

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ: ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΑΣ  
ΕΛΙΑΣ ΣΤΗΝ ΟΣΤΙΚΗ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ ΣΤΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗΣ ΤΟΥ  
ΩΘΗΚΕΚΤΟΜΗΜΕΝΟΥ ΕΠΙΜΥΟΣ**

**ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ Σ. ΖΕΡΒΑΣ**

**ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ**



**ΑΘΗΝΑ, 2021**

## Πίνακας Περιεχομένων

<b>ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ</b> .....	<b>2</b>
<b>ΘΕΜΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ</b> .....	<b>4</b>
<b>ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ</b> .....	<b>8</b>
<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b> .....	<b>13</b>
<b>ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΕ ΑΠΟ ΤΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ</b> .....	<b>16</b>
<b>ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ ΑΠΟ ΤΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ</b> .....	<b>16</b>
<b>ΘΕΜΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ</b> .....	<b>17</b>
<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	<b>18</b>
ΟΡΙΣΜΟΣ.....	18
ΟΣΤΙΤΗΣ ΙΣΤΟΣ.....	19
<i>Μακροσκοπικές Μορφές Οστίτη Ιστού</i> .....	19
<i>Φλοιώδες οστό</i> .....	20
<i>Σπογγώδες οστό</i> .....	21
<i>Οστική Δομή</i> .....	21
<i>Οστεοβλάστες</i> .....	22
<i>Οστεοκύτταρα</i> .....	23
<i>Οστεοκλάστες</i> .....	24
<i>Οστεογένεση</i> .....	25
<i>Οστεοποίηση</i> .....	25
<i>Ανακατασκευή του Οστίτη Ιστού (Remodelling)</i> .....	25
<i>Φάσεις ανακατασκευής οστού</i> .....	26
<i>Ασβεστοποίηση οστεοειδούς</i> .....	27
<i>Κορυφαία οστική πυκνότητα (Peak bone mass)</i> .....	27
ΟΡΜΟΝΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΝΑΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΟΥ ΟΣΤΟΥ.....	29
<i>Παραθορμόνη</i> .....	29
<i>Καλσιτονίνη</i> .....	29
<i>Καλσιτριόλη</i> .....	30
<i>Βιταμίνη D</i> .....	30
<i>Αυξητική ορμόνη</i> .....	30
<i>Θυρεοειδικές ορμόνες</i> .....	31
<i>Γλυκοκορτικοειδή</i> .....	31
<i>Οιστρογόνα</i> .....	31
ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΝΑΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΤΟΥ ΟΣΤΟΥ ΤΟΠΙΚΑ.....	31
ΟΣΤΕΟΠΩΡΩΣΗ.....	33
ΜΕΤΕΜΜΗΝΟΠΑΥΣΙΑΚΗ ΟΣΤΕΟΠΩΡΩΣΗ.....	35
<i>Εμμηνόπαυση</i> .....	36
<i>Ενδιαφέρουσες μελέτες που επηρέασαν τις θεραπείες της οστεοπόρωσης</i> .....	37
ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΜΕΤΕΜΜΗΝΟΠΑΥΣΙΑΚΗΣ ΟΣΤΕΟΠΩΡΩΣΗΣ.....	40
ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΜΕΤΕΜΜΗΝΟΠΑΥΣΙΑΚΗΣ ΟΣΤΕΟΠΩΡΩΣΗΣ.....	40
<i>Dual Energy X-ray Absorptiometry (DEXA)</i> .....	41
<i>Εκτίμηση καταγματικού κινδύνου (FRAX, Fracture Risk Assessment Tool)</i> .....	44
<i>Αδυναμίες του δείκτη FRAX</i> .....	44

Άλλες εργαστηριακές εξετάσεις .....	46
ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕΤΕΜΜΗΝΟΠΑΥΣΙΑΚΗΣ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗΣ .....	47
Κύριες φαρμακευτικές θεραπευτικές μέθοδοι .....	47
ΖΩΙΚΑ ΠΡΟΤΥΠΑ .....	52
Νομοθεσία .....	54
Πρωτεύοντα .....	56
Πρόβατα .....	57
Σκύλοι .....	58
Χοίροι .....	58
Κόνικλοι .....	59
Μύες .....	59
Επίμυες .....	60
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....</b>	<b>63</b>
ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	64
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ .....	66
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	66
Αδειοδότηση ερευνητικού πρωτοκόλλου .....	66
Σχεδιασμός πειράματος ( <i>Experimental design</i> ) .....	67
Ομάδες ζώων .....	68
Εκχύλισμα επιτραπέζιας ελιάς .....	69
Διατροφή και συνθήκες διατήρησης των ζώων .....	72
Πειραματικές διαδικασίες .....	74
Στατιστική ανάλυση .....	79
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	81
Οστική Πυκνότητα .....	81
Μεταβολές της οστικής πυκνότητας κατά τη μέτρηση ολόκληρης της κνήμης .....	81
Μεταβολές της οστικής πυκνότητας κατά τη μέτρηση της εγγύος μετάφυσης της κνήμης .....	85
Δοκιμές μηχανικής αντοχής των οστών .....	88
Έλεγχος κατανάλωσης εκχυλίσματος .....	92
Έλεγχος Σωματικών βαρών .....	93
Έλεγχος βάρους οργάνων και ολικού λίπους .....	94
Αποτελέσματα Βιοχημικών Εξετάσεων .....	98
ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	99
ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ .....	106
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	107
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	108
ABSTRACT .....	109
ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ .....	110
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	111

**ΘΕΜΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΑΣ ΕΛΙΑΣ ΣΤΗΝ ΟΣΤΙΚΗ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ ΣΤΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗΣ ΤΟΥ ΩΘΗΚΕΚΤΟΜΗΜΕΝΟΥ ΕΠΙΜΥΟΣ**

**ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΑΙΤΗΣΗΣ: 07/06/2013**

**ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 06/02/2014**

**ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ**

Καθηγήτρια κ.Ισμήνη Δοντά (Επιβλέπον Μέλος)

Καθηγήτρια κ.Σοφία Μητάκου

Αναπληρωτής Καθηγητής κ. Ευστάθιος Χρονόπουλος

**ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΘΕΜΑΤΟΣ: 04/06/2014**

**1<sup>η</sup> ΕΚΘΕΣΗ ΠΡΟΟΔΟΥ: 03.02.2015**

**2<sup>η</sup> ΕΚΘΕΣΗ ΠΡΟΟΔΟΥ: 29.01.2016**

**3<sup>η</sup> ΕΚΘΕΣΗ ΠΡΟΟΔΟΥ: 27.01.2017**

**4<sup>η</sup> ΕΚΘΕΣΗ ΠΡΟΟΔΟΥ: 21.02.2018**

**ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: 18.04.2021**

**ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 19.04.2021**

**ΟΝΟΜΑ ΠΡΟΕΔΡΟΥ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ: Καθηγητής Πέτρος Π. Σφηκάκης**

**ΜΕΛΗ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:**

1. κα. Ισμήνη Δοντά (Επιβλέπον Μέλος), Καθηγήτρια Ιατρικής ΕΚΠΑ
2. κα. Σοφία Μητάκου, Καθηγήτρια Φαρμακευτικής Σχολής ΕΚΠΑ

3. κ. Ευστάθιος Χρονόπουλος, Αν. Καθηγητής Ιατρικής ΕΚΠΑ
4. κ. Αλέξιος-Λέανδρος Σκαλτσούνης, Καθηγητής Φαρμακευτικής Σχολής ΕΚΠΑ
5. κα. Μουτσάτσου- Παρασκευή, Καθηγήτρια Ιατρικής ΕΚΠΑ
6. κα. Ευανθία Κασσή, Καθηγήτρια Ιατρικής ΕΚΠΑ
7. κ. Βασίλειος Νικολάου, Επ. Καθηγητής Ιατρικής ΕΚΠΑ

Στους αγαπημένους μου γονείς Σωτήρη και Φωτεινή.

Στη σύζυγό μου και συνοδοιπόρο σε όλα τα ταξίδια Κατερίνα.

Στα αδέρφια μου Μιχάλη και Χρήστο.

## ΟΡΚΟΣ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ

Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἄσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἴστορας ποιούμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν ὄρκον τόνδε καὶ συγγραφὴν τήνδε. Ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ ωυτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρῃεσι, καὶ διδάξῃν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ συγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοισί τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί. Διαιτήμασί τε χρήσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρξῃν. Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑψηγήσομαι ξυμβουλίην τοιήνδε. Ὅμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἄγνῳς δὲ καὶ ὀσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμὴν. Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε. Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίης, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμάτων καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπείης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτε ἐκκαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρῃετα ἡγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα. Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ συγγέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιόρκοῦντι, τάναντία τουτέων.

## Βιογραφικό Σημείωμα

### ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

- **Όνομα:** Αλέξανδρος
- **Επώνυμο:** Ζέρβας
- **Διεύθυνση Κατοικίας:** 8 Hindwell Grove, Leeds, LS141FW, United Kingdom
- **Τηλέφωνο:** +44 (0) 7459918184
- **Ηλεκτρονική Διεύθυνση:** [alexandroszervas@hotmail.gr](mailto:alexandroszervas@hotmail.gr)

### ΕΡΓΑΣΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- **2019 έως σήμερα:** Associate Director, Named Veterinary Surgeon, Site Lead Veterinarian, Animal Welfare & Veterinary Services, Covance Ltd, Harrogate, United Kingdom
- **2016-2019:** Named Veterinary Surgeon, The Royal Veterinary College, University of London (based at University of Oxford, covering the NVS role and providing HO courses for University of Leicester, UCL, University of Cambridge, The Royal Veterinary College and other clients)
- **2018- 2019:** Locum Veterinary Surgeon
- **11/2015- 02/2016:** Veterinary Surgeon at Medivets, Oadby
- **07/2013- 08/2015:** Υπεύθυνος Κτηνίατρος στο Εργαστήριο Έρευνας Μυοσκελετικών Παθήσεων (Ε.Ε.Π.Μ.Σ)
- **6/2013 – 11/2014:** Κτηνίατρος, κτηνιατρείο Μιχαήλ Φλαράκου
- **07/2012-06/2013:** Κτηνίατρος, Κτηνιατρικό Κέντρο Περιστερίου



## ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

- **2017 έως σήμερα:** ECLAM resident (alternative route)
- **2014 έως σήμερα:** Διδακτορική διατριβή με θέμα: <<Εκτίμηση της προστατευτικής δράσης του εκχυλίσματος επιτραπέζιας ελιάς στην οστική πυκνότητα στο πειραματικό πρότυπο οστεοπόρωσης του ωθηκεκτομημένου επίμουσ>>, Εργαστήριο Έρευνας Μυοσκελετικών Παθήσεων (Ε.Ε.Π.Μ.Σ)
- **10/2015- 4/2016 :** Erasmus + Mobility Traineeship Program, The Royal Veterinary College, University of London
- **4-6/2015:** Εκπαιδευτής, Πρόγραμμα εκπαίδευσης Μικροχειρουργικής στο Εργαστήριο Έρευνας Μυοσκελετικών Παθήσεων (Ε.Ε.Π.Μ.Σ)
- **4-6/2014:** Εκπαιδευόμενος, Πρόγραμμα εκπαίδευσης Μικροχειρουργικής στο Εργαστήριο Έρευνας Μυοσκελετικών Παθήσεων (Ε.Ε.Π.Μ.Σ)
- **7/2013:** Certificate of having satisfactorily completed accredited training for personnel working under the Animals (Scientific Procedures) Act 1986, The Royal Society of Biology
- **07/2013** Scientific Visitor, Laboratory Animal Section, The Royal Veterinary College, University of London
- **2006-2012:** Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης (ΑΠΘ), Απόφοιτος Κτηνιατρικής Σχολής

## ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ- ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ

- Βραβείο "Αλέξανδρος Κάλος" για επιστημονική εργασία, 23ο Πανελλήνιο ΕΕΜΜΟ, 2015
- ICLAS scholarship to participate in the FELASA-SECAL Congress, Barcelona, Spain, June 10-14th, 2013.

## ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- The effect of table olive wastewater extract administration on the adult ovariectomised rat model of osteoporosis.

Alexandros S. Zervas, Pavlos P. Lelovas, Antonios Galanos, Dimitrios Galanis, Maria Makropoulou, Stavros Beteinakis, Anastasia Patsaki, Christina Passali, Stavros K. Kourkoulis, Aggeliki Triantafyllou, Efstathios Chronopoulos, Alexios L. Skaltsouni, Ismene A. Dontas.

*British Journal of Nutrition* (2021), 1-10. doi:10.1017/S0007114521000465

- Protective effect of Glycyrrhiza glabra roots extract on bone mineral density of ovariectomized rats.

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.

*Biomedicine (Taipei)*. 2019 Jun;9(2):8. doi: 10.1051/bmdcn/2019090208. Epub 2019 May 24. PMID: 31124454; PMCID: PMC6533940.

## ΕΙΣΗΓΗΣΕΙΣ ΣΕ ΗΜΕΡΙΔΕΣ-ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- **Alexandros Zervas**, Lucy Whitfield, Ismene Dontas, REVIEW OF THE APPLICATION PROCEDURE FOR A PROJECT LICENCE IN TWO MEMBER STATES OF THE EUROPEAN UNION; GREECE AND THE UNITED KINGDOM, ESLAV, ECLAM, AAALAC International and SECAL, Barcelona, Spain, October 2018
- **Alexandros Zervas**, Lucy Whitfield, Ismene Dontas, REVIEW OF THE PROJECT LICENSE APPLICATION IN TWO COUNTRIES OF THE EU, Hellenic Veterinary Medical Society, 14<sup>th</sup> Greek Congress, Thessaloniki, May 2018
- **Zervas AS**, Surgical aseptic technique and practical aspects, Laboratory Animal Science European Union Functions Course, Laboratory for Research of the Musculoskeletal System, National & Kapodistrian University of Athens, Greece (FELASA accredited, invited speaker)
- **Zervas AS**, Woolmer O., 2x Workshops (Standard and Advanced) on Surgical aseptic technique; hands-on, **IAT Congress**, Newport, 3/2017
- **AS Zervas**, PP Lelovas, A Galanos, Galanis D, Makropoulou M, D. Abatis, E. Chronopoulos, A-L Skaltsounis, Mitakou S, IA Dontas, The effect of olive extract administration on body and organ weights of adult female ovariectomised rats, **FELASA 2016**, Brussels, 6/2016
- IA Dontas, **AS Zervas**, A Galanos, Zacharioudaki Argyro, Lelovas Pavlos, The effect of cage height on bone density of growing Wistar rats, **FELASA 2016**, Brussels, 6/2016
- Galanis D., Galanos A., Lelovas P., **Zervas A.**, Makropoulou M., Vontzalidou A., Aligiannis N., Soultanis K., Mitakou S., Dontas I., Protective effect of Glycyrrhiza glabra plant extract in bone mineral density of ovariectomised rats, **FELASA 2016**, Brussels, 6/2016
- Makropoulou M., Lelovas P., Galanos A., **Zervas A.**, Kourkoulis S., Aligiannis N., Mitakou S., Dontas I., Protective effect of Iris plant extract in bone mineral density of ovariectomised rats, **FELASA 2016**, Brussels, 6/2016
- Whitfield L., **Zervas AS**, Workshop on Surgical aseptic technique; hands-on, **IAT Congress**, Harrogate, 3/2016
- Galanis D., Galanos A., Lelovas P., **Zervas A.**, Papadopoulos P., Makropoulou M., Aligiannis N., Soultanis K., Mitakou S., Dontas I., Protective effect of Glycyrrhiza glabra plant extract in bone mass density of ovariectomised rats, **EMMO**, Thessaloniki, Greece, 10/2015
- Flarakos M., Karapatsiou Z.I., Karra K.E., Choudeloudis A., **AS Zervas**, Laparoscopic techniques in Veterinary Medicine Practice, Hellenic Veterinary Medical Society, 13<sup>rd</sup> Greek Congress, Athens, May 2015
- **AS Zervas**, PP Lelovas, A Patsaki, C Passali, A Galanos, E. Chronopoulos, S. Mitakou., IA Dontas, Changes of physiological parameters in young adult rats as a result of aging, Hellenic Veterinary Medical Society, 13<sup>rd</sup> Greek Congress, Athens, May 2015

