(7-8):609-16. doi: 10.1016/j.micron.2005.07.007. Epub 2005 Sep 6. PMID: 16242341.

25. 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. doi: 10.1007/BF00675623. PMID: 8453502.

26. Das AS, Mukherjee M, Mitra C. Evidence for a prospective anti-osteoporosis effect of black tea (*Camellia Sinensis*) extract in a bilaterally ovariectomized rat model. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2004;13(2):210-6. PMID: 15228990.

27. Dempster DW. Bone microarchitecture and strength. *Osteoporos Int.* 2003 Sep;14 Suppl 5:S54-6. doi: 10.1007/s00198-003-1474-4. Epub 2003 Aug 29. PMID: 14504707.

28. Devareddy L, Hooshmand S, Collins JK, Lucas EA, Chai SC, Arjmandi BH. Blueberry prevents bone loss in ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis. *J Nutr Biochem.* 2008 Oct;19(10):694-9. doi: 10.1016/j.jnutbio.2007.09.004. Epub 2008 Mar 6. PMID: 18328688.

29. Dontas I, Halabalaki M, Moutsatsou P, Mitakou S, Papoutsis Z, Khaldi L, Galanos A, Lyritis GP. Protective effect of plant extract from *Onobrychis ebenoides* on ovariectomy-induced bone loss in rats. *Maturitas.* 2006 Jan 20;53(2):234-42. doi: 10.1016/j.maturitas.2005.05.007. Epub 2005 Jun 23. PMID: 15979258.

30. Dontas IA, Lelovas PP, Kourkoulis SK, Aligiannis N, Paliogianni A, Mitakou S, et al. Protective effect of *Sideritis euboica* extract on bone mineral density and strength of ovariectomized rats. *Menopause.* 2011. 18:915-922.

31. Duke JA: *Medical Plants of the Bible.* Conch Publishers, New York, p. 118, 1983.

32. Ebeling PR, Wark JD, Yeung S, Poon C, Salehi N, Nicholson GC, Kotowicz MA. Effects of calcitriol or calcium on bone mineral density, bone turnover, and fractures in men with primary osteoporosis: a two-year randomized, double blind, double placebo study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Sep;86(9):4098-103. doi: 10.1210/jcem.86.9.7847. PMID: 11549632.

33. Ebeling PR. Clinical practice. Osteoporosis in men. *N Engl J Med.* 2008 Apr 3;358(14):1474-82. doi: 10.1056/NEJMc0707217. PMID: 18385499.