- Intra-surgical imaging (C-arm) techniques in Veterinary Medicine Practice, Flarakos M., Karapatsiou Z.I., Karra K.E., Choudeloudis A., **AS Zervas**, Hellenic Veterinary Medical Society, 13<sup>rd</sup> Greek Congress, Athens, May 2015
- **AS Zervas**, PP Lelovas, C Passali, A Patsaki, M Makropoulou, A Galanos, A-L Skaltsounis, IA Dontas, Age-related changes of haemodynamic parameters in adult female ovariectomized rats; the effect of olive extract administration, **Joint HSBLAS/ESLAV/ECLAM Meeting**, Athens, September 22-23, 2014
- IA Dontas, **AS Zervas**, A Galanos, The effect of group-housing and isolation on body weight, food and water consumption in adult female rats, **Joint HSBLAS/ESLAV/ECLAM Meeting**, Athens, September 22-23, 2014
- **AS Zervas** , PP Lelovas, A Patsaki, C Passali, A Galanos, IA Dontas, Age-related changes of physiological parameters in young adult rats: a non-invasive observational study (Preliminary results), the **FELASA-SECAL Congress**, Barcelona, Spain, June 10-14<sup>th</sup>, 2013

### ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

- Ελληνικά: μητρική
- Αγγλικά: ανώτατο επίπεδο (Certificate of Proficiency in English- University of Cambridge, Certificate of Proficiency in English- University of Michigan)
- Γαλλικά: προχωρημένο επίπεδο (Dalf C1)

### ΓΝΩΣΕΙΣ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟΥ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΗ

ECDL (Basic Concepts of Information Technology, Using the Computer and Managing Files, Information and Communication)

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Έρευνας Παθήσεων Μυοσκελετικού Συστήματος (Ε.Ε.Π.Μ.Σ) "Θ. Γαροφαλίδης" της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Σε αυτό το ταξίδι έρευνας και δημιουργικότητας είχα την τιμή και τη χαρά να συνεργαστώ με πολλούς αξιόλογους ανθρώπους και επιστήμονες, να ξεκινήσω τα πρώτα μου ερευνητικά βήματα και να διευρύνω τις γνώσεις μου στον τομέα των Ζώων Εργαστηρίου.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσά μου καθηγήτρια κα. Ισμήνη Δοντά, η οποία από την αρχή μου έδειξε το δρόμο προς την έρευνα, εμπιστοσύνη και μέχρι σήμερα βρίσκεται δίπλα μου ως μέντορας και δάσκαλος σε κάθε μου βήμα. Η κα. Δοντά αποτελεί πρότυπο για εμένα, έχοντας συμβάλει στην παγκόσμια έρευνα με το υψηλού επιπέδου επιστημονικό της έργο και τη συμβολή της στη νομοθεσία και την εκπαίδευση σχετικά με την έρευνα με τη χρήση Ζώων Εργαστηρίου. Ταυτόχρονα, είμαι ευγνώμων στην κα. Δοντά, καθώς η εκπαίδευση μου, σε καθημερινή βάση αυτά τα έτη, επεκτάθηκε και σε άλλους τομείς, εκτός των επιστημονικών, όπως της συνεργασίας με άξονα τον αλληλοσεβασμό, της διπλωματίας και την παραγωγική συμμετοχή μου σε δύσκολες συζητήσεις. Όλα αυτά τα στοιχεία μου φάνηκαν πολύ χρήσιμα και τα χρησιμοποιώ καθημερινά στην επαγγελματική μου ζωή. Η καθοδήγηση και η επίβλεψή της από το στάδιο της επιλογής του θέματος έως και τη συγγραφή της διατριβής ήταν αδιάλειπτη και ουσιαστική. Θέλω ακόμη να της εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου, για την αδιάκοπη βοήθειά της στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων και στη συγγραφή των εργασιών, αλλά και για την δυνατότητα που μου έδωσε να συμμετάσχω σε συνέδρια παγκόσμιας εμβέλειας και ακτινοβολίας.

Εν συνεχεία ευχαριστώ θερμά την καθηγήτρια κα Σοφία Μητάκου, μέλος της τριμελούς επιτροπής μου, Καθηγήτρια Φαρμακευτικής, τομέας Φαρμακογνωσίας, ΕΚΠΑ, η οποία ήταν πάντα δίπλα μου σε όλα τα στάδια της διατριβής και του επιστημονικού έργου. Η συνεργασία μαζί της ήταν πάντα άμεση και παραγωγική, παρόλο που γνωρίζω πόσο επιβαρυνόμενο εργασιακό φόρτο είχε, γεγονός που οδήγησε στην αναγνώριση αυτού του πειραματικού έργου

με διεθνή δημοσίευση σε υψηλό επίπεδο. Την ευχαριστώ θερμά για την εμπιστοσύνη και την ευκαιρία που μου έδωσε να διεκπεραιώσω τη διατριβή μου με το εκχύλισμα αυτό με τη συμμετοχή μου στο ερευνητικό πρόγραμμα της Σχολής της.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον αν. καθηγητή Ευστάθιο Χρονόπουλο, μέλος της τριμελούς μου επιτροπής για τις πολύτιμες επιστημονικές συμβουλές του, καθ' όλη τη διάρκεια αυτής τη διατριβής. Όπως επίσης για την ηθική υποστήριξη και εμπιστοσύνη που μου έδειξε σε επιστημονικές επιλογές που πρότεινα, καθώς η εμπειρία και η γνώση του αποτέλεσαν εφιαλτήριο για την επίτευξη αυτών των στόχων.

Θα αποτελούσε παράλειψη να μην ευχαριστήσω τους σημαντικούς επιστήμονες του εργαστηρίου κ. Παύλο Λελόβα, κτηνίατρο και κ. Αντώνη Γαλανό, βιοστατιστικολόγο, οι οποίοι υπήρξαν εξαιρετικοί συνεργάτες και βοήθησαν τα μέγιστα σε όλα τα στάδια του πειραματικού πρωτοκόλλου και της συγγραφής. Με την αδιάκοπη αγάπη στο έργο τους, την εμπειρία και το ενδιαφέρον που επιδεικνύουν καθημερινά, διασφαλίζουν την υψηλού επιπέδου έρευνα με σεβασμό στους συνεργάτες τους αλλά και ως προς τη σωστή χρησιμοποίηση των ζώων.

Το Εργαστήριο Έρευνας Παθήσεων του Μυοσκελετικού Συστήματος (Ε.Ε.Π.Μ.Σ) αποτελεί ιδανικό χώρο έρευνας και εκπαίδευσης, όπου κυριαρχεί η "δύναμη της συνεργασίας" διαφορετικών ειδικοτήτων και αισθάνομαι τυχερός που είχα τη δυνατότητα να εκπαιδευτώ εκεί. Οφείλω λοιπόν να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό που συμμετείχε στη διεξαγωγή του πειραματικού πρωτοκόλλου, το οποίο είχε αρκετές δύσκολες και απαιτητικές διαδικασίες. Οι νοσηλεύτριες, οι ζωοκόμοι, οι γραμματείς, οι διαχειριστές τεχνικών μηχανημάτων, όλοι υπήρξαν άριστοι βοηθοί και συνεργάτες.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συνεργάτες οι οποίοι συνέβαλαν στην περαίωση του πειραματικού έργου. Πιο συγκεκριμένα ευχαριστώ τον Παναγιώτη Παπαδόπουλο, ορθοπαιδικό, τον καθηγητή ΕΜΠ κ. Σταύρο Κουρκουλή, τη Μαρία Μακροπούλου, φαρμακοποιό και την κα. Βενετσάνου Κυριακή, υπεύθυνη της ερευνητικής μονάδας ΜΕΘ του νοσοκομείου ΚΑΤ για όλη την πολύτιμη βοήθειά τους.

Θερμές ευχαριστίες στη σύζυγό μου Κατερίνα Χαϊνταρλή, για τη συμπαράστασή της όλα αυτά τα χρόνια. Η ηθική υποστήριξη, η κατανόηση και η αγάπη που μου προσέφερε ήταν ανεκτίμητες, ενώ ταυτόχρονα η επιστημονική της γνώση και έμπειρη ματιά της αποτελούσαν πάντα σημαντικό στήριγμα της δουλειάς και των επιλογών μου. Ευχαριστώ θερμά επίσης όλα τα μέλη της οικογένειάς μου γιατί ο καθένας τους, με την υποστήριξη και τη φροντίδα τους, έπαιξαν καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη της επιστημονικής μου οντότητας και προσωπικότητας γενικότερα.

Κλείνοντας, οφείλω να απευθύνω θερμότερες ευχαριστίες στα μέλη της επταμελούς επιτροπής, κυρίους και κυρίες Δοντά Ισμήνη, Μητάκου Σοφία, Ευστάθιο Χρονόπουλο, Σκαλτσούνη Λέανδρο-Αλέξιο, Μουτσάτσου-Λαδίκου Παρασκευή, Κασσή Ευανθία και Νικολάου Βασίλειο για το χρόνο, την υποστήριξη και την καθοριστική συμβολή τους στην ολοκλήρωση της διατριβής μου.

## Δημοσίευση που προέκυψε από τη Διατριβή

- The effect of table olive wastewater extract administration on the adult ovariectomised rat model of osteoporosis.

Alexandros S. Zervas, Pavlos P. Lelovas, Antonios Galanos, Dimitrios Galanis, Maria Makropoulou, Stavros Beteinakis, Anastasia Patsaki, Christina Passali, Stavros K. Kourkoulis, Aggeliki Triantafyllou, Efstathios Chronopoulos, Alexios L. Skaltsouni, Ismene A. Dontas

*British Journal of Nutrition* (2021), 1-10. doi:10.1017/S0007114521000465

## Ανακοινώσεις σε Διεθνή Συνέδρια που προέκυψαν από τη Διατριβή

- **AS Zervas**, PP Lelovas, A Galanos, Galanis D, Makropoulou M, D. Abatis, E. Chronopoulos, A-L Skaltsounis, Mitakou S, IA Dontas, The effect of olive extract administration on body and organ weights of adult female ovariectomised rats, **FELASA 2016**, Brussels, 6/2016
- **AS Zervas**, PP Lelovas, C Passali, A Patsaki, M Makropoulou, A Galanos, A-L Skaltsounis, IA Dontas, Age-related changes of haemodynamic parameters in adult female ovariectomized rats; the effect of olive extract administration, **Joint HSBLAS/ESLAV/ECLAM Meeting**, Athens, September 22-23, 2014



**ΘΕΜΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΑΣ ΕΛΙΑΣ ΣΤΗΝ ΟΣΤΙΚΗ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ ΣΤΟ ΠΡΟΤΥΠΟ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗΣ ΤΟΥ ΩΘΗΚΕΚΤΟΜΗΜΕΝΟΥ ΕΠΙΜΥΟΣ**

## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

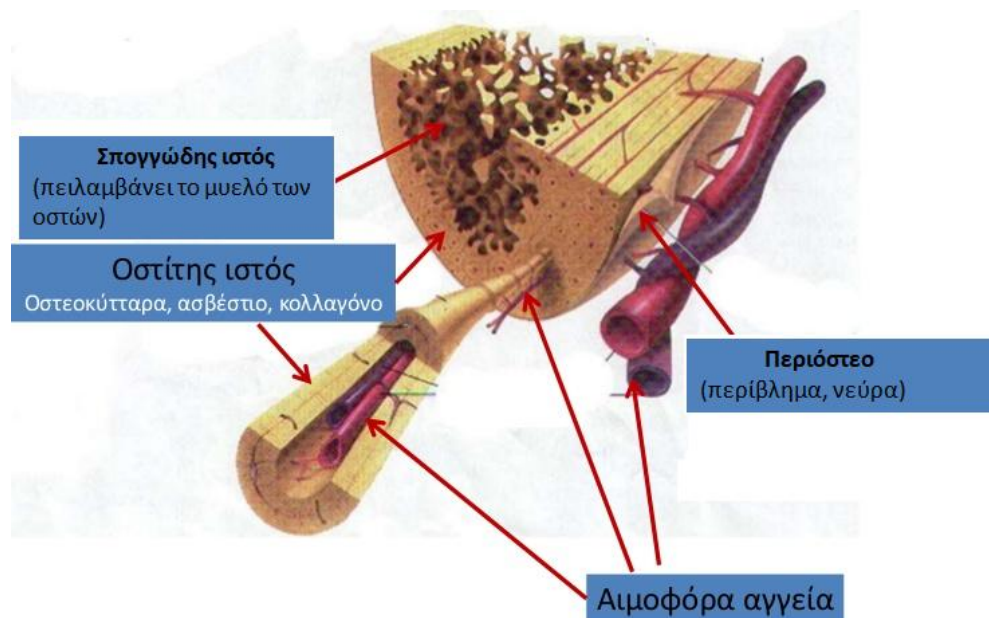
### Ορισμός

Η οστεοπόρωση ορίζεται ως η ασθένεια που σχετίζεται με υποβαθμισμένη **οστική δύναμη**, όπου η οστική δύναμη καθορίζεται από την οστική μάζα και από την ποιότητα του οστού. Η ποιότητα του οστού καθορίζεται από τη γεωμετρία του οστού, τις ιδιότητες του οστικού υλικού, την οστική μικροδομή και την οστική εναλλαγή. Το αποτέλεσμα αυτής της υποβάθμισης της οστικής δύναμης οδηγεί σε αυξημένο κίνδυνο κατάγματος. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization) η οστεοπόρωση ορίζεται χρησιμοποιώντας την αξιολόγηση της οστικής πυκνότητας του οστού (BMD), κατά την οποία, ένας δείκτης οστικής πυκνότητας (BMD) ο οποίος βρίσκεται τουλάχιστον 2,5 μονάδες τυπικής απόκλισης κάτω από την τιμή του μέσου όρου των νεαρών υγείων γυναικών (T-score <-2.5 SD) ορίζεται ως οστεοπόρωση <sup>1</sup>. Σύμφωνα με το Εθνικό Σύστημα Υγείας της Μεγάλης Βρετανίας (National Health System-NHS) η οστεοπόρωση είναι η πάθηση η οποία αποδυναμώνει τα οστά, μετατρέποντας τα σε εύθραστα και έτσι αυξάνεται η πιθανότητα θραύσης τους, αναπτύσσεται με αργό ρυθμό κατά τη διάρκεια αρκετών ετών και συχνά διαγιγνώσκεται μόνο ύστερα από μία πτώση ή από αναπάντεχο κάταγμα που οφείλεται στη μείωση της οστικής πυκνότητας <sup>2</sup>. Σύμφωνα με το Παγκόσμιο Ίδρυμα Οστεοπόρωσης, η οστεοπόρωση, που κυριολεκτικά σημαίνει πορώδες οστό, είναι μία ασθένεια κατά την οποία η πυκνότητα και η ποιότητα του οστού ελαττώνεται. Καθώς τα οστά γίνονται πιο πορώδη και εύθραυστα, ο κίνδυνος κατάγματος αυξάνεται σημαντικά. Η απώλεια του οστού λαμβάνει χώρα σιωπηλά και προοδευτικά. Συχνά δεν εμφανίζονται συμπτώματα μέχρι την εμφάνιση του πρώτου κατάγματος <sup>3</sup>.

## Οστίτης ιστός

### Μακροσκοπικές Μορφές Οστίτη Ιστού

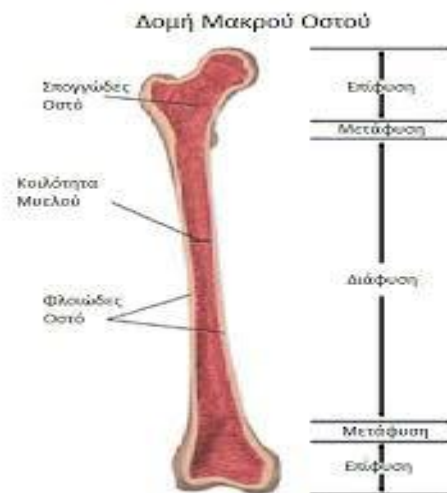
Το οστό αποτελείται από ανόργανη εξωκυττάρια ουσία, κυρίως άλατα υδροξυαπατίτη ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , κατά 62%) και από οργανική εξωκυττάρια ουσία (**οστεοειδές**), η οποία αποτελείται από κολλαγόνο τύπου I (31%) και από άλλες προτεΐνες (6%) όπως οστεοασβεστίνη, οστεοποντίνη, θρομβοποντίνη και οστεονεκτίνη. Η σύνθεση του οστού χαρακτηρίζεται από: εξωτερικά το **συμπαγές ή φλοιώδες** οστό, που αποτελείται από συμπαγείς περιοχές χωρίς κοιλότητες και εσωτερικά το **σπογγώδες ή δοκιδώδες** οστό, που αποτελείται από διαπλεκόμενες δοκίδες και επικοινωνούσες κοιλότητες. Το φλοιώδες και το σπογγώδες οστό διαφέρουν μακροσκοπικά και μικροσκοπικά, αλλά η χημική τους σύσταση είναι πανομοιότυπη <sup>4</sup>.



Εικόνα 1. Σπογγώδες οστό. Διάκριση του περιοστέου και της δομής του οστίτη ιστού (τροποποιημένη) <sup>5</sup>.

## Φλοιώδες οστό

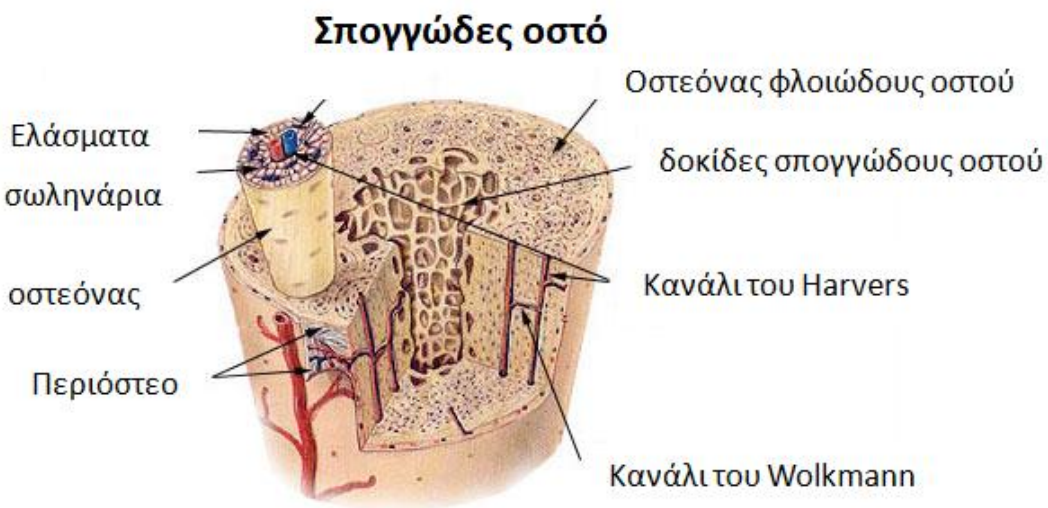
Το φλοιώδες οστό αποτελεί σχεδόν το 90% των οστών του σκελετού. Βρίσκεται κυρίως στην διάφυση των μακρών οστων και στις επιφάνειες πλατέων οστών. Και αποτελείται από συμπαγές οστό και εκτείνεται προς τα κεντρικά κανάλια (σωλήνες του Havers), τα οποία περιέχουν αιμοφόρα αγγεία, λεμφαγγεία, νεύρα και συνδετικό ιστό.



Εικόνα 2. Δομή μακρού οστού. Διακρίνονται το σπογγώδες και το φλοιώδες οστό, όπως και τα τμήματα του οστού επίφυση, μετάφυση και διάφυση (τροποποιημένη) <sup>6</sup>.

## Σπογγώδες οστό

Το σπογγώδες οστό συναντάται κυρίως στα άκρα των μακρών οστών και στο εσωτερικό τμήμα των πλατέων οστών, όπως για παράδειγμα ο σπόνδυλος. Αποτελείται από πλάκες και δοκίδες, μορφώματα τα οποία είναι συνδεδεμένα μεταξύ τους και περιβάλλει το μυελό του οστού (αιματοποιητικό ή λιπώδη).



Εικόνα 3. Μορφολογία οστικής δομής και σπογγώδους οστού (τροποποιημένη) <sup>7</sup>.

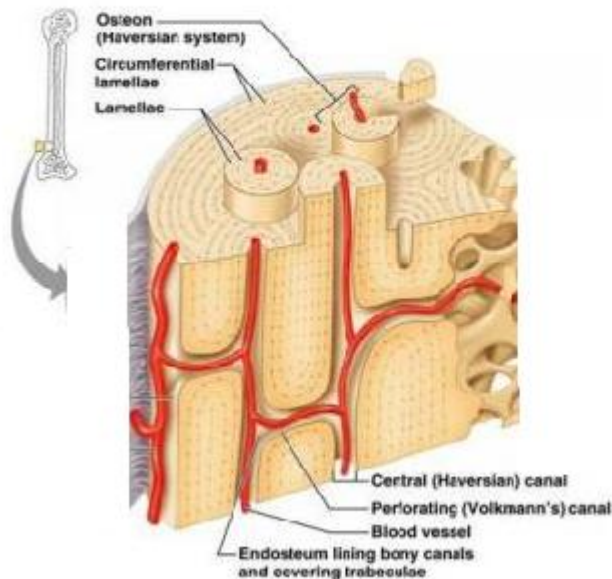
## Οστική Δομή

Τα οστά αποτελούνται από: το **περίοστεο**, δηλαδή συνδετικό ιστό που περιβάλλει εξωτερικά το οστό και περιέχει αγγεία, νεύρα και οστεοπρογονικά κύτταρα και το **ενδόστεο** δηλαδή συνδετικό ιστό που περιβάλλει εσωτερικά το οστό και περιέχει οστεοπρογονικά κύτταρα.

Ο οστεώνας αποτελείται από τον κεντρικό σωλήνα του Havers, ο οποίος περιβάλλεται από ομόκεντρα συγκεντρικά πετάλια οστίτη ιστού, με οστικά βοθρία που περιέχουν οστεοκύτταρα, τα οποία επικοινωνούν μεταξύ τους με μικροσωληνίσκους<sup>8</sup>.

Τα οστά αποτελούνται από την εξωκυττάρια (ή μεσοκυττάρια) θεμέλια ουσία και από κύτταρα. Τα κύτταρα του οστού διακρίνονται σε σθηκτικά κύτταρα όπως οι **οστεοβλάστες** και τα **οστεοκύτταρα**, και σε κύτταρα αποδόμησης του οστού, **οστεοκλάστες**.

## — Σύστημα Harvers —



Εικόνα 4. Αναπαράσταση του οστεώνα ή σύστημα Havers (τροποποιημένη)<sup>8</sup>.

### Οστεοβλάστες

Οι οστεοβλάστες προέρχονται από πολυδύναμα μεσεγχυματικά κύτταρα τα οποία μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ινοβλάστες, μυοβλάστες, λιποκύτταρα, οστεοβλάστες ή χονδροκύτταρα. Συνθέτουν το οργανικό τμήμα της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας του οστού

(κολλαγόνο, γλυκοζαμινογλυκάνες) και συμβάλλουν στην εναπόθεση των ανόργανων συστατικών. Όταν είναι ενεργές έχουν κυβικό ή κυλινδρικό σχήμα και βασεόφιλο κυτταρόπλασμα και απαντώνται στην επιφάνεια της οστικής δοκίδας. Από τη στιγμή που εγκλωβιστούν στο οστεοειδές που συνθέτουν μετατρέπονται σε οστεοκύτταρα. Οι οστεοβλάστες είναι τα κύτταρα που είναι υπεύθυνα για την επιμετάλλωση του οστού και για αυτό το σκοπό συνθέτουν και στη συνέχεια εκκρίνουν αυξητικούς παράγοντες (growth factors) στη μεσοκυττάρια ουσία του οστού.

Η δραστηριότητα των οστεοβλαστών ρυθμίζεται από διάφορους αυξητικούς παράγοντες υπό συνθήκες, όπως τους IGF (insulin-like growth factors), PDGF (platelet-derived growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor), TGF- $\beta$  (transforming growth factor-beta), BMP (bone morphogenetic proteins). Οι οστοβλάστες μπορούν να παράγουν αυτούς τους παράγοντες και φέρουν υποδοχείς για αυτούς τους παράγοντες. Επίσης φέρουν υποδοχείς για μια σειρά ορμονών, όπως την παραθορμόνη, τη θυρεοειδική ορμόνη, την αυξητική ορμόνη, την ινσουλίνη, την προγεστερόνη, την προλακτίνη, τα οιστρογόνα, τα ανδρογόνα, τη βιταμίνη D και τα ρετινοειδή<sup>4</sup>.

## Οστεοκύτταρα

Τα οστεοκύτταρα αποτελούν μικρά πεπλατυσμένα κύτταρα, τα οποία προέρχονται από τους οστεοβλάστες και βρίσκονται συνδεδεμένα μεταξύ τους, μέσα σε κοιλότητες του οστού, στα οστικά βοθρία. Μέσω ενός συστήματος μικροσωληνίσκων και των κυτταροπλασματικών αποφυάδων τους επικοινωνούν με τα αγγεία του περισστέου και του σωλήνα του Havers για θρέψη και ανταλλαγή μηνυμάτων. Κατά τη μικροσκόπηση, εμφανίζουν πυκνότερη χρωματίνη και ελαττωμένο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο και συσκευή Golgi σε σχέση με τις οστεοβλάστες, συντηρούν τη μεσοκυττάρια θεμέλια ουσία. Τα οστεοκύτταρα έχουν βασικό ρόλο στην απόκριση του οστού κατά τη φόρτιση μηχανικού φορτίου, κατά τη διάρκεια δομικών αλλαγών, όπως η ανάπτυξη (modelling) και η ανακατασκευή (remodelling). Η

σκληροσίνη, γλυκοπρωτεΐνη που έχει τη δυνατότητα να αναστέλει τη διαδικασία σχηματισμού του οστού παράγεται από τους οστεοβλάστες<sup>9</sup>.

## Οστεοκλάστες

Οι οστεοκλάστες προέρχονται από μονοκύτταρα του αίματος (από το μυελό των οστών), είναι γιγαντοκύτταρα με πολλούς πυρήνες και άφθονο κυτταρόπλασμα, απορροφούν το οστό μετά από προσκόλλησή τους στην ελεύθερη επιφάνειά του οστού, στα βοθρία του Howship. Η διαφοροποίηση και η ενεργοποίηση των οστεοκλαστών γίνεται με τη συμμετοχή πολλών παραγόντων. Οι οστεοβλάστες παράγουν τον παράγοντα διέγερσης των αποικιών των μακροφάγων M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor), όπως και τον παράγοντα RANKL (Receptor Activator of Nuclear factor kappa B-Ligand). Οι οστεοκλάστες επιτελούν την οστική απορρόφηση του επιμετάλλωμένου οστού μετά από την προσκόλλησή τους στο οστό, χρησιμοποιώντας ειδικά μόρια, όπως πρωτεΐνες (οστεοποντίνη, φμπρονεκτίνη, κολλαγόνο και οστική σιαλοπρωτεΐνη).

Η λειτουργία των οστεοκλαστών ρυθμίζεται τοπικά από κυτοκίνες και συστημικά από ορμόνες. Υποδοχείς για την καλσιτονίνη, τα ανδρογόνα, τη θυρεοειδική ορμόνη, την ινσουλίνη, την παραθορμόνη, τον IGF-1, την ιντερλευκίνη-1 (IL-1), τον CSF-1 και τον PDGF37 έχουν αναφερθεί στους οστεοκλάστες<sup>4</sup>.

Οι οστεοβλάστες και οι οστεοκλάστες δρουν συνεργικά ανάλογα με τη φάση της ζωής του οργανισμού. Κατά την περίοδο της ανάπτυξης κυριαρχεί η κατασκευή του οστού (modelling), ενώ κατά την περίοδο κατά την οποία ο σκελετός βρίσκεται σε ωριμότητα κυριαρχεί η αναδόμηση, δηλαδή η αποδόμηση και η επανακατασκευή του (remodelling).



## Οστεογένεση

Η οστεογένεση είναι η διαδικασία κατά την οποία σχηματίζεται το οστό, κατά την εμβρυϊκή ζωή και χαρακτηρίζεται από τη σύνθεση και εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας από τους οστεοβλάστες.

## Οστεοποίηση

Η οστεοποίηση ή δημιουργία νέου οστού καλείται η διαδικασία κατά την οποία δημιουργείται νέος οστίτης ιστός.

## Ανακατασκευή του Οστίτη Ιστού (Remodelling)

Ο οστίτης ιστός αναδομείται συνεχώς καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του οργανισμού, υπό την επίδραση φυσικών δυνάμεων και ορμονικών παραγόντων. Η συγκεκριμένη διαδικασία είναι απαραίτητη για την καλή σκελετική υγεία και επιτελείται σε διακριτές περιοχές του οστού, οι οποίες ονομάζονται πολύκυτταρικές μονάδες (bone multicellular units ή **BMUs**). Οι οστεοκλάστες λοιπόν, αφού συνδεθούν στο οστεοειδές, εκκρίνουν κολλαγόναση και άλλα ένζυμα, αποδομούν το οστό (κυτταρική απορρόφηση), σχηματίζοντας σήραγγες και στη συνέχεια απελευθερώνουν άλατα (ασβεστίου, μαγνησίου), επάγοντας τη μεταφορά του ασβεστίου στο αίμα. Σε αυτό το σημείο αναλαμβάνουν δράση οι οστεοβλάστες για την πραγματοποίηση του σχηματισμού του οστού και στη συνέχεια της οστεοποίησης. Οι οστεοβλάστες παράγουν το οργανικό τμήμα του οστού (οστεοειδές) και στη συνέχεια έχουν κύριο ρόλο στην επιμετάλλωση του (mineralisation). Σε αυτή τη διαδικασία χρησιμοποιείται το ελεύθερο ασβέστιο που έχει εναποτεθεί προηγουμένως στην κυκλοφορία του αίματος, αποκαθιστώντας έτσι τις τιμές του ασβεστίου σε φυσιολογικά επίπεδα (ομοίωση)

ασβεστίου). Αυτή η διαδικασία ακολουθείται και για την επούλωση μικρότραυμάτων του οστού ή ακόμα και καταγμάτων. Πιθανή ανισορροπία στις διαδικασίες που περιλαμβάνονται στην ανακατασκευή του οστού στους ενήλικες θεωρείται ότι επιδρά στη δύναμη του οστού (σε επίπεδο όγκου και επιμετάλλωσης), οδηγεί στην απώλεια σπογγώδους οστού, όπως και ότι επιδρά στη συνεκτικότητα του σπογγώδους οστού και έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό οστικών ελλειμμάτων (από την απορρόφηση) και διάτρηση του σπογγώδους οστού <sup>10</sup>. Σε νεαρές ηλικίες ο κύκλος της ανακατασκευής του οστού είναι ισορροπημένος, οι δύο τύποι οστού συνεργάζονται αρμονικά και συντονίζονται (**σύζευξη** ή coupling) <sup>11</sup>. Δηλαδή η οστική απορρόφηση ισοδυναμεί με τη μετέπειτα οστεοποίηση. Αυτός ο κύκλος διαρκεί συνήθως 90 με 130 ημέρες. Στην περίπτωση που η απορρόφηση υπερτερεί της οστεοποίησης παρατηρείται οστική απώλεια.

### Φάσεις ανακατασκευής οστού

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως η οστική ανακατασκευή είναι η φυσιολογική διαδικασία κατά την οποία το παλιό οστό αντικαθίσταται από νέο οστό. Αυτή η διαδικασία αποτελείται από πέντε φάσεις <sup>12</sup>:

- **Φάση ηρεμίας:** η οστική πολύκυτταρική μονάδα (BMU) είναι σταθερή και δεν επιτελούνται μεταβολές.
- **Φάση ενεργοποίησης** (σπογγώδες και φλοιώδες οστό: 5-7 ημέρες): οι οστεοκλάστες συγκροτούνται στην επιφάνεια του οστού.
- **Φάση απορρόφησης** (σπογγώδες οστό: 3-4 εβδομάδες, φλοιώδες οστό: 6-10 εβδομάδες): οι οστεοκλάστες δημιουργούν ένα όξινο μικροπεριβάλλον ανάμεσα στο κύτταρο και την επιφάνεια τους του διαλύοντας ή απορροφώντας το επιμεταλλωμένο τμήμα του οστού.