34. Ema (European Medicines Agency), 2015. Assessment Report on *Pistacia Lentiscus* L., Resin (Mastix).
35. Ensrud KE, Ewing SK, Stone KL, Cauley JA, Bowman PJ, Cummings SR; Study of Osteoporotic Fractures Research Group. Intentional and unintentional weight loss increase bone loss and hip fracture risk in older women. *J Am Geriatr Soc.* 2003 Dec;51(12):1740-7. doi: 10.1046/j.1532-5415.2003.51558.x. PMID: 14687352.
36. Erben RG. Trabecular and endocortical bone surfaces in the rat: modeling or remodeling? *Anat Rec.* 1996 Sep;246(1):39-46. doi: 10.1002/(SICI)1097-0185(199609)246:1<39::AID-AR5>3.0.CO;2-A. PMID: 8876822.
37. Feldstein AC, Nichols G, Orwoll E, Elmer PJ, Smith DH, Herson M, Aickin M. The near absence of osteoporosis treatment in older men with fractures. *Osteoporos Int.* 2005 Aug;16(8):953-62. doi: 10.1007/s00198-005-1950-0. Epub 2005 Jun 1. PMID: 15928798.
38. Frost HM, Jee WS. On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. *Bone Miner.* 1992 Sep;18(3):227-36. doi: 10.1016/0169-6009(92)90809-r. PMID: 1392696.
39. Fukuda S, Iida H. Life span and spontaneous tumors incidence of the Wistar Mishima (WM/MsNrs) rat. *Exp Anim.* 2003 Apr;52(2):173-8. doi: 10.1538/expanim.52.173. PMID: 12806894.
40. Galanis D, Soultanis K, Lelovas P, Zervas A, Papadopoulos P, Galanos A, Argyropoulou K, Makropoulou M, Patsaki A, Passali C, Tsingotjidou A, Kourkoulis S, Mitakou S, Dontas I. Protective effect of Glycyrrhiza glabra roots extract on bone mineral density of ovariectomized rats. *Biomedicine (Taipei).* 2019 Jun;9(2):8. doi: 10.1051/bmdcn/2019090208. Epub 2019 May 24. PMID: 31124454; PMCID: PMC6533940.
41. Genant HK, Jiang Y. Advanced imaging assessment of bone quality. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Apr;1068:410-28. doi: 10.1196/annals.1346.038. PMID: 16831940.
42. Georgiadis I, Karatzas T, Korou LM, Katsilambros N, Perrea D. Beneficial health effects of Chios Gum Mastic and peroxisome proliferator-activated receptors: indications of common mechanisms. *J Med Food.* 2015 Jan;18(1):1-10. doi: 10.1089/jmf.2014.0021. PMID: 25133901.
43. Giaginis C, Theocharis S. Current evidence on the anticancer potential of Chios mastic gum. *Nutr Cancer.* 2011. 63:1174-1184
44. Goldman JM, Murr AS, Cooper RL. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2007 Apr;80(2):84-97. doi: 10.1002/bdrb.20106. PMID: 17342777.
45. Gupta A, Ahmad I, Kureel J, Hasanain M, Pandey P, Singh S, John AA, Sarkar J, Singh D. Induction of targeted osteogenesis with 3-aryl-2H-benzopyrans and 3-aryl-3H-

- benzopyrans: Novel osteogenic agents. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016 Apr;158:63-75. doi: 10.1016/j.jsbmb.2016.01.010. Epub 2016 Jan 22. PMID: 26807865.
46. He ML, Yuan HQ, Jiang AL, Gong AY, Chen WW, Zhang PJ, Young CY, Zhang JY. Gum mastic inhibits the expression and function of the androgen receptor in prostate cancer cells. *Cancer*. 2006 Jun 15;106(12):2547-55. doi: 10.1002/cncr.21935. PMID: 16691616.
47. Hernlund E, Svedbom A, Ivergård M, Compston J, Cooper C, Stenmark J, McCloskey EV, Jönsson B, Kanis JA. Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). *Arch Osteoporos*. 2013;8(1-2):136. doi: 10.1007/s11657-013-0136-1. Epub 2013 Oct 11. PMID: 24113837; PMCID: PMC3880487.
48. Hillier TA, Cauley JA, Rizzo JH, Pedula KL, Ensrud KE, Bauer DC, Lui LY, Vesco KK, Black DM, Donaldson MG, Leblanc ES, Cummings SR. WHO absolute fracture risk models (FRAX): do clinical risk factors improve fracture prediction in older women without osteoporosis? *J Bone Miner Res*. 2011 Aug;26(8):1774-82. doi: 10.1002/jbmr.372. PMID: 21351144; PMCID: PMC3622725.
49. Hinton PS, Nigh P, Thyfault J. Effectiveness of resistance training or jumping-exercise to increase bone mineral density in men with low bone mass: A 12-month randomized, clinical trial. *Bone*. 2015 Oct;79:203-12. doi: 10.1016/j.bone.2015.06.008. Epub 2015 Jun 16. PMID: 26092649; PMCID: PMC4503233.
50. Hoffman JF, Fan AX, Neuendorf EH, Vergara VB, Kalinich JF. Hydrophobic Sand Versus Metabolic Cages: A Comparison of Urine Collection Methods for Rats (*Rattus norvegicus*). *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2018 Jan 1;57(1):51-57. PMID: 29402352; PMCID: PMC5875098.
51. Jackson RD, LaCroix AZ, Gass M, Wallace RB, Robbins J, Lewis CE, Bassford T, Beresford SA, Black HR, Blanchette P, Bonds DE, Brunner RL, Brzyski RG, Caan B, Cauley JA, Chlebowski RT, Cummings SR, Granek I, Hays J, Heiss G, Hendrix SL, Howard BV, Hsia J, Hubbell FA, Johnson KC, Judd H, Kotchen JM, Kuller LH, Langer RD, Lasser NL, Limacher MC, Ludlam S, Manson JE, Margolis KL, McGowan J, Ockene JK, O'Sullivan MJ, Phillips L, Prentice RL, Sarto GE, Stefanick ML, Van Horn L, Wactawski-Wende J, Whitlock E, Anderson GL, Assaf AR, Barad D; Women's Health Initiative Investigators. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of fractures. *N Engl J Med*. 2006 Feb 16;354(7):669-83. doi: 10.1056/NEJMoa055218. Erratum in: *N Engl J Med*. 2006 Mar 9;354(10):1102. PMID: 16481635.