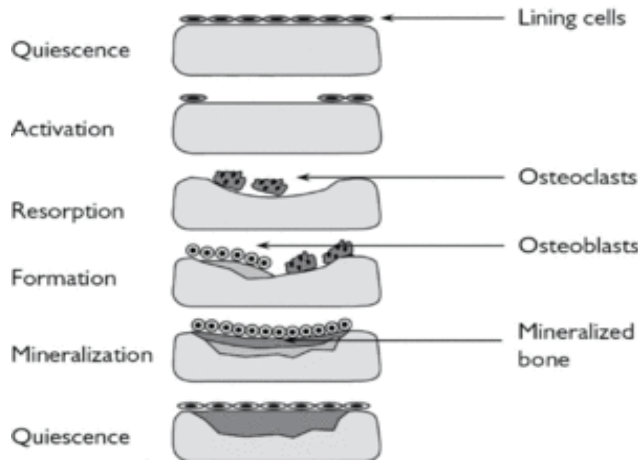
- **Φάση αντιστροφής** (σπογγώδες και φλοιώδες οστό: μερικές ημέρες): όπου οι οστεοκλάστες μεταποπύπτουν σε απόπτωση και οι οστεοβλάστες συγκροτούνται στην επιφάνεια του οστού
- **Φάση κατασκευής και επιμετάλλωσης** (σπογγώδες οστό: 2-3 μήνες, φλοιώδες οστό: 5 μήνες): οι οστεοβλάστες εναποθέτουν κολλαγόνο το οποίο επιμεταλλώνεται για να σχηματιστεί το νέο οστό.

### Ασβεστοποίηση οστεοειδούς

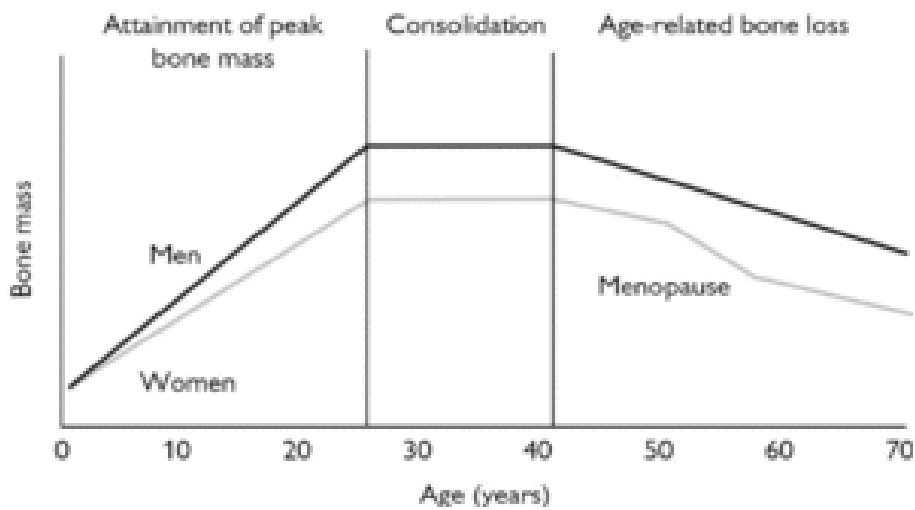
Η ασβεστοποίηση του οστεοειδούς γίνεται με την παραγωγή από τις οστεοβλάστες θεμέλιας ουσίας που περιέχουν ιόντα ασβεστίου, φωσφόρου και ένζυμα, όπως αλκαλική φωσφατάση και φωσφωρυλάση, που σχετίζονται με την εναπόθεση υδροξυαπατίτη. Φυσιολογικά η ασβεστοποίηση λαμβάνει χώρα λίγο μετά το σχηματισμό νέου οστεοειδούς.

### Κορυφαία οστική πυκνότητα (Peak bone mass)

Η μέγιστη οστική πυκνότητα του σπογγώδους οστού επιτυγχάνεται κατά την παιδική και την εφηβική ηλικία (12 με 16 έτη) ανάλογα το φύλλο, ενώ η μέγιστη οστική πυκνότητα του φλοιώδους οστού εμφανίζεται γύρω στα 20 με 24 έτη. Παράγοντες που επηρεάζουν τη μέγιστη οστική πυκνότητα καθορίζονται από το γενετικό υπόβαθρο, τη λειτουργία του ενδοκρινικού συστήματος, και από το περιβάλλον, δηλαδή κυρίως η άσκηση και η διατροφή.



Εικόνα 5. Η διαδικασία ανασχηματισμού του οστού (The remodelling cycle) <sup>9</sup>.



Εικόνα 6. Διαχρονικές φυσιολογικές μεταβολές στην οστική μάζα κατά τη διάρκεια της ζωής του ανθρώπου <sup>9</sup>.

## Ορμόνες που επηρεάζουν την ανακατασκευή του οστού

### Παραθορμόνη

Η παραθορμόνη (PTH - Parathormone) αποτελείται από 84 αμινοξέα και εκκρίνεται από τα κύρια κύτταρα των παραθυρεοειδών αδένων. Μέσω ειδικών υποδοχέων αυτών των κυττάρων, όταν γίνει αντιληπτή η μείωση της συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου στο αίμα, τότε επάγεται η έκκριση της παραθορμόνης, η οποία στη συνέχεια θα προκαλέσει την αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου στο αίμα.

Η συγκέντρωση της παραθορμόνης στο αίμα επανέρχεται σε φυσιολογικά επίπεδα, καθώς επιτυγχάνεται η αναστολή της σύνθεσής και της έκκρισής της, με την επίδραση των υψηλών επιπέδων ασβεστίου και της βιταμίνης D.

Η παραθορμόνη ως κύριες δράσεις επάγει την αύξηση της δραστηριότητας των οστεοκλαστών, που θα οδηγήσει στην απορρόφηση οστού, αυξάνει την απορρόφηση του ασβεστίου από το έντερο, τη σωληναριακή επαναρρόφηση του ασβεστίου από τους νεφρούς και την αποβολή του φωσφόρου, ενώ ταυτόχρονα επάγει τη σύνθεση της βιταμίνης D.

### Καλσιτονίνη

Η καλσιτονίνη παράγεται από το θυρεοειδή αδέννα και προκαλεί απενεργοποίηση των οστεοκλαστών και ταυτόχρονα διεγείρει τη διαδικασία δημιουργίας των οστεοβλαστών. Επίσης προκαλεί τη μείωση του φωσφόρου και του ασβεστίου στο αίμα μέσω της απέκκρισης τους από τους νεφρούς.

## Καλσιτριόλη

Η καλσιτριόλη ενισχύει την επιμετάλλωση του οστού, επιδρώντας θετικά στην απορρόφηση του φωσφόρου και του ασβεστίου από το έντερο.

## Βιταμίνη D

Η βιταμίνη D και οι μεταβολίτες της παίζουν σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό της ομοιόστασης σε ό,τι αφορά στο ασβέστιο, έτσι ώστε να διατηρείται σταθερή η συγκέντρωση του ασβεστίου στον ορό του αίματος. Η παραγωγή της βιταμίνης D επηρεάζεται από την πρόσληψη ασβεστίου μέσω της δίαιτας, τη φάση της ανάπτυξης, την ηλικία και την εμμηνόπαυση. Η κυριότερη δράση της βιταμίνης D κατά την ανάπτυξη του οργανισμού σχετίζεται με την αύξηση της απορρόφησης ασβεστίου, ώστε επαρκής ποσότητα ασβεστίου να είναι διαθέσιμη για την επιμετάλλωση των οστών<sup>13,14</sup>.

## Αυξητική ορμόνη

Η αυξητική ορμόνη σε συνεργασία με τους αυξητικούς παράγοντες IGF-1 και IGF-2 έχουν βασικό ρόλο στην σκελετική ανάπτυξη και επηρεάζουν την οστεογένεση και την οστική απορρόφηση επιδρώντας έτσι στην οστική πυκνότητα.

## Θυρεοειδικές ορμόνες

Οι θυρεοειδικές ορμόνες μπορούν υπό συνθήκες να διεγείρουν τόσο την οστική απορρόφηση όσο και την οστεογένεση.

## Γλυκοκορτικοειδή

Τα γλυκοκορτικοειδή (κορτιζόλη και κορτικοστερόνη) μπορούν να αυξήσουν την παραγωγή οστεοκλαστών αναστέλλοντας την δράση της OPG, όπως και να δεσμεύσουν τους υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών στους οστεοβλάστες αναχαιτίζοντας την λειτουργία τους.

## Οιστρογόνα

Τα οιστρογόνα εμποδίζουν την παραγωγή οστεοκλαστών, γιατί έχουν τη δυνατότητα να μειώνουν την ανταπόκριση των προγονικών κυττάρων των οστεοκλαστών στο RANKL. Επιλέον, μειώνουν τη διάρκεια ζωής των οστεοκλαστών, διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των οστεοβλαστών και μειώνουν την απόπτωσή τους και ενισχύουν την παραγωγή των OPG, IGF I, IGF II, and TGF- $\beta$ <sup>15</sup>.

## Παράγοντες που επηρεάζουν την ανακατασκευή του οστού τοπικά

Ο **RANKL** (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand), ο οποίος παράγεται από πρόδρομους οστεοβλάστες, συνδέεται με τον υποδοχέα RANK στα προγονικά κύτταρα

οστεοκλαστών και διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη διαφοροποίηση, στη συγχώνευση σε πολυπύρηννα κύτταρα, στην ενεργοποίηση, όπως και την επιβίωση των οστοκλαστών.

Η **OPG** (osteoprotegerin) αναστέλλει την εξέλιξη των πρόδρομων μορφών των οστεοκλαστών και προκαλεί την απόπτωσή τους, μπλοκάροντας ουσιαστικά τη σύνδεση RANKL-RANK και κατά συνέπεια τις διαδικασίες που αυτή η σύνδεση επάγει, όπως αναφέρθηκαν προηγουμένως.

Ο **M-CSF** (macrophage colony-stimulating factor) αφού προσδεθεί στον υποδοχέα του c-FMS (Colony-stimulating Factor-1 Receptor) σε προγονικά κύτταρα οστεοκλαστών, λειτουργεί ως κύριος ρυθμιστής αυτών των αποικιών από κύτταρα οστεοκλαστών.

Σύμφωνα με τη "θεωρία Σύγκλισης" (**Convergence hypothesis**) οι OPG και RANKL μπορούν να λειτουργήσουν ως μεσολαβητές επάγοντας ή αναστέλλοντας τη δράση ορμονών, αναπτυξιακών παραγόντων και κυτοκινών κατά την οστεοκλαστογένεση. Έτσι ανάλογα με την αναλογία που προκύπτει από τη συγκέντρωσή τους μπορούν να καθορίσουν το ρυθμό της διαφοροποίησης, της ενεργοποίησης και της απόπτωσης των οστεοκλαστών<sup>16,17</sup>.

	RANKL	OPG
Μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας-β (TGF-β)	—	↑
Παραθυρεοειδής ορμόνη (PTH)	↑	↓
1.25(OH) <sub>2</sub> Βιταμίνη D <sub>3</sub>	↑	—
Γλυκοκορτικοειδή	↑	↓
Οιστρογόνα	—	↑
Βασικός ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας 2 (FGF2)	↑	↓
Προσταγλανδίνη E <sub>2</sub>	↓	↑

Εικόνα 7. Συνοπτική αναφορά της επίδρασης παραγόντων (κυτοκινών και ορμονών) στην οστική ανακατασκευή μέσω της δράσης τους στην έκκριση του RANKL και της OPG<sup>4</sup>.



## Οστεοπόρωση

Σύμφωνα με την ΕΕΜΜΟ, της Ελληνικής Εταιρείας Μελέτης Μεταβολισμού των Οστών, «η Οστεοπόρωση («πορώδες» οστό) είναι η νόσος που χαρακτηρίζεται από χαμηλή οστική μάζα και δομική εκφύλιση του οστίτη ιστού, η οποία οδηγεί σε ευθραυστότητα του οστού και το κάνει ευάλωτο σε κατάγματα, ιδιαίτερα στο ισχίο, τη σπονδυλική στήλη και τον καρπό, χωρίς να αποκλείονται άλλες θέσεις προσβολής»<sup>18</sup>. Η ετυμολογία της λέξης σχετίζεται με τη σύνθεση των λέξεων «οστό» και «πόρωση», δηλαδή διάτριση ή αλλιώς δημιουργία πόρων (τρυπών). Η οστεοπόρωση αποτελεί ένα από τα πιο δαπανηρά νοσήματα για τις ασφαλιστικές εταιρίες και τους παρόχους υγείας σε παγκόσμιο επίπεδο. Στο Ηνωμένο Βασίλειο το Εθνικό Σύστημα Υγείας (NHS) δαπανά περίπου 2 δισεκατομμύρια λίρες, στις ΗΠΑ το Εθνικό Ίδρυμα Οστεοπόρωσης (National Osteoporosis Foundation) υπολογίζει ότι το άμεσο κόστος για την οστεοπόρωση κυμαίνεται στα 17 δισεκατομμύρια δολάρια, στην Αυστραλία το κόστος των νοσηλείων ασθενών με οστεοπόρωση αγγίζει το 1,5 δισεκατομμύρια δολάρια Αυστραλίας, ενώ το κόστος των ασθενών που δε χρειάζεται να νοσηλευτούν είναι επιπρόσθετα 1 δισεκατομμύριο δολάριο Αυστραλίας<sup>19</sup>.

Η οστεοπόρωση εμφανίζεται ως πρωτογεννής ή δευτερογεννής. Η πρωτογεννής αποτελεί τη συχνότερη μορφή, η οποία περιλαμβάνει τη μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση (Τύπος I) και τη γεροντική μορφή (Τύπος II). Η δευτερογεννής μορφή σχετίζεται με συγκεκριμένο αιτιολογικό παράγοντα όπως:

- Ενδοκρινολογικοί: ανδρικός υπογοναδισμός, υπερθυρεοειδισμός, υπερπαραθυρεοειδισμός, Σύνδρομο Cushing, σακχαρώδης διαβήτης.
- Αμηνόρροια: αθλητική αμηνόρροια, νευρική ανορεξία, υπερπρολακτιναιμία.
- Φάρμακα: στεροειδή, αναστολείς της αρωματάσης, αντισπασμωδικά φάρμακα, ηπαρίνη.
- Νεοπλάσματα: πολλαπλό μυέλωμα, σκελετικές μεταστάσεις.

- Άλλες παθήσεις: μεταμόσχευση, χειρουργείο στο γαστρεντερικό, κοιλιοκάκη, φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, αλκοολισμός, οστεοπόρωση σχετιζόμενη με την εγκυμοσύνη, νεφρική νόσος, ακινησία, ρευματοειδής αρθρίτιδα ή άλλη νόσος του συνδετικού ιστού, ατελής οστεογένεση, ομοκυστινουρία, συστηματική μαστοκυττάρωση.

Η πρωτοπαθής σχετιζόμενη με την ηλικία οστεοπόρωση ή αλλιώς γεροντική (τύπου II) συναντάται σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας και οφείλεται κυρίως στην υπολειτουργία των οστεοβλαστών και στην ανισορροπία που προκαλείται ανάμεσα στην απορρόφηση και οστεογένεση, που οδηγεί στη μείωση της οστικής πυκνότητας του οστού. Η συγκεκριμένη μορφή οστεοπόρωσης επηρεάζει και το φλοιώδες αλλά και το σπογγώδες οστό. Και οι δύο μορφές (I & II) ενδέχεται να προκαλέσουν οστεοποροτική συμπίεση σπονδύλων, άπω κερκίδα, ή κατάγματα ισχίου εσωτερικά του τροχαντήρα, όμως ασθενείς με τύπου II νόσο είναι πιθανόν να βρίσκονται σε ακόμη μεγαλύτερο κίνδυνο για την πρόκληση και καταγμάτων σε περιοχές οστών που σχετίζονται με το φλοιώδες οστό, όπως ο αυχένας του μηριαίου, η πύελος, ο εγγύς βραχίονας και η εγγύς κνήμη <sup>20</sup>.

Παράγοντες που σχετίζονται με την ανάπτυξη οστεοπόρωσης τύπου II διακρίνονται σε εσωτερικούς και εξωτερικούς. Οι εσωτερικοί αποτελούν: το γενετικό υπόβαθρο, η μέγιστη οστική πυκνότητα, ορμονικοί, βιοχημικοί και η κατάσταση της αγγείωσης του οστού. Η μέγιστη οστική πυκνότητα που επιτυγχάνεται σε ηλικίες μεταξύ των 16 και 25 ετών στους περισσότερους ανθρώπους καθορίζει τις πιθανότητες εμφάνισης οστεοπόρωσης στο μέλλον. Όσο πιο μεγάλη είναι η μέγιστη οστική πυκνότητα που έχει επιτευχθεί, τότε τόσο λιγότερες πιθανότητες έχει το συγκεκριμένο άτομο να αναπτύξει οστεοπόρωση αργότερα στη ζωή του. Ύστερα από αυτή την ηλικία η οστική πυκνότητα μειώνεται αργά και σταδιακά συνεχόμενα <sup>20</sup>. Οι εξωτερικοί παράγοντες αφορούν στην κακή διατροφή και κυρίως έλλειψη ασβεστίου, λιγότερη άσκηση και δραστηριότητα, συνυπάρχοντα νοσήματα και λήψη φαρμάκων, καταστάσεις οι οποίες συναντώνται σε μεγαλύτερες ηλικίες, όπως και η μείωση των οιστρογόνων δευτερογενώς οδηγούν στην αυξημένη απορρόφηση και ταυτόχρονα τη μειωμένη ανάπτυξη του οστού <sup>21</sup>.

## Μετεμμηνοπαυσιακή Οστεοπόρωση

Η πρωτοπαθής μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση (τύπου I) προσβάλλει κατά κύριο λόγο μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες ηλικίας 50-65, προσβάλλοντας κυρίως το σπογγώδες οστό των σπονδυλικών σωμάτων. Η διακοπή της λειτουργίας των ωοθηκών ακολουθείται από τη μείωση των επιπέδων των οιστρογόνων κατά την εμμηνόπαυση, με αποτέλεσμα τη γρήγορη απώλεια οστού στις γυναίκες. Τη συγκεκριμένη περίοδο της ζωής τους, η 17-β-οιστραδιόλη μειώνεται κατά 85 με 90% και η οιστρόνη στον ορό του αίματος κατά 65 με 75%.

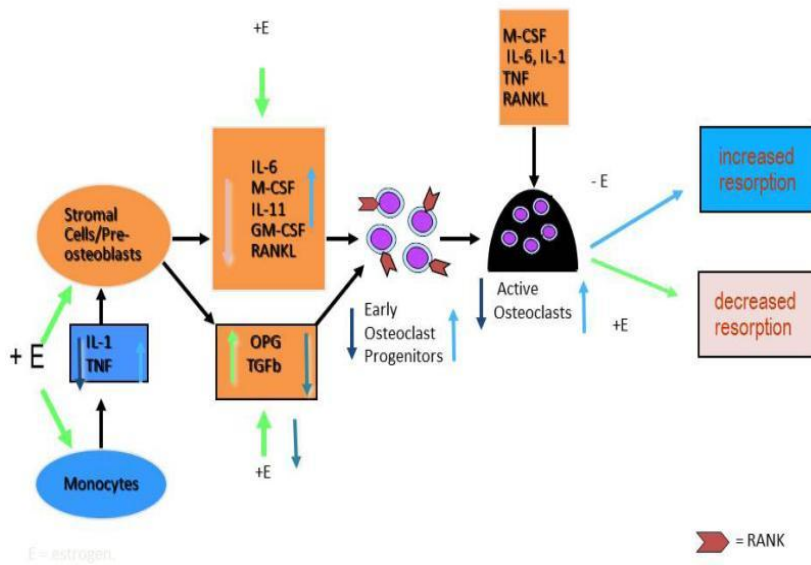
Σύμφωνα με τον Demontiero τα οιστρογόνα:

- αναστέλλουν τη δημιουργία των οστεοκλαστών όπως και επιδρούν αρνητικά στη δραστηριότητά τους, αυξάνοντας την παραγωγή της OPG (μπλοκάροντας τη σύνδεση RANKL/RANK) ή του παράγοντα TGF-β (προκαλεί την απόπτωση των οστεοκλαστών).
- Καταστέλλουν την παραγωγή του RANKL από τις οστεοβλάστες και τα T- και B-λεμφοκύτταρα.
- Διεγείρουν την απόπτωση των προγονικών κυττάρων των οστεοκλαστών και μπλοκάροντας τη σύνδεση RANKL/ M-CSF μειώνουν τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστικών προγονικών κυττάρων
- Μειώνουν έμμεσα την απορρόφηση του οστού, καταστέλλοντας την παραγωγή οκυτοκινών, όπως (IL)-1, IL-6, TNF-α, M-CSF και των προσταγλανδινών.
- Έχουν τη δυνατότητα να αναστέλλουν τη δραστηριότητα των ώριμων οστεοκλαστών άμεσα μέσω μηχανισμών που σχετίζονται με τη δράση ειδικών υποδοχέων <sup>21</sup>.

Έτσι κατά την εμμηνόπαυση, η κατακόρυφη μείωση των οιστρογόνων επηρεάζει το φυσιολογικό κύκλο, διεγείροντας τελικά τη δράση των οστεοκλαστών, δηλαδή αυξάνει την οστική απορρόφηση, χωρίς όμως μία αντίστοιχη αύξηση στη δράση των οστεοβλαστών.

Με αυτόν τον τρόπο η ποσότητα του οστού που απορροφάται είναι μεγαλύτερη από αυτήν που εναποτίθεται, οδηγώντας σε σημαντική **οστική απώλεια**. Αυτή η διαδικασία που δε χαρακτηρίζεται πια από την ομαλή και αμονική συνεργασία οστεοκλαστών και οστεοβλαστών ονομάζεται **αντισύζευξη** (uncoupling).

### Effect of Estrogen on Bone Resorption



Εικόνα 8. Η επίδραση των οιστρογόνων στη διαδικασία οστικής απορρόφησης <sup>9</sup>.

### Εμμηνόπαυση

Το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα σχετίζεται με μηνιαίους κύκλους ωοθυλακικής ωορρηξίας. Εμμηνόπαυση είναι το αποτέλεσμα της εξάντλησης των αποθεμάτων των ωοθυλακίων των ωοθηκών και ακολουθείται από διάφορες συνέπειες. Τα στάδια της εμμηνόπαυσης είναι:

- **προ-εμμηνόπαυση**, η οποία εμφανίζεται σχετικά ξαφνικά, χρονικό διάστημα το οποίο μπορεί κατά περίπτωση να αυξηθεί μέχρι και τρία με πέντε έτη. Στις περισσότερες γυναίκες εμφανίζεται μειωμένα ή/και αυξημένα τα εμμηνοροϊκά διαστήματα, παρατηρείται αύξηση της FSH, που σχετίζεται με τη μείωση του πεπτιδίου της ινχιπίνης και με τα μειωμένα επίπεδα των οιστρογόνων. Κατά τη συγκεκριμένη φάση εμφανίζονται επίσης μειωμένη γονιμότητα και αυξημένος κίνδυνος για ανάπτυξη γενετικών ανωμαλιών του εμβρύου.
- **εμμηνόπαυση**, όπου κατά τη διάρκεια των ωοθηκών κύκλων τα επίπεδα των οιστρογόνων είναι ανεπαρκή και δεν είναι σε θέση να οδηγήσουν στις κατάλληλες αλλαγές το ενδομήτριο, με αποτέλεσμα η εμμηνόρροια να σταματά. Αυτό συμβαίνει κατά την ηλικία των 50 ετών.
- **κλιμακτήριος**, είναι η μεταβατική περίοδος από την λειτουργία του ώριμου αναπαραγωγικού συστήματος προς την ανυπαρξία ωοθηκικής λειτουργίας. Η συγκεκριμένη περίοδος είναι πολύ δύσκολη περίοδος για πολλές γυναίκες οι οποίες αντιμετωπίζουν διάφορα συμπτώματα, όπως κατά κύριο λόγο εξάψεις, νυχτερινές εφιδρώσεις, κολπική ξηρότητα, διαταραχές ύπνου και συγκέντρωσης, μεταβολές της διάθεσης, κατάθλιψη, μείωση σεξουαλικής επιθυμίας, αύξηση βάρους.

### Ενδιαφέρουσες μελέτες που επηρέασαν τις θεραπείες της οστεοπόρωσης

Η ορμονική θεραπεία υποκατάστασης έχει στοχοποιηθεί για την πρόκληση καρδιαγγειακών και νεοπλασματικών νόσων. Με χρονολογική σειρά αναφέρονται εδώ μερικές βασικές μελέτες σχετικές με αυτήν την υπόθεση. Το 1997 μία μετανάλυση λαμβάνοντας υπόψη 51 προηγούμενες εργασίες αναδεικνύει συσχετισμό μεταξύ του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού και της διάρκειας λήψης της ορμονοθεραπείας. Αυτός ο κίνδυνος μειώνεται μετά τη διακοπή της θεραπείας και εκμηδενίζεται μετά από πέντε έτη<sup>22</sup>.

Μία ακόμη ενδιαφέρουσα μελέτη σχετικά με τη μακροχρόνια επίδραση της ορμονικής θεραπείας υποκατάστασης έλαβε χώρα με την βοήθεια νοσοκόμων. 122.000 αμερικανίδες νοσοκόμες ηλικίας 30-55 ετών συμμετείχαν στη συγκεκριμένη μελέτη, είτε λάμβαναν τη συγκεκριμένη θεραπεία είτε όχι. Η στεφανιαία καρδιακή νόσος ήταν το βασικό σημείο έρευνας της συγκεκριμένης μελέτης και όπως αποδείχτηκε η θεραπεία είχε θετική επίδραση ως προς το συγκεκριμένο παράγοντα, ενώ ταυτόχρονα παρατηρήθηκε αυξημένος κίνδυνος καρκίνου του μαστού<sup>23,24,25</sup>.

Άλλη μία σημαντική μελέτη είναι η «καρδιά και η θεραπεία αντικατάστασης με οιστρογόνο/προγεστερόνη (HERS -The Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study). Ήταν η πρώτη μελέτη που περιελάμβανε κλινικά τελικά σημεία και ο σχεδιασμός της ήταν με σκοπό να ερευνηθεί κατά πόσο καρδιακά επεισόδια σε γυναίκες με στεφανιαία καρδιακή νόσο θα μπορούσαν να μειωθούν με την ορμονική θεραπεία αντικατάστασης. Η διάρκεια αυτής της μελέτης ήταν τέσσερα χρόνια, συμμετείχαν περισσότερες από 2500 γυναίκες (μετεμηνόπαυσιακή περίοδος) ηλικίας 50 με 79 ετών που είχαν προηγουμένως τους είχε παρουσιαστεί σχετικό καρδιακό επεισόδιο. Η μία ομάδα θεραπείας λάμβανε οιστρογόνα και προγεστερόνη καθημερινά, ενώ η ομάδα ελέγχου εικονικό φάρμακο (placebo) καθημερινά. Στα αποτελέσματα, και στις δύο ομάδες παρατηρήθηκαν θάνατοι που οφείλονταν στη στεφανιαία νόσο χωρίς συνολική στατιστική διαφορά στο σύνολο των τεσσάρων ετών της μελέτης, αλλά ενδιαφέρον εύρημα αποτέλεσε ότι η ομάδα θεραπείας εμφάνισε αυξημένο αριθμό θανάτων την πρώτη χρονιά και μειωμένο τα επόμενα τρία χρόνια σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Σε πολλές περιπτώσεις οι ίδιες θεραπείες συνεχίστηκαν μέχρι και οχτώ χρόνια (χωρίς να αποκρύπτεται η ουσία που λάμβαναν οι δύο ομάδες), χωρίς όμως και πάλι να αναδειχθεί θετική επίδραση από τη θεραπεία, σχετικά με την στεφανιαία νόσο<sup>26,27,28</sup>.

Τέλος, αλλά πολύ σημαντική είναι η μεγαλύτερη μελέτη που έχει λάβει χώρα, η WHI (The Women's Health Initiative Study). Ουσιαστικά αποτελείται από δύο υπομελέτες, οι οποίες ακολούθησαν την ίδια μεθοδολογία. Και οι δύο αφορούν σε γυναίκες στην εμμηνόπαυση, ηλικίας 50 με 79 ετών, οι οποίες δεν εμφάνισαν σοβαρά εμμηνόπαυσιακά συμπτώματα, έτσι ώστε να είναι εφικτό για κάποιες από αυτές να λάβουν εικονικό φάρμακο

(placebo), αν χρειαστεί, για πολλά χρόνια. Αξίζει να σημειωθεί εδώ ότι και οι δύο υπομελέτες χρειάστηκε να διακοπούν νωρίτερα (6.8 και 5.2 έτη) από το προκαθορισμένο χρονικό διάστημα (8.5 έτη και για τις δύο) ύστερα από απόφαση της επιτροπής ελέγχου. Για την πρώτη υπομελέτη επιλέχθηκαν περισσότερες από 10.000 γυναίκες που είχαν υποστεί υστερεκτομή και οι μισές από αυτές έλαβαν θεραπεία με οιστρογόνο ενώ οι άλλες μισές εικονικό φάρμακο (placebo). Στα αποτελέσματα, παρατηρήθηκε μη στατιστικά σημαντική μείωση στον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού και στεφανιαίας νόσου, μη στατιστικά σημαντική αύξηση στον κίνδυνο εμφάνισης θρομβοεμβολής, στατιστικά σημαντική μείωση στην εμφάνιση οστεοπορωτικού κατάγματος, αλλά αυξημένο κίνδυνο εγκεφαλικού επεισοδίου. Η δεύτερη υπομελέτη με περισσότερες από 16.000 γυναίκες, που δεν είχαν υποστεί υστερεκτομή και έλαβαν συνδυασμό προγεστερόνης/οιστρογόνου ή εικονικό φάρμακο (placebo). Τα αποτελέσματα εδώ εμφάνισαν μειωμένο κίνδυνο οστεοπορωτικού κατάγματος, αλλά μη στατιστικά σημαντική αύξηση του κινδύνου για καρκίνο του μαστού, εμφράγματος και εγκεφαλικού επεισοδίου <sup>29,30</sup>. Ουσιαστικά τα ευρήματα, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η ορμονική θεραπεία υποκατάστασης, όταν χορηγείται σύντομα μετά την έναρξη της εμμηνόπαυσης (μέσα στα πρώτα πέντε έτη) επιφέρει περισσότερα οφέλη (μείωση των ανεπιθύμητων και δυσάρεστων συμπτωμάτων της οστεοπόρωσης, μείωση του κινδύνου οστεοπορωτικού κατάγματος, άνοιας, καρκίνου του πρωκτού και του κόλου, επίσης βελτίωση της ποιότητας ζωής, της ευζωίας, μέσω της καλύτερης ποιότητας του επιθηλίου του αιδοίου και της χωρητικότητας της ουροδόχου κύστεως, μειωμένα επεισοδια ισχαιμίας του μυοκαρδίου και τελικά αυξημένο προσδόκιμο ζωής) παρά προβλήματα υγείας, όπως αυτά αναφέρθηκαν προηγουμένως. Η επιλεκτική ή μερική ανάγνωση των αποτελεσμάτων των εργασιών που έχουν διενεργηθεί και η πιθανή παρερμηνία κάποιων τμημάτων οδήγησε πολλές γυναίκες στην επιλογή να αποφύγουν τη συγκεκριμένη θεραπεία και να ανατρέξουν σε άλλες μεθόδους αντιμετώπισης των συμπτωμάτων και των παθήσεων που ενδέχεται να προκαλέσει η εμμηνόπαυση <sup>31</sup>.

## Επιδημιολογία της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης

Μόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής υπολογίζεται ότι σχεδόν 2 εκατομμύρια κατάγματα, τα οποία σχετίζονται με την οστεοπόρωση λαμβάνουν χώρα κάθε χρόνο. Στην Ευρώπη έχει υπολογιστεί ότι περισσότερο από 30% των γυναικών ηλικίας 50 ετών και άνω έχουν οστεοπόρωση, σύμφωνα με τον ορισμό του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO), με τα ποσοστά εμφάνισης καταγμάτων κατά τη διάρκεια της ζωής αυτών των γυναικών να είναι σε 14% για κάταγμα ισχίου, 11% για κάταγμα σπονδύλου και 13% για κάταγμα άπω πήχχεως. Ο αριθμός των καταγμάτων οστεοπόρωσης την Ευρώπη το 2000 είχε εκτιμηθεί σε 3,79 εκατομμύρια <sup>32</sup>.

Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι πτώσεις είναι το κυριότερο χαρακτηριστικό που οδηγεί στο κάταγμα. Ο λόγος ως προς το φύλο (γυναίκες προς άνδρες) για τα κατάγματα του μηριαίου είναι σκεδόν δύο προ ένα (2:1) <sup>33</sup>. Η συχνότητα αυτών των καταγμάτων αυξάνεται σημαντικά με την ηλικία. Σε αντίθεση η συχνότητα των καταγμάτων του αντιβραχίου στο Ηνωμένο Βασίλειο και στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής ποικίλλει από 400-800 ανά 100.000 γυναικών ανά έτος, αλλά παραμένει σχετικά σταθερή κατά αρκετές δεκαετίες της μεσήλικης ζωής τους <sup>33</sup>. Επίσης, σύμφωνα με υπολογισμούς περισσότερες από πένα εκατομμύριο αμερικανίδες, κατά τη μετεμμηνοπαυσιακή ζωή τους είναι πιθανό να υποστούν κάταγμα σπονδύλου κάθε έτος <sup>34</sup>. Τέλος, σύμφωνα πάλι με υπολογισμούς ο αριθμός ανδρών και γυναικών χωρίς κάταγμα, αλλά με χαμηλό δείκτη BMD (-2,5 ή λιγότερο) κυμαίνεται γύρω στους 25 εκατομμύρια κατοίκους της Αμερικής ανά πάσα στιγμή <sup>35</sup>.

## Διάγνωση μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης

Στη σύγχρονη εποχή η διάγνωση της οστεοπόρωσης γίνεται με τη χρησιμοποίηση της μεθόδου DXA (dual energy X-ray absorptiometry, δηλαδή διπλής ενέργειας



απορροφησιμετρία ακτίνων Χ), η οποία στην αρχική της μορφή ονομαζόταν SXA<sup>36</sup>. Η κυριότερη μέθοδος, η οποία συνίσταται από το διεθνή οργανισμό οστεοπόρωσης (International Osteoporosis Foundation) είναι η DXA του ισχίου<sup>37</sup>. Στη σύγχρονη υπάρχουν όμως και άλλες, πιο σύγχρονες μέθοδοι όπως η πλευρική DXA για την αξιολόγηση σπονδυλικού κατάγματος (lateral DXA for VFA), ποσοτικοποιημένο υπερηχογράφημα (QUS, quantitative ultrasound), περιφερική ποσοτική αξονική τομογραφία (pQCT, peripheral quantitative computed tomography) and περιφερική DXA (pDXA, peripheral DXA). Οι περιφερικές μέθοδοι αφορούν στον έλεγχο περιφερικών τμημάτων του σκελετού όπως ο καρπός, τα δάχτυλα, η πτέρνα και το κατώτερο μέρος του πήχη<sup>18</sup>. Άλλα μέσα που συχνά υποβοηθούν την διάγνωση του συγκεκριμένου νοσήματος αποτελούν ακτινογραφίες, μαγνητική τομογραφία (MRI) και αξονική τομογραφία (CT).

### **Dual Energy X-ray Absorptiometry (DEXA)**

Η μέθοδος διπλής ενεργειακής απορρόφησης (DEXA -Dual energy X-ray absorptiometry) είναι η μέθοδος εκλογής για τον προσδιορισμό της οστικής πυκνότητας (BMD—Bone Mineral Density), η οποία επιτρέπει την ακριβή διάγνωση της οστεοπόρωσης, τον προσδιορισμό του κινδύνου κατάγματος και την παρακολούθηση των ασθενών που βρίσκονται υπό θεραπεία. Η συγκεκριμένη μέθοδος εκτελείται σχετικά εύκολα, είναι διαθέσιμη και εύκολα προσβάσιμη και η δόση της ακτινοβολίας που χρησιμοποιείται είναι χαμηλή.

Με τη μέθοδο αυτή αρχικά υπολογίζεται η οστική μάζα BMC (g) και στη συνέχεια το λογισμικό υπολογίζει αυτόματα την οστική πυκνότητα (BMD, g/cm<sup>2</sup>). Ουσιαστικά διαιρεί την οστική μάζα (BMC,g) με το εμβαδόν της περιοχής ενδιαφέροντος (ROI, cm<sup>2</sup>) που εμείς έχουμε προκαθορίσει. Ο τεχνικός πρέπει να είναι ιδιαίτερα προσεκτικός κατά την τοποθέτηση του ασθενή, γιατί κύριος λόγος ανακριβών και αναξιόπιστων αποτελεσμάτων BMD είναι τεχνικά παράσιτα (artifacts) που προκύπτουν κυρίως από την κακή στάση του ασθενή κατά τη λήψη προβολών. Επίσης αντίστοιχα προσεκτικός πρέπει να είναι ο χειριστής κατά την τοποθέτηση

των ROIs (regions of interest, ή περιοχών ενδιαφέροντος), η οποία μπορεί να επηρεάσει το αποτέλεσμα δραματικά και απαιτείται η όσον το δυνατόν πιο αντικειμενική τοποθέτηση τους.

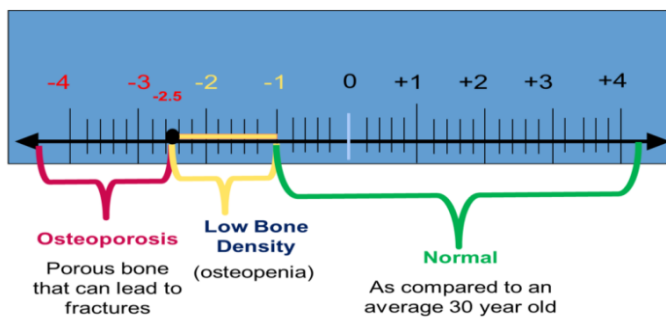
Σύμφωνα με την ομάδα εργασίας το 1994 του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO) η διάγνωση και η θεραπευτική αντιμετώπιση ασθενών με οστεοπόρωση καθορίζεται ύστερα από τον υπολογισμό των T- και Z- score. Η τιμή του T-score προκύπτει αυτόματα από ειδικό λογισμικό, το οποίο συγκρίνει την τιμή BMD ενός ατόμου μία συγκεκριμένη χρονική στιγμή σε σχέση με τη μέση τιμή ατόμων ίδιου φύλου και εθνικότητας, με τη χρησιμοποίηση συγκεκριμένης βάσης δεδομένων. Έτσι, για παράδειγμα, αν ένας ασθενής έχει T-score -1.0, σημαίνει ότι η οστική του πυκνότητα είναι 1 μονάδα βάσης κάτω από τη μέση τιμή των νεαρών ατόμων (30χρονων υγιών ενήλικων). Στην κλινική πράξη το T-score χρησιμοποιείται ευρέως για τη διάγνωση της οστεοπόρωσης σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και σε άντρες άνω των 50 ετών.

Κατηγορία οστικής πυκνότητας	T-Scores	
	T-score	Παραδείγματα
Φυσιολογικό	-1 και υψηλότερο	+1.0 +0.5 0 -0.5 -1.0
Χαμηλή οστική πυκνότητα (οστεοπενία)	-1.1 έως -2.4	-1.1 -1.5 -2.0 -2.4
Οστεοπόρωση	-2.5 και χαμηλότερο	-2.5 -3.0 -3.5 -4.0

Πίνακας 1. Οι τρεις βασικές κατηγορίες κατάταξης των ασθενών χρησιμοποιώντας το T-score , σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας <sup>18</sup> .

### Understanding Bone Density Results

© American Bone Health | September 28, 2016



Εικόνα 9. Σχηματική απεικόνιση της ερμηνείας του T-score στην κλινική πράξη <sup>38</sup> .

Στην περίπτωση των νεότερων γυναικών (προεμμηνόπαυσιακών) και ανδρών από την ηλικία των 50 ετών χρησιμοποιείται το Z-score για την αξιολόγηση της κατάστασης των οστών, το οποίο υπολογίζεται με τον ίδιο ακριβώς τρόπο που υπολογίζεται και η τιμή T-score, αλλά αυτή τη φορά το λογισμικό συγκρίνει τη διαφορά της τιμής BMD του εξεταζόμενου ατόμου σε σχέση με τη μέση τιμή πληθυσμού ατόμων της ίδιας ηλικίας, φυλής και φύλου. Σύμφωνα με την ISCD (International Society for Clinical Densitometry) φυσιολογικό θεωρείται το Z-score όταν είναι μεγαλύτερο του -2.0. Φυσιολογικά ή μέσα στα φυσιολογικά πλαίσια αλλά χαμηλά T-score και Z-score δεν αποκλείουν την ανάγκη λήψης θεραπείας, απόφαση την οποία καλείται να λαμβάνει ο θεράπων ιατρός συνυπολογίζοντας και άλλους παράγοντες.

### **Εκτίμηση καταγματικού κινδύνου (FRAX, Fracture Risk Assessment Tool)**

Τα άτομα με χαμηλή οστική πυκνότητα ή αλλιώς οστεοπενία (T-score -1 έως -2.5) πρέπει να λάβουν φαρμακευτική αγωγή, αν συνυπάρχουν προδιαθεσικοί παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο για οστεοπόρωση και κάταγμα. Στην περίπτωση αυτή ο δείκτης FRAX χρησιμοποιείται από το θεράποντα ιατρό σχετικά με το αν χρειάζεται να χορηγηθεί φαρμακευτική αγωγή ή όχι. Ο δείκτης FRAX ουσιαστικά υπολογίζει τον κίνδυνο που διατρέχει ένας ασθενής να υποστεί κάταγμα του ισχίου τα επόμενα 10 έτη.

### **Αδυναμίες του δείκτη FRAX**

Σύμφωνα με τη Διεθνή Εταιρία Πυκνομετρίας (ISCD, International Society for Clinical Densitometry) ο δείκτης FRAX πρέπει να χρησιμοποιείται με προσοχή στις ακόλουθες περιπτώσεις<sup>39</sup>.

Ο δείκτης FRAX είναι πιθανό να υποτιμήσει την πιθανότητα/κίνδυνο κατάγματος:

- σε ασθενείς με **ρευματοειδή αρθρίτιδα**. Ακόμη και στην περίπτωση που οι συγκεκριμένοι ασθενείς λαμβάνουν ότι θεραπείες χωρίς γλυκοκορτικοειδή για τη ρευματοειδή αρθρίτιδα, δεν υπάρχει σαφής απόδειξη ότι αυτό επηρεάζει τον κίνδυνο κατάγματος.
- στην περίπτωση ατόμων με **πολλαπλά προηγούμενα κατάγματα**, όπως και στην περίπτωση ατόμων με **προηγούμενα σοβαρά σπονδυλικά κατάγματα**.
- Όταν υπάρχει **οικογενειακό ιστορικό** κατάγματος ευθραυστότητας, εκτός του μηριαίου οστού.
- Την περίπτωση ενδείξεως οστικής απορρόφησης από τη μέτρηση δεικτών οστικής απορρόφησης (αφού η συγκεκριμένη ένδειξη δε λαμβάνεται υπόψιν).
- Σε περιπτώσεις χρόνιας χορήγησης γλυκοκορτικοειδών (μεγαλύτερης των 3 μηνών), ο κίνδυνος ανάπτυξης κατάγματος υποτιμάται όταν η δόση της **πρεδνιζόνης** είναι μεγαλύτερη από 7,5 mg ανά ημέρα, ενώ υπερεκτιμάται όταν είναι χαμηλότερη από 2,5 mg ανά ημέρα.
- Κατά χορήγηση αυξημένης δόσης εισπνευστικών γλυκοκορτικοειδών.

Ενώ είναι γνωστό ότι υπάρχει επίδραση στην πιθανότητα/κίνδυνο ανάπτυξης κατάγματος, δεν είναι όμως εφικτή η ποσοτικοποίηση αυτού του κινδύνου:

- Σχετικά με το **κάπνισμα**, το οποίο ανάλογα με τη διάρκεια και την δόση στην οποία εκτίθεται κάποιος, αποτελεί στοιχείο που επηρεάζει τον κίνδυνο ανάπτυξης κατάγματος.
- Σχετικά με τον **αριθμό των πτώσεων** ενός συγκεκριμένου ατόμου
- Έχει αποδειχθεί ότι τα κατάγματα ισχίου, τα σπονδυλικά κατάγματα ή τα κατάγματα βραχιονίου προσδίδουν **μεγαλύτερο κίνδυνο επακόλουθου κατάγματος** από ό,τι συμβαίνει στην περίπτωση κατάγματατων σε άλλα σημεία, χωρίς όμως η ποσοτικοποίηση του επιπρόσθετου κινδύνου αυτού να είναι εφικτή.

- Καθώς στην κλινική πράξη οι **δόσεις των γλυκοκορτικοειδών** μεταβάλλονται συχνά όπως και το **πρόγραμμα χορήγησης** τους.
- Σε ασθενείς που τους χορηγείται θεραπεία αντικατάστασης γλυκοκορτικοειδών με **επινεφριδιακή ανεπάρκεια**, ενώ δεν έχει αποδειχθεί ότι αυτή η χορήγηση αυξάνει τον κίνδυνο κατάγματος, αυτή δεν θα έπρεπε να λαμβάνεται υποψιν κατά τον έλεγχο του FRAX.

Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν είναι κατάλληλο να χρησιμοποιούμε το δείκτη FRAX για να παρακολουθούμε την θεραπευτική πορεία του ασθενή. Η μεταβολή των ποσοστών των καταγμάτων και της θνησιμότητας είναι μεταβαλλόμενες, γι' αυτό θα πρέπει το μοντέλο FRAX να ανανεώνεται συχνά. Η ακρίβεια του FRAX βελτιώνεται με την εισαγωγή των τιμών που σχετίζονται με την χώρα, την ηλικία και το φύλο, σχετικά με τα κύρια οστεοπορωτικά κατάγματα, όπως κλινικά σπονδυλικά, κατάγματα βραχιονίου οστού και απω αντιβραχίου. Στην περίπτωση έλλειψης υψηλής ποιότητας εθνικών δεδομένων σχετικά με τα κατάγματα μηριαίου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν αρχεία από μία αντίστοιχη-κοντινή χώρα, ώστε να χτιστεί για αρχή ένα αρχικό FRAX μοντέλο. Το ίδιο ισχύει και για τις τιμές θνησιμότητας<sup>37</sup>.

Μερικά ιατρικά μηχανήματα που διενεργούν μέτρηση οστικής πυκνότητας έχουν την δυνατότητα να χρησιμοποιούν τον FRAX και να τον καταγράφουν. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) παρέχει μία ανοικτή-δωρεάν εφαρμογή (FRAX-app) στο διαδίκτυο που δίνει στους θεράποντες ιατρούς και τους ασθενείς την παραπάνω δυνατότητα.

## Άλλες εργαστηριακές εξετάσεις

Συχνά η επιλογή από το θεράποντα ιατρό για τη λήψη ή μη θεραπείας για την πρόληψη ή τη θεραπεία της οστεοπενίας ή οστεοπόρωσης συνεπικουρείται από περαιτέρω εργαστηριακές εξετάσεις όπως: επίπεδα ασβεστίου και φωσφόρου στο αίμα, μέτρηση ασβεστίου και φωσφόρου από ούρα 24ώρου, θυρεοειδικές ορμόνες, επίπεδα οιστρογόνων (ή

ανδρογόνων/ τεστοστερόνης), 25-υδροξύ-βιταμίνης D, βιοχημικοί δείκτες, όπως NTX και CTX (τελοπεπτίδια του κολλαγόνου τύπου 1, που αποτελούν δείκτες οστικής απορρόφησης).

## Θεραπεία μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης

Οι "Κατευθυντήριες γραμμές Οστεοπόρωσης για τη διάγνωση και αντιμετώπιση της στην Ελλάδα" από το Ελληνικό Ίδρυμα Οστεοπόρωσης (ΕΛΙΟΣ) διατυπώνουν με σαφήνεια τις περιπτώσεις που αποτελούν ένδειξη αγωγής, οποιαδήποτε από αυτές αν ισχύει: α) Σπονδυλικό κάταγμα χαμηλής βίας, β) Κάταγμα ισχίου χαμηλής βίας, γ) Περισσότερα από ένα έτερα κατάγματα χαμηλής βίας (π.χ. κάταγμα κερκίδας), δ) Μέτρηση οστικής πυκνότητας ισχίου (ολικό ισχίο ή αυχένιας μηριαίου) ή/και Ο.Μ.Σ.Σ. με T score  $\leq -2.5$ , ε) Μέτρηση οστικής πυκνότητας με T score μεταξύ  $-1.0$  και  $-2.5$  (οστεοπενία) αλλά με 10-ετή καταγματικό κίνδυνο (FRAX)  $\geq 10\%$  για μείζον οστεοπορωτικό κάταγμα ή/και  $\geq 2.5\%$  για κάταγμα ισχίου, για άτομα ηλικίας 50-75 ετών, στ) Μέτρηση οστικής πυκνότητας με T score μεταξύ  $-1.0$  και  $-2.5$  (οστεοπενία) αλλά με 10-ετή καταγματικό κίνδυνο (FRAX)  $\geq 15\%$  για μείζον οστεοπορωτικό κάταγμα ή/και  $\geq 5\%$  για κάταγμα ισχίου, για άτομα ηλικίας άνω των 75 ετών <sup>40</sup>.