52. Jee WS, Yao W. Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2001 Mar;1(3):193-207. PMID: 15758493.
53. Ji Z, Shi C, Huang S, Dang X, Wang K, Lan B. Elcatonin attenuates disuse osteoporosis after fracture fixation of tubular bone in rats. *J Orthop Surg Res.* 2015 Jul 3;10:103. doi: 10.1186/s13018-015-0246-0. PMID: 26138716; PMCID: PMC4499200.
54. Jimi E, Fei H, Nakatomi C. NF- κ B Signaling Regulates Physiological and Pathological Chondrogenesis. *Int J Mol Sci.* 2019 Dec 12;20(24):6275. doi: 10.3390/ijms20246275. PMID: 31842396; PMCID: PMC6941088.
55. Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner.* 1991 Dec;15(3):175-91. doi: 10.1016/0169-6009(91)90124-i. PMID: 1773131.
56. Kang JS, Wanibuchi H, Salim EI, Kinoshita A, Fukushima S. Evaluation of the toxicity of mastic gum with 13 weeks dietary administration to F344 rats. *Food Chem Toxicol.* 2007 Mar;45(3):494-501. doi: 10.1016/j.fct.2006.09.013. Epub 2006 Oct 1. PMID: 17092621.
57. Kanis JA, Borgstrom F, De Laet C, Johansson H, Johnell O, Jonsson B, Oden A, Zethraeus N, Pflieger B, Khaltsev N. Assessment of fracture risk. *Osteoporos Int.* 2005 Jun;16(6):581-9. doi: 10.1007/s00198-004-1780-5. Epub 2004 Dec 23. PMID: 15616758.
58. Kanis JA, Cooper C, Rizzoli R, Reginster JY; Scientific Advisory Board of the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis (ESCEO) and the Committees of Scientific Advisors and National Societies of the International Osteoporosis Foundation (IOF). European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 2019 Jan;30(1):3-44. doi: 10.1007/s00198-018-4704-5. Epub 2018 Oct 15. Erratum in: *Osteoporos Int.* 2020 Jan;31(1):209. Erratum in: *Osteoporos Int.* 2020 Apr;31(4):801. PMID: 30324412; PMCID: PMC7026233.
59. Kanis JA, Gluer CC. An update on the diagnosis and assessment of osteoporosis with densitometry. Committee of Scientific Advisors, International Osteoporosis Foundation. *Osteoporos Int.* 2000;11(3):192-202. doi: 10.1007/s001980050281. PMID: 10824234.
60. Kanis JA, McCloskey EV, Johansson H, Oden A, Melton LJ 3rd, Khaltsev N. A reference standard for the description of osteoporosis. *Bone.* 2008 Mar;42(3):467-75. doi: 10.1016/j.bone.2007.11.001. Epub 2007 Nov 17. PMID: 18180210.
61. Kanis JA. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. WHO Study Group. *Osteoporos Int.* 1994 Nov;4(6):368-81. doi: 10.1007/BF01622200. PMID: 7696835.
62. Katikaneni R, Ponnappakkam A, Miller E, Ponnappakkam T, Gensure RC. A new technique for precisely and accurately measuring lumbar spine bone mineral density in mice