## Κύριες φαρμακευτικές θεραπευτικές μέθοδοι

### Διφωσφονικά

Τα διφωσφονικά φάρμακα αποτελούν μία από τις κύριες κατηγορίες φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη για τη θεραπεία της οστεοπόρωσης. Από αυτή την κατηγορία φαρμάκων, συχνότερα στην Ελλάδα χρησιμοποιούνται σήμερα η αλεδρονάτη, η ιμπανδρονάτη, η ρισεδρονάτη (*per os*) και το ζολεδρονικό οξύ (*iv*). Ο μηχανισμός δράσης τους

βασίζεται στον περιορισμό της λειτουργίας των οστεοκλαστών, με αποτέλεσμα τον περιορισμό του ρυθμού οστικής ανακατασκευής, που οδηγεί στη μείωση της οστικής απορρόφησης, προστατεύοντας έτσι το οστό από την επικείμενη οστική απώλεια <sup>41</sup>. Τα διφωσφονικά αντενδείκνυται σε άτομα με υπερευαισθησία στην δραστική ουσία ή σε κάποιο έκδοχο, σε ασθενείς με προβλήματα το νεφρού και σε ασθενείς με υπασβεστιαμία. Κύριες ανεπιθύμητες ενέργειες αποτελούν η οισοφαγίτιδα, η γαστρίτιδα και τα έλκη του οισοφάγου ή του στομάχου. Επίσης, ναυτία και αντίδραση κατά τις πρώτες ημέρες μετά την χορήγηση έχουν αναφερθεί όπως πυρετός, αρθραλγία και μυαλγία <sup>40</sup>. Κατά τη χρόνια χορήγηση οι συχνότερες ανεπιθύμητες ενέργειες είναι η κολπική μαρμαρυγή, ο καρκίνος του οισοφάγου, η επιπεφυκίτιδα, η πρόσθια ραγοειδίτιδα και η σκληρίτιδα του οφθαλμού, η εμφάνιση ατύπων καταγμάτων του μηριαίου και σπανία η οστεονέκρωση της γνάθου <sup>42</sup>.

### **Εκλεκτικοί τροποποιητές των οιστρογονικών υποδοχέων (Selective Estrogen Receptor Modulators: SERMs)**

Η ραλοξιφαίνη αποτελεί το κυριότερο φάρμακο της κατηγορίας αυτής και λαμβάνεται από το στόμα. Ο μηχανισμός δράσης της βασίζεται στην προστασία του οστού από κατάγματα, αυξάνοντας την οστική πυκνότητα, δρώντας συναγωνιστικά με τα οιστρογόνα στο επίπεδο του οστού, αλλά ανταγωνιστικά στο επίπεδο του μαστού και της μήτρας <sup>40</sup>. Ως κύριες ανεπιθύμητες ενέργειες θεωρούνται οι εξάψεις, οι μυϊκές κράμπες και η αυξημένη εμφάνιση φλεβικής θρόμβωσης. Σύμφωνα με σύγχρονες μελέτες δεν φαίνεται αυξάνει τον κίνδυνο υπερπλασίας ή καρκίνου του ενδομητρίου <sup>43,44,45</sup>. Τέλος άλλα σύγχρονα φάρμακα που ανήκουν στην ίδια κατηγορία των SERMs και χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη, με παρόμοια δράση και χαρακτηριστικά είναι η βαζεδοξιφαίνη και η λασοφοξιφαίνη <sup>40,46</sup>.



Compound	Osteoblast	Adipocyte	Osteoclast
Bisphosphonates	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ differentiation</li> <li>↑ activity</li> <li>↓ apoptosis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ differentiation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ differentiation</li> <li>↓ activity</li> <li>↑ apoptosis</li> </ul>
Calcitonin			<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ activity</li> <li>↑ apoptosis</li> </ul>
PTH	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ activity</li> <li>↑ survival</li> <li>↑ differentiation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ differentiation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ activity</li> </ul>
SERMs			<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ differentiation</li> <li>↓ activity</li> </ul>
Strontium ranelate	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ activity</li> <li>↑ differentiation</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ activity</li> <li>↓ survival</li> </ul>
Vitamin D	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ activity</li> <li>↑ differentiation</li> <li>↓ apoptosis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ differentiation</li> <li>↑ trans-differentiation to osteoblasts</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ activity</li> </ul>
Denosumab			<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ differentiation</li> <li>↓ activity</li> <li>↑ apoptosis</li> </ul>

PTH, parathyroid hormone; SERM, selective estrogen-receptor modulator

Εικόνα 10. Η επίδραση των φαρμακευτικών θεραπειών της οστεοπόρωσης στα δομικά στοιχεία του οστού <sup>47</sup>.

## Ασβέστιο, βιταμίνη D

Το ασβέστιο, μέσω της διατροφής ή μέσω συμπληρωμάτων, θεωρείται απαραίτητο για τη σκελετική υγεία σε όλες τις ηλικίες. Η βιταμίνη D και οι μεταβολίτες της έχουν κύριο ρόλο στην απορρόφηση του ασβεστίου και είναι σημαντική για την ενδυνάμωση του μυϊκού συστήματος, που είναι σημαντικός παράγοντας της πρόληψης των πτώσεων <sup>40</sup>. Τα συμπληρώματα ασβεστίου και βιταμίνης D εμφανίζουν μικρής σημασίας ανεπιθύμητες ενέργειες, όταν χορηγούνται σε κανονικές δόσεις και συχνά αποτελούν μέρος συνδυαστικών φαρμακευτικών αγωγών, αλλά δεν έχει αποδειχτεί ότι μειώνουν τον κίνδυνο κατάγματος όταν χορηγούνται μόνα τους <sup>48</sup>.

## Αναβολική Θεραπεία

Η τεριπαρατίδη και η αμπαλοπαρατίδη αποτελούν συνθετικά ανάλογα της παραθορμόνης (PTH) και η διακοπτόμενη χορήγησή τους ενισχύει την οστική πυκνότητα, ιδιαίτερος στο σπογγώδες οστό, μέσω της επαγωγικής τους δράσης στους οστεοβλάστες. Η καταγματική τους δράση φαίνεται να υπερτερεί σε σχέση με άλλα αντιοστεοπορωτικά φάρμακα ως προς την πρόληψη των καταγμάτων<sup>49</sup>. Ανεπιθύμητες ενέργειες σχετίζονται με ναυτία, πόνο στα άκρα, κεφαλαλγία και ζάλη, ενώ έχουν ενοχοποιηθεί για την πρόκληση οστεοσάρκωματος<sup>40</sup>. Η χορήγηση γίνεται καθημερινά με υποδόριες ενέσεις, γεγονός που δυσχεραίνει την καθημερινότητα των ασθενών, και έτσι η σύγχρονη έρευνα επικεντρώνεται στη δημιουργία νέων μεθόδων χορήγησης. Σύμφωνα με τις οδηγίες, η μέγιστη διάρκεια χορήγησης δεν πρέπει να ξεπερνά τα δύο έτη<sup>50,51</sup>.

## Δενοσουμάμπη

Η δενοσουμάμπη (denosumab) αποτελεί ένα ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα, που αναστέλλοντας τον παράγοντα RANKL, επηρεάζει αρνητικά τη δράση και τη λειτουργικότητα των οστεοκλαστών. Με αυτόν τον τρόπο, ευνοεί τη διατήρηση υψηλότερης οστικής πυκνότητας του οστού, μειώνοντας τον κίνδυνο καταγμάτων σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Η χορήγηση γίνεται με υποδόρια ένεση κάθε έξι μήνες και θεωρείται απαραίτητη και ασφαλής συνεχόμενα για δέκα έτη<sup>40</sup>. Σε περίπτωση διακοπής πριν τα δέκα έτη συνίσταται η χορήγηση άλλης αντιοστεοπορωτικής αγωγής, ενώ απαιτείται παράλληλη χορήγηση ασβεστίου και βιταμίνης D. Ανεπιθύμητες ενέργειες παρατηρούνται σπάνια, κυρίως στο δέρμα, για παράδειγμα κυτταρίτιδα<sup>52</sup>.

## Ορμονική θεραπεία υποκατάστασης

Σε πολλές περιπτώσεις επιχειρείται η διατήρηση ή η επαναφορά του επιπέδου της ποιότητας της ζωής των γυναικών με την ορμονοθεραπεία ή αλλιώς ορμονική θεραπεία υποκατάστασης. Αυτό επιτυγχάνεται με την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της εμμηνόπαυσης και κατ' επέκτασιν του κινδύνου κατάγματος. Αρχικά η συγκεκριμένη θεραπεία χορηγούνταν συνεχόμενα και χωρίς διαλείμματα σε υψηλές δόσεις. Γεγονός το οποίο στη συνέχεια σχετίστηκε με αύξηση του κινδύνου εμφάνισης του καρκίνου του τραχήλου, στεφανιαίας νόσου, διηθητικού καρκίνου του μαστού, αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου και φλεβικής θρόμβωσης<sup>31,53</sup>. Με την πάροδο των ετών οι θεραπείες βελτιώθηκαν με την προσπάθεια χρησιμοποίησης συνδυασμών και δόσεων που οδήγησαν σε λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες και είχαν πιο αποτελεσματική δράση. Έτσι, στη σύγχρονη εποχή, οι γυναίκες που βρίσκονται σε προ- ή μετ- εμμηνοπαυσιακό στάδιο λαμβάνουν συνεχόμενα, σκευασμάτα με συνδυαστική θεραπεία οιστρογόνων (17β-οιστραδιόλη) και προγεστερόνης<sup>40</sup>. Οι γυναίκες που έχουν υποστεί υστερεκτομή μπορούν να λάβουν ορμονοθεραπεία μόνο με οιστρογόνα. Συνήθως η θεραπεία δίνεται δια του στόματος, αλλά η διαδερμική χορήγηση οιστρογόνων σε χαμηλή δόση φαίνεται να μειώνει τον κίνδυνο φλεβικής θρόμβωσης και αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου σε σύγκριση με τη χορήγηση δια του στόματος<sup>54</sup>.

Φαρμακευτική αγωγή	Αντικαταγματική δράση		
	Σπονδυλικά	Μη σπονδυλικά	Ισχίου
Αλενδρονάτη	+	+	+
Ρισεδρονάτη	+	+	+
Ιμπανδρονάτη	+	+*	
Ζολεδρονάτη	+	+	+
Denosumab	+	+	+
Ραλοξιφαίνη	+		
Βαζεδοξιφαίνη	+	+*	
Ρανελικό στρόντιο (αγωγή $2^{75}$ γραμμής)	+	+	+*
Τεριπαρατίδη	+	+	

Πίνακας 2. Ενδείξεις της αντικαταγματικής δράσης των φαρμακευτικών ουσιών που κυκλοφορούν στην Ελλάδα και χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη<sup>18</sup>.

## Ζωϊκά πρότυπα

Η έρευνα για την οστεοπόρωση διεξάγεται σε *in vitro*, *in vivo* και *ex vivo* επίπεδο. *In vitro* πολλές φαρμακευτικές ή μη φαρμακευτικές ουσίες δοκιμάζονται αρχικά σε ειδικές κυτταροκαλλιέργειες, για παράδειγμα οστεοβλαστών. Στο *in vivo* επίπεδο πολλές μελέτες λαμβάνουν χώρα με τη συμμετοχή εθελοντών, ανθρώπων/ασθενών που δέχονται να λάβουν μέρος, κατά τη διάρκεια της θεραπείας τους και να συνεισφέρουν έτσι στη συγκέντρωση πληροφοριών από την ερευνητική ομάδα. Αυτού του είδους οι μελέτες είναι πολύ σημαντικές γιατί παρέχουν πληροφορίες για την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια χορήγησης της παρέμβασης απευθείας στον άνθρωπο, γεγονός που προσδίδει τη μέγιστη δυνατή αντικειμενικότητα. Παρ'όλα αυτά, λαμβάνοντας υπόψιν τα μειονεκτήματα αυτών των μελετών, αναδεικνύεται η ανάγκη για εναλλακτικές μεθόδους *in vivo* έρευνας. Τέτοια

μειονεκτήματα είναι: η απαίτηση μεγαλύτερου χρονικού διαστήματος από την έναρξη μέχρι τη λήψη αποτελεσμάτων, αφού απαιτείται στις περισσότερες περιπτώσεις προχωρημένη ηλικία κατά την οποία εμφανίζεται η νόσος, μεγάλο χρονικό διάστημα για την παρακολούθηση της θεραπείας και της εξέλιξης μετά το πέρας αυτής (follow-up). Συχνά οι ερευνητές αντιμετωπίζουν μεγάλα ποσοστά απόσυρσης ασθενών λόγω παρενεργειών, ή μη συμμόρφωσης ή ακόμη και θανάτου, γεγονός που δυσχεραίνει το έργο τους, αυξάνει το κόστος και ταυτόχρονα ελλοχεύει ο κίνδυνος τα αποτελέσματα της μελέτης να μην είναι ικανά να στηρίξουν την επικείμενη στατιστική ανάλυση. Επίσης, υπάρχουν πολλοί παράγοντες που δεν μπορούν να ελεγχθούν ενώ πρέπει να ληφθούν σοβαρά υπόψιν των ερευνητών (confounding factors). Τέτοιοι παράγοντες είναι οι διαφορτικές συνθήκες και το διαφορετικό περιβάλλον, για παράδειγμα, ο τρόπος ζωής, οι διαφορετικές διατροφικές συνήθειες, το διαφορετικό επίπεδο άσκησης, το κάπνισμα ή μη, αλλά συνοδά νοσήματα ή παράλληλες θεραπείες, παράγοντες που αποτελούν τροχοπέδη στην εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

Αντίθετα, οι μελέτες με τη χρησιμοποίηση ζωικών μοντέλων εμφανίζουν αρκετά πλεονεκτήματα και εξυπηρετούν την ανάγκη για τη λήψη χρήσιμων πληροφοριών σε σύντομο χρονικό διάστημα. Πιο συγκεκριμένα, τα περισσότερα ζωικά μοντέλα εμφανίζουν σύντομο (ή τουλάχιστον συντομότερο) κύκλο ζωής, μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι ίδιες πειραματικές μονάδες (experimental units, ζώο ή ομάδα ζώων) πριν και μετά την πρόκληση του νοσήματος, απαιτείται γενικά σύντομος χρόνος για την πρόκληση/ αναπαραγωγή του νοσήματος και μικρός αριθμός ζώων μπορεί να προσφέρει αντιπροσωπευτικά και αντικειμενικά αποτελέσματα και πληροφορίες. Επιπρόσθετα, τα χαρακτηριστικά ομάδας ζώων μπορούν να καθοριστούν ή ακόμη και να προεπιλεγούν (γενετικό υπόβαθρο, ηλικίες, φύλλο, επίπεδο υγείας, διατροφή, κύκλος φωτός-σκότους) με αποτέλεσμα να μειώνονται σε μεγάλο βαθμό οι παράγοντες που συνυπάρχουν άσχετα με το σχεδιασμό της μελέτης, αλλά που μπορούν να επηρεάσουν τα αποτελέσματα της έρευνας με μη αντικειμενικό τρόπο (less confounding factors). Κατά τη μελέτη νέων ουσιών που δεν έχουν χρησιμοποιηθεί προηγουμένως, είναι ηθικά αποδεκτό να αποφευχθεί η χρησιμοποίηση ανθρώπων σε αρχικό στάδιο και με τη χρησιμοποίηση ζωικών προτύπων, μπορεί με ελεγχόμενο τρόπο να μελετηθεί και η δοσολογία ως προς την ασφαλή και αποτελεσματική χορήγηση, πριν τη χορήγηση στον άνθρωπο. Στο

τέλος της μελέτης η λήψη πληροφοριών μπορεί να συνεχιστεί με τη διενέργεια νεκροψίας σε επιλεγμένα χρονικά σημεία (check-points), ώστε να ληφθεί η μέγιστη δυνατή πληροφορία και λήψης δειγμάτων (αίμα, οστά, ιστοί) τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω *ex vivo* πειράματα.