- using clinical dual energy X-ray absorptiometry (DXA). *Toxicol Mech Methods*. 2009 Mar;19(3):225-31. doi: 10.1080/15376510802499030. PMID: 19750018; PMCID: PMC2739646.
63. Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev*. 2008 Apr;29(2):155-92. doi: 10.1210/er.2007-0014. Epub 2007 Dec 5. PMID: 18057140; PMCID: PMC2528846.
64. Keller TS, Spengler DM, Carter DR. Geometric, elastic, and structural properties of maturing rat femora. *J Orthop Res*. 1986;4(1):57-67. doi: 10.1002/jor.1100040107. PMID: 3950809.
65. Khajuria DK, Disha C, Razdan R, Mahapatra DR, Vasireddi R. Prophylactic Effects of Propranolol versus the Standard Therapy on a New Model of Disuse Osteoporosis in Rats. *Sci Pharm*. 2013 Dec 9;82(2):357-74. doi: 10.3797/scipharm.1310-06. PMID: 24959400; PMCID: PMC4065128.
66. Kiebzak GM, Beinart GA, Perser K, Ambrose CG, Siff SJ, Heggeness MH. Undertreatment of osteoporosis in men with hip fracture. *Arch Intern Med*. 2002 Oct 28;162(19):2217-22. doi: 10.1001/archinte.162.19.2217. PMID: 12390065.
67. Kimmel DB, Wronski TJ. Nondestructive measurement of bone mineral in femurs from ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int*. 1990 Feb;46(2):101-10. doi: 10.1007/BF02556093. PMID: 2105147.
68. Kostenuik PJ, Nguyen HQ, McCabe J, et al. Denosumab, a fully human monoclonal antibody to RANKL, inhibits bone resorption and increases BMD in knock-in mice that express chimeric (murine/human) RANKL. *J Bone Miner Res*. 2009;24(2):182–95.
69. Langdahl BL, Carstens M, Stenkjaer L, Eriksen EF. Polymorphisms in the transforming growth factor beta 1 gene and osteoporosis. *Bone*. 2003 Mar;32(3):297-310. doi: 10.1016/s8756-3282(02)00971-7. PMID: 12667558.
70. 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. PMID: 19004367; PMCID: PMC2707131.
71. Lemonakis N, Magiatis P, Kostomitsopoulos N, Skaltsounis AL, Tamvakopoulos C. Oral administration of chios mastic gum or extracts in mice: quantification of triterpenic acids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Planta Med*. 2011. 77:1916-1923.

72. 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. doi: 10.1002/(SICI)1097-0185(199607)245:3<472::AID-AR3>3.0.CO;2-U. PMID: 8800405.
73. Li M, Shen Y, Wronski TJ. Time course of femoral neck osteopenia in ovariectomized rats. *Bone.* 1997 Jan;20(1):55-61. doi: 10.1016/s8756-3282(96)00317-1. PMID: 8988348.
74. Li JX, Liu J, He CC, Yu ZY, Du Y, Kadota S et al. Triterpenoids from *Cimicifugae rhizoma*, a novel class of inhibitors on bone resorption and ovariectomy-induced bone loss. *Maturitas.* 2007. 58:59-69.
75. Li XJ, Jee WS, Chow SY, 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. doi: 10.1002/ar.1092270103. PMID: 2195916.
76. Li XJ, Jee WS. Adaptation of diaphyseal structure to aging and decreased mechanical loading in the adult rat: a densitometric and histomorphometric study. *Anat Rec.* 1991 Mar;229(3):291-7. doi: 10.1002/ar.1092290302. PMID: 2024773.
77. Li XJ, Jee WSS, Ke HZ, Mori S, Akamine T. Age-Related Changes of Cancellous and Cortical Bone Histomorphometry in Female Sprague-Dawley Rats. *Cells Mater* 1992;1:25-37
78. Lin JT, Lane JM. Rehabilitation of the older adult with an osteoporosis-related fracture. *Clin Geriatr Med.* 2006 May;22(2):435-47; x. doi: 10.1016/j.cger.2005.12.010. PMID: 16627087.
79. Loeb WF. The rat. In: Loeb WF, Quimby FW, editors. *The clinical chemistry of laboratory animals*, 2nd ed. 1999. Ann Arbor: Edwards Brothers. p 33–45.
80. Loukavenko EA, Wolff M, Poirier GL, Dalrymple-Alford JC. Impaired spatial working memory after anterior thalamic lesions: recovery with cerebrolysin and enrichment. *Brain Struct Funct.* 2016 May;221(4):1955-70. doi: 10.1007/s00429-015-1015-x. Epub 2015 Mar 1. PMID: 25725627.
81. Ma YF, Ke HZ, Jee WS. Prostaglandin E2 adds bone to a cancellous bone site with a closed growth plate and low bone turnover in ovariectomized rats. *Bone.* 1994 Mar-Apr;15(2):137-46. doi: 10.1016/8756-3282(94)90700-5. PMID: 8086230.
82. Mann DR, Gould KG, Collins DC. A potential primate model for bone loss resulting from medical oophorectomy or menopause. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990 Jul;71(1):105-10. doi: 10.1210/jcem-71-1-105. PMID: 2196277.
83. Meunier PJ. Assessment of bone turnover by histomorphometry in osteoporosis. In: Riggs BL, Melton LJ, editors. *Osteoporosis: etiology, diagnosis, and management*. 1988. New York: Raven Press. p 317–332 [SEP]

84. Miller SC, Bowman BM, Miller MA, Bagi CM. Calcium absorption and osseous organ-, tissue-, and envelope-specific changes following ovariectomy in rats. *Bone*. 1991;12(6):439-46. doi: 10.1016/8756-3282(91)90033-f. PMID: 1797059.
85. Mills J and White R: The identity of the resins from the Late Bronze Age shipwreck at Ulu Burum (Kas). *Archaeometry* 31, 37–44, 1989.
86. Mills JS and White R: Natural resins of art and archaeology: their sources, chemistry and identification. *Stud Conserv* 22, 12–31, 1977.
87. 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. doi: 10.1007/s002239900626. PMID: 10089225.
88. Murad MH, Drake MT, Mullan RJ, Mauck KF, Stuart LM, Lane MA, Abu Elnour NO, Erwin PJ, Hazem A, Puhan MA, Li T, Montori VM. Clinical review. Comparative effectiveness of drug treatments to prevent fragility fractures: a systematic review and network meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Jun;97(6):1871-80. doi: 10.1210/jc.2011-3060. PMID: 22466336.
89. N.O.F.a.I.S.f.C. Recommendations to DXA Manufacturers for FRAX! Implementation. Available at: www.nof.org/files/nof/public/content/resource/862/files/392.pdf. Accessed March 1, 2016. ^[1]_{SEP}
90. Office of the Surgeon General (US). Bone Health and Osteoporosis: A Report of the Surgeon General. Rockville (MD): Office of the Surgeon General (US); 2004. PMID: 20945569.
91. Pachi VK, Mikropoulou EV, Gkiouvetidis P, Siafakas K, Argyropoulou A, Angelis A, et al. Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of Chios mastic gum (*Pistacia lentiscus* var. Chia, Anacardiaceae): A review. *J Ethnopharmacol*. 2020. 254:112485.
92. Pageau SC. Denosumab. *MAbs*. 2009 May-Jun;1(3):210-5. doi: 10.4161/mabs.1.3.8592. Epub 2009 May 29. PMID: 20065634; PMCID: PMC2726593.
93. Pan Z, Jee WS, Ma YF, McOsker JE, Li XJ. Intermittent treatments of prostaglandin E2 plus risedronate and prostaglandin E2 alone are equally anabolic on tibial shaft of ovariectomized rats. *Bone*. 1995 Oct;17(4 Suppl):291S-296S. doi: 10.1016/8756-3282(95)00306-x. PMID: 8579931.
94. Papalois A, Gioxari A, Kaliora AC, Lymperopoulou A, Agrogiannis G, Papada E, Andrikopoulos NK. Chios mastic fractions in experimental colitis: implication of the nuclear factor κ B pathway in cultured HT29 cells. *J Med Food*. 2012 Nov;15(11):974-83. doi: 10.1089/jmf.2012.0018. Epub 2012 Aug 14. PMID: 22891614.

95. Paraschos S, Magiatis P, Mitakou S, Petraki K, Kalliaropoulos A, Maragkoudakis P, Mentis A, Sgouras D, Skaltsounis A-L. In Vitro and In Vivo Activities of Chios Mastic Gum Extracts and Constituents against *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:551–559.
96. Park JH, Lee NK, Lee SY. Current understanding of RANK signaling in osteoclast differentiation and maturation. *Mol Cells*. 2017;40:706–713.
97. Patsaki. A.; Tchoumtchoua, J.; Passali. C.; Lelovas. P.; Kourkoulis, S. The Protective Effect of *Amphimas pterocarpoides* Plant Extract on Bone Mineral Density and Strength in Estrogen Deficient Ovariectomized Wistar Rats. *Medicinal & Aromatic Plants*. 2016. 5. 10.4172/2167-0412.1000269.
98. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J*. 2008 Mar;22(3):659-61. doi: 10.1096/fj.07-9574LSF. Epub 2007 Oct 17. PMID: 17942826.
99. Rosen HN, Tollin S, Balena R, Middlebrooks VL, Beamer WG, Donohue LR, Rosen C, Turner A, Holick M, Greenspan SL. 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. doi: 10.1007/BF00298994. PMID: 7671163.
100. Sadeghi O, Saneei P, Nasiri M, Larijani B, Esmailzadeh A. Abdominal Obesity and Risk of Hip Fracture: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Studies. *Adv Nutr*. 2017 Sep 15;8(5):728-738. doi: 10.3945/an.117.015545. PMID: 28916573; PMCID: PMC5593104.
101. Sahin Z, Solak H, Koc A, Ozen Koca R, Ozkurkculer A, Cakan P, Solak Gormus ZI, Kutlu S, Kelestimur H. Long-term metabolic cage housing increases anxiety/depression-related behaviours in adult male rats. *Arch Physiol Biochem*. 2019 May;125(2):122-127. doi: 10.1080/13813455.2018.1441314. Epub 2018 Feb 20. PMID: 29463132.
102. Salam SN, Eastell R, Khwaja A. Fragility fractures and osteoporosis in CKD: pathophysiology and diagnostic methods. *Am J Kidney Dis*. 2014 Jun;63(6):1049-59. doi: 10.1053/j.ajkd.2013.12.016. Epub 2014 Mar 13. PMID: 24631043.
103. Seibel MJ. Molecular markers of bone turnover: biochemical, technical and analytical aspects. *Osteoporos Int*. 2000;11 Suppl 6:S18-29. doi: 10.1007/s001980070003. PMID: 11193236.
104. Shen V, Dempster DW, Birchman R, Mellish RW, Church E, Kohn D, Lindsay R. Lack of changes in histomorphometric, bone mass, and biochemical parameters in

- ovariohysterectomized dogs. *Bone*. 1992;13(4):311-6. doi: 10.1016/8756-3282(92)90075-8. PMID: 1389570.
105. Silverman S, Christiansen C. Individualizing osteoporosis therapy. *Osteoporos Int*. 2012 Mar;23(3):797-809. doi: 10.1007/s00198-011-1775-y. Epub 2012 Jan 5. PMID: 22218417.
106. Søgaard CH, Wronski TJ, McOsker JE, Mosekilde L. The positive effect of parathyroid hormone on femoral neck bone strength in ovariectomized rats is more pronounced than that of estrogen or bisphosphonates. *Endocrinology*. 1994 Feb;134(2):650-7. doi: 10.1210/endo.134.2.8299562. PMID: 8299562.
107. Sözen T, Özışık L, Başaran NÇ. An overview and management of osteoporosis. *Eur J Rheumatol*. 2017 Mar;4(1):46-56. doi: 10.5152/eurjrheum.2016.048. Epub 2016 Dec 30. PMID: 28293453; PMCID: PMC5335887.
108. Suzuki A, Sugiyama G, Ohyama Y, Kumamaru W, Yamada T, Mori Y. Regulation of NF- κ B Signalling Through the PR55 β -RelA Interaction in Osteoblasts. *In Vivo*. 2020 Mar-Apr;34(2):601-608. doi: 10.21873/invivo.11813. PMID: 32111759; PMCID: PMC7157855.
109. Tabatabaei-Malazy O, Salari P, Khashayar P, Larijani B. New horizons in treatment of osteoporosis. *Daru*. 2017 Feb 7;25(1):2. doi: 10.1186/s40199-017-0167-z. PMID: 28173850; PMCID: PMC5297185.
110. Thoma A, Lightfoot AP. NF- κ B and Inflammatory Cytokine Signalling: Role in Skeletal Muscle Atrophy. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1088:267-279. doi: 10.1007/978-981-13-1435-3_12. PMID: 30390256.
111. Ting AY, Endy D. Signal transduction. Decoding NF- κ B signaling. *Science*. 2002 Nov 8;298(5596):1189-90. doi: 10.1126/science.1079331. PMID: 12424362.
112. Triantafyllou A, Bikineyeva A, Dikalova A, Nazarewicz R, Lerakis S, Dikalov S. Anti-inflammatory activity of Chios mastic gum is associated with inhibition of TNF- α induced oxidative stress. *Nutr J*. 2011 Jun 6;10:64. doi: 10.1186/1475-2891-10-64. PMID: 21645369; PMCID: PMC3127998.
113. Turner AS. Animal models of osteoporosis--necessity and limitations. *Eur Cell Mater*. 2001 Jun 22;1:66-81. doi: 10.22203/ecm.v001a08. PMID: 14562261.
114. Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone*. 1993 Jul-Aug;14(4):595-608. doi: 10.1016/8756-3282(93)90081-k. PMID: 8274302.
115. Turner RT, Maran A, Lotinun S, Hefferan T, Evans GL, Zhang M, Sibonga JD. Animal models for osteoporosis. *Rev Endocr Metab Disord*. 2001 Jan;2(1):117-27. doi: 10.1023/a:1010067326811. PMID: 11704974.

116. 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;2(2):115-22. doi: 10.1002/jbmr.5650020206. PMID: 3455160.
117. U.S. Preventive Services Task Force. Screening for osteoporosis: U.S. preventive services task force recommendation statement. *Ann Intern Med.* 2011 Mar 1;154(5):356-64. doi: 10.7326/0003-4819-154-5-201103010-00307. Epub 2011 Jan 17. PMID: 21242341.
118. Unnanuntana A, Gladnick BP, Donnelly E, Lane JM. The assessment of fracture risk. *J Bone Joint Surg Am.* 2010 Mar;92(3):743-53. doi: 10.2106/JBJS.I.00919. PMID: 20194335; PMCID: PMC2827823.
119. Viguet-Carrin S, Garnero P, Delmas PD. The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int.* 2006;17(3):319-36. doi: 10.1007/s00198-005-2035-9. Epub 2005 Dec 9. PMID: 16341622.
120. Vorland CJ, Lachcik PJ, Swallow EA, Metzger CE, Allen MR, Chen NX, Moe SM, Hill Gallant KM. Effect of ovariectomy on the progression of chronic kidney disease-mineral bone disorder (CKD-MBD) in female Cy/+ rats. *Sci Rep.* 2019 May 28;9(1):7936. doi: 10.1038/s41598-019-44415-9. PMID: 31138895; PMCID: PMC6538713.
121. Wang QL, Huo XC, Wang JH, Wang DP, Zhu QL, Liu B, Xu LL. Rutin prevents the ovariectomy-induced osteoporosis in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017 Apr;21(8):1911-1917. PMID: 28485786.
122. Wang Y, Bikle DD, Chang W. Autocrine and Paracrine Actions of IGF-I Signaling in Skeletal Development. *Bone Res.* 2013 Sep 25;1(3):249-59. doi: 10.4248/BR201303003. PMID: 26273506; PMCID: PMC4472106.
123. Watts NB, Adler RA, Bilezikian JP, Drake MT, Eastell R, Orwoll ES, Finkelstein JS; Endocrine Society. Osteoporosis in men: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Jun;97(6):1802-22. doi: 10.1210/jc.2011-3045. PMID: 22675062.
124. Watts NB. Fundamentals and pitfalls of bone densitometry using dual-energy X-ray absorptiometry (DXA). *Osteoporos Int.* 2004 Nov;15(11):847-54. doi: 10.1007/s00198-004-1681-7. Epub 2004 Aug 21. PMID: 15322740.
125. Wickham C, Cooper C, Margetts BM, Barker DJ. Muscle strength, activity, housing and the risk of falls in elderly people. *Age Ageing.* 1989 Jan;18(1):47-51. doi: 10.1093/ageing/18.1.47. PMID: 2565665.
126. Wood C, Osmond-Clarke F, Murray M. Vaginal cytology in pregnancy. *J Obstet Gynaecol Br Emp.* 1961 Oct;68:778-83. doi: 10.1111/j.1471-0528.1961.tb02809.x. PMID: 14008156.

127. 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. doi: 10.1007/BF02571317. PMID: 3141020.
128. Wronski TJ, Dann LM, Horner SL. Time course of vertebral osteopenia in ovariectomized rats. *Bone.* 1989;10(4):295-301. doi: 10.1016/8756-3282(89)90067-7. PMID: 2803866.
129. Wronski TJ, Dann LM, Scott KS, Cintrón M. Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. *Calcif Tissue Int.* 1989 Dec;45(6):360-6. doi: 10.1007/BF02556007. PMID: 2509027.
130. Xynos N, Termentzi A, Fokialakis N, Skaltsounis LA, Aligiannis N. Supercritical CO2 extraction of mastic gum and chemical characterization of bioactive fractions using LC-HRMS/MS and GC-MS. *J. Supercrit. Fluids.* 2018. 133, 349–356.
131. Yao W, Hadi T, Jiang Y, Lotz J, Wronski TJ, Lane NE. Basic fibroblast growth factor improves trabecular bone connectivity and bone strength in the lumbar vertebral body of osteopenic rats. *Osteoporos Int.* 2005 Dec;16(12):1939-47. doi: 10.1007/s00198-005-1969-2. Epub 2005 Aug 5. PMID: 16086094; PMCID: PMC6897353.
132. Zhu CT, Li T, Zhang P, Zou M, Guo Q, Qu XW. Beneficial effects of low-level laser irradiation on senile osteoporosis in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017 Nov;21(22):5230-5238. doi: 10.26355/eurrev_201711_13846. PMID: 29228439.
133. Δοντά Ι, Οστούν 1993;4:164-172. Πειραματισμός στους μύς και επίμυς.