Για αυτούς τους λόγους, οι επιτροπές αδειοδότησης φαρμάκων παγκοσμίως απαιτούν την παροχή πληροφοριών σχετικά με την ασφάλεια χορήγησης των υπό δοκιμή φαρμακευτικών ουσιών ύστερα από τη χορήγηση σε ζωικά μοντέλα. Για παράδειγμα ο Αμερικανικός οργανισμός φαρμάκων (FDA), κατά την αξιολόγηση του φακέλου ενός υποψηφίου φαρμάκου, απαιτεί αποτελέσματα σε τουλάχιστον δύο ζωικά πρότυπα, ένα μικρό (π.χ. τρωκτικό) και ένα μεγάλο (π.χ. χοίρο ή πίθηκο).

## Νομοθεσία

Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθούμε στο ηθικό πλαίσιο από το οποίο καθορίζονται τα όρια τα οποία χαρακτηρίζουν τον πειραματισμό σε ζώα. Κάθε χώρα ακολουθεί τη δική της νομοθεσία, για παράδειγμα στην Ελλάδα το Προεδρικό Διάταγμα 56/2013, σε εναρμόνιση με την κοινοτική νομοθεσία: Οδηγία 2010/63/EU και στο Ηνωμένο Βασίλειο η ASPA, δηλαδή Animal (Scientific Procedures Act) 1986, επικαιροποιημένη το 2018. Τα πειραματικά πρωτόκολλα οφείλουν να εξετάζονται και να αξιολογούνται από ειδική επιτροπή του ερευνητικού κέντρου σε ηθικό και επιστημονικό επίπεδο και έπειτα αυτή η αξιολόγηση πρέπει να εγκριθεί από ειδικούς αξιωματούχους του κράτους (π.χ. Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης). Πολλές φορές ανάλογα με τη δριμύτητα της πειραματικής μελέτης απαιτείται και αναδρομική αξιολόγηση κατά τη διάρκεια ή ύστερα από το τέλος της ερευνητικής διαδικασίας. Βασικές αρχές αυτών των αξιολογήσεων και νομική υποχρέωση των ερευνητών αποτελεί η εφαρμογή της συνθήκης των **3Rs (refinement, reduction, replacement)**. Ειδικότερα, ως refinement ή βελτίωση ορίζεται η υποχρέωση του ερευνητή να επιδιώκει και να χρησιμοποιεί την πιο "βελτιωμένη" διαθέσιμη μέθοδο για τη διενέργεια των πειραματικών

διαδικασιών. Για παράδειγμα, η επιλογή μη-επεμβατικής μεθόδου σε σχέση με μία επεμβατική, δεδομένου ότι θα είναι εφικτή η λήψη ίδιας ποσότητας και ποιότητας πληροφορίας με την πρόκληση χαμηλότερης δριμύτητας και πόνου στα ζώα. Reduction ή μείωση καλείται η υποχρέωση των ερευνητών να χρησιμοποιούν το μικρότερο δυνατό αριθμό ζώων για την εξαγωγή στατιστικά σημαντικών συμπερασμάτων ή τον ίδιο αριθμό δεδομένου ότι τα αναμενόμενα αποτελέσματα θα παράσχουν περισσότερες πληροφορίες από ό,τι σε προηγούμενες παρόμοιες μελέτες. Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι απαγορεύεται ρητά η επανάληψη ή η διενέργεια πειραματικών δραστηριοτήτων σε ζώα, οι οποίες έχουν ήδη διενεργηθεί σε άλλο εργαστήριο και που έχουν τον ίδιο ακριβώς σκοπό. Replacement ή αντικατάσταση, τέλος, αποτελεί την υποχρέωση των ερευνητών να χρησιμοποιούν ζώα μόνο στην περίπτωση που η λήψη των πληροφοριών δεν είναι εφικτή με εναλλακτικούς τρόπους (π.χ. υπολογιστικά συστήματα προσομοίωσης, *in vitro*, σε περιπτώσεις που μελέτες πραγματοποιούνται ήδη στον άνθρωπο, όπως στην περίπτωση ήδη εγκεκριμένων εμβολίων). Σύμφωνα με τις αρχές της αντικατάστασης, ο ερευνητής οφείλει επιστημονικά να εξηγήσει την ανάγκη χρησιμοποίησης ζώων και ειδικότερα να δικαιολογήσει επιστημονικά την επιλογή του συγκεκριμένου ζωικού προτύπου (είδος, χρησιμοποίηση μόνο ενός φύλλου, μη χρησιμοποίηση είδους με χαμηλότερη συναίσθηση, σύμφωνα με τις μέχρι τώρα διαθέσιμες πληροφορίες).

Τέλος, τα ζωικά πρότυπα πρέπει να πληρούν ορισμένες προϋποθέσεις ώστε να κρίνονται κατάλληλα για τη διεξαγωγή πειραματικών πρωτοκόλλων, όπως τη δυνατότητα αξιόπιστης αναπαραγωγής του νοσήματος, εύκολη διατήρηση σε ερευνητικό εργαστήριο, δυνατότητα διενέργειας χειρισμών, χαμηλότερο δυνατό κόστος απόκτησης και συντήρησης.

Στα ζωικά πρότυπα της οστεοπόρωσης καθοριστικής σημασίας είναι το ορμονικό προφίλ του οιστρικού κύκλου, η ηλικία απόκτησης κορυφαίας οστικής πυκνότητας, η ύπαρξη ή μη ηλικιοεξαρτώμενης οστικής απώλειας, η ύπαρξη ή μη οιστρογονοεξαρτώμενης οστικής απώλειας και αντιστροφής της με τη χορήγηση οιστρογόνων, η ύπαρξη ή μη αυθόρμητων ή χαμηλής έντασης καταγμάτων, η ύπαρξη επιπλεκόντων παραγόντων που έπονται της ωοθηκε-

κτομής (αυξημένη όρεξη, πρόσληψη βάρους). Στα περισσότερα ζωικά ζωικά πρότυπα της οστεοπόρωσης δεν είναι δυνατή η πρόκληση αυθόρμητων ή χαμηλής έντασης καταγμάτων, γεγονός που δεν υποτιμά την αξία των πληροφοριών που προσφέρουν αυτά τα πρότυπα, αλλά εξαιτίας αυτής της ιδιαιτερότητας, προτείνεται ο πιο δόκιμος και ακριβής όρος ως "ζωικά πρότυπα αναπαραγωγής οστεοπενίας" και όχι οστεοπόρωσης<sup>55</sup>.

Ζωικά είδη που έχουν χρησιμοποιηθεί στην έρευνα της οστεοπόρωσης είναι τα πρωτεύοντα, τα πρόβατα, οι χοίροι, οι σκύλοι, οι κόνικλοι, οι επίμυες και οι μύες.

## Πρωτεύοντα

Τα πρωτεύοντα εμφανίζουν αρκετά τα πλεονεκτήματα αλλά και μειονεκτήματα ως προς τη χρήση τους για την μελέτη της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης και αποτελούν το κυρίαρχο είδος για τη διενέργεια τοξικολογικών μελετών αντιστεοπορωτικών φαρμάκων<sup>56</sup>. Στα πλεονεκτήματα περιλαμβάνονται η φυσιολογία τους (ομοιότητες σε οργανικά συστήματα του ανθρώπου, όπως το πεπτικό, το ενδοκρινικό, το γεννητικό και το μεταβολικό) και η κοντινότερη ανατομική σχέση (για παράδειγμα η ύπαρξη Harvesian συστήματος remodeling<sup>57</sup>) ως προς αυτή του ανθρώπου σε σχέση με άλλα είδη<sup>55</sup>.

Ως προς τα μειονεκτήματα, η εμμηνόπαυση επέρχεται προς το τέλος της τρίτης δεκαετίας της ζωής τους (αρκετά αργά σε σχέση με άλλα είδη), η ηλικία απόκτησης της κορυφείας οστικής πυκνότητας επιτυγχάνεται προς το τέλος της πρώτης δεκαετίας της ζωής τους (εξίσου αργά σε σχέση με άλλα είδη), ενώ σε μη σκελετικά ώριμα ζώα δε φαίνεται να είναι κατάλληλη η διενέργεια μελέτης μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης<sup>57,55</sup>. Επιλέον, ο χειρισμός τους είναι δύσκολος (animal handling), απαιτεί εξειδικευμένες καταστάσεις και προσωπικό και κατά τη διατήρηση πρωτευόντων υπάρχει ο κίνδυνος μετάδοσης ζωανθρωπονόσων (από τα ζώα στον άνθρωπο και από τον άνθρωπο προς τα ζώα), γεγονός που καθιστά δυσκολότερη τη χρησιμοποίηση αυτού του μοντέλου αλλά και αυξάνει τον κίνδυνο μη ολοκλήρωσης ενός τέτοιου χρονοβόρου πειράματος. Τέλος, ως προς το νομικό και ηθικό πλαίσιο η χρήση αυτών των ζώων ελέγχεται από αυστηρούς κανόνες, απαγορεύεται



οποιαδήποτε χρήση ζώων σε περίπτωση που υπάρχουν παρόμοιες ή εναλλακτικές μέθοδοι για την επίτευξη του ίδιου στόχου (αντικατάσταση)<sup>58,59</sup>, τα ζώα που χρησιμοποιούνται πρέπει να προέρχονται από εκτροφές οι οποίες διατηρούν ζώα δεύτερης τουλάχιστον γενιάς (F2) που χρησιμοποιούνται αποκλειστικά για αναπαραγωγή πρωτευόντων ως ζώων εργαστηρίου και δεν επιτρέπεται η αιχμαλώτιση ζώων από το φυσικό τους περιβάλλον για επιστημονικούς σκοπούς, γεγονός που είναι ηθικά σωστό, αλλά συνεισφέρει σημαντικά στην αύξηση του κόστους που απαιτείται από το συγκεκριμένο ζωικό μοντέλο μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης<sup>60</sup>.

## Πρόβατα

Τα πρόβατα έχουν χρησιμοποιηθεί συχνά ως ζωικό μοντέλο μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης. Αυτό διότι εμφανίζουν αρκετά πλεονεκτήματα, όπως σχετικά εύκολη διατήρηση των ζώων σε επίπεδο εργαστηρίου και εύκολο χειρισμό, ενώ κατά κανόνα εμφανίζουν τη δυνατότητα εκπαίδευσης τους σχετικά με τις ανάγκες των ερευνητικών διαδικασιών. Η διαδικασία έγκρισης του ερευνητικού πρωτοκόλλου είναι ευκολότερη σε σχέση με το σκύλο και τα πρωτεύοντα. Επίσης, εμφανίζουν ικανό μέγεθος για τη λήψη μεγάλης ποσότητας αίματος και άλλων βιολογικών δειγμάτων<sup>61,55</sup>.

Σε ό,τι αφορά στα μειονεκτήματα, τα πρόβατα διαθέτουν διαφορετικό πεπτικό σύστημα (πολυγαστρικά ζώα) από αυτό του ανθρώπου, όπως και διαφορές στο μεταβολισμό (π.χ. φωσφόρου και ασβεστίου, γεγονός που δυσχεραίνει την επίτευξη ισορροπίας μεταξύ κατάλληλου σιτηρεσίου, γαλακτοπαραγωγής και οστεοπενίας). Η οστική απώλεια μετά από ωθηκεκτομή είναι μικρότερης έκτασης σε σχέση με αυτή του ανθρώπου μετά την εμμηνόπαυση και τέλος η ηλικία που απαιτείται για την επιτυχή οστική απώλεια ύστερα από ωθηκεκτομή είναι αρκετά υψηλή (7-8 έτη), καθιστώντας το μοντέλο πιο χρονοβόρο και δυσκολότερο σε σχέση με τα τρωκτικά<sup>61,40,62,63</sup>.

## Σκύλοι

Οι σκύλοι έχουν χρησιμοποιηθεί συχνά ως το εναλλακτικό μοντέλο μη-τρωκτικών μετα τα πρωτεύοντα για την έρευνα των οστών. Αυτό συμβαίνει επειδή όπως και τα πρωτεύοντα εμφανίζουν πολλές ομοιότητες ως προς τον άνθρωπο, σχετικά με το μεταβολισμό των οστών κατά την ανάπτυξη (modelling) και κατά την ωριμότητα (remodelling). Η λήψη έγκρισης από τις επιτροπές ηθικής και ευζωίας είναι πιο απλή, σε ηθικό επίπεδο είναι αποδεκτή η χρησιμοποίησή τους υπό προϋποθέσεις, όπως επίσης είναι ευκολότερο και αρκετά οικονομικότερο να διατηρούνται σε επίπεδο εργαστηρίου από τα πρωτεύοντα. Ως κύριο μειονέκτημα θεωρείται η ανθεκτικότητα που εμφανίζει ο σκύλος στη διατήρηση της οστικής πυκνότητας του οστού, σε σχέση με τον άνθρωπο και τα πρωτεύοντα, γεγονός που το καθιστά ως λιγότερο χρήσιμο μοντέλο με μετεμνηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης. Αυτό οφείλεται στο ότι εμφανίζουν συντομότερους κύκλους ανακατασκευής (remodelling) και η αποκατάσταση του σπογγώδους οστού είναι δύο με τρεις φορές υψηλότερη από αυτή του ανθρώπου<sup>64,55</sup>.

## Χοίροι

Σε ερευνητικό επίπεδο προτιμάται η χρησιμοποίηση μίνι-χοίρων (mini-pigs) διότι είναι σχετικά εύκολη η διατήρησή τους σε επίπεδο εργαστηρίου και ο χειρισμός τους. Οι χοίροι εμφανίζουν αρκετές ομοιότητες ως προς το γεννητικό και το μεταβολικό σύστημα με τον άνθρωπο. Η απόκτηση κορυφαίας οστικής πυκνότητας επιτυγχάνεται σχετικά σύντομα, στα δύομισι με τρία έτη, και ταυτόχρονα, λόγω του μεγέθους τους είναι δυνατή η λήψη μεγάλου όγκου αίματος και άλλων βιολογικών υλικών<sup>64,55</sup>. Κύριο μειονέκτημα είναι το αρκετά υψηλότερο κόστος για την αγορά των μίνι-χοίρων σε σχέση με τους απλούς χοίρους.

Ο Κιμ και οι συνεργάτες, πρόσφατα πρότειναν τη χρήση ενός άλλου μοντέλου μετεμνηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης, το μικρό-χοίρο (micro-pig), λόγω της καλής

ανταπόκρισης αυτού του μοντέλου στην ωθηκεκτομή ως προς την πρόκληση απώλειας οστικής πυκνότητας <sup>65</sup>.

## Κόνικλοι

Ο κόνικλος έχει χρησιμοποιηθεί σε κάποιες περιπτώσεις ως μοντέλο μετεμνηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης. Τα πλεονεκτήματα που εμφανίζει είναι το οικονομικότερο κόστος αγοράς, η ευκολία διατήρησής του σε μεγάλους αριθμούς και η ευκολία χειρισμών του σε επίπεδο εργαστηρίου. Σε σχέση με τα τρωκτικά έχει επιπλέον πλεονέκτημα ως προς τη δυνατότητα χρήσης εμφυτευμάτων, λόγω του μεγέθους του. Επίσης, επιτυγχάνει την σκελετική του ωρίμανση σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα, στους έξι με οχτώ μήνες και εμφανίζει Haversian- τύπου ανακατασκευή.

Στα μειονεκτήματα κατατάσσονται η διαφορετική μικρό-δομή του οστού, με λιγότερο ποσοστό σπογγώδους οστού, ότι το μέγεθος του είναι μικρό για τυχόν χρήση εξωτερικής οστεοσύνθεσης (prosthesis) και ότι η πρόκληση οστεοπόρωσης μόνο με τη χρήση ωθηκεκτομής απαιτεί μεγάλο χρονικό διάστημα (συνήθως προτείνεται η χορήγηση κορτικοστεροειδών ή τροφής με χαμηλή σύσταση σε ασβέστιο) <sup>55,66,67</sup>.

## Μύες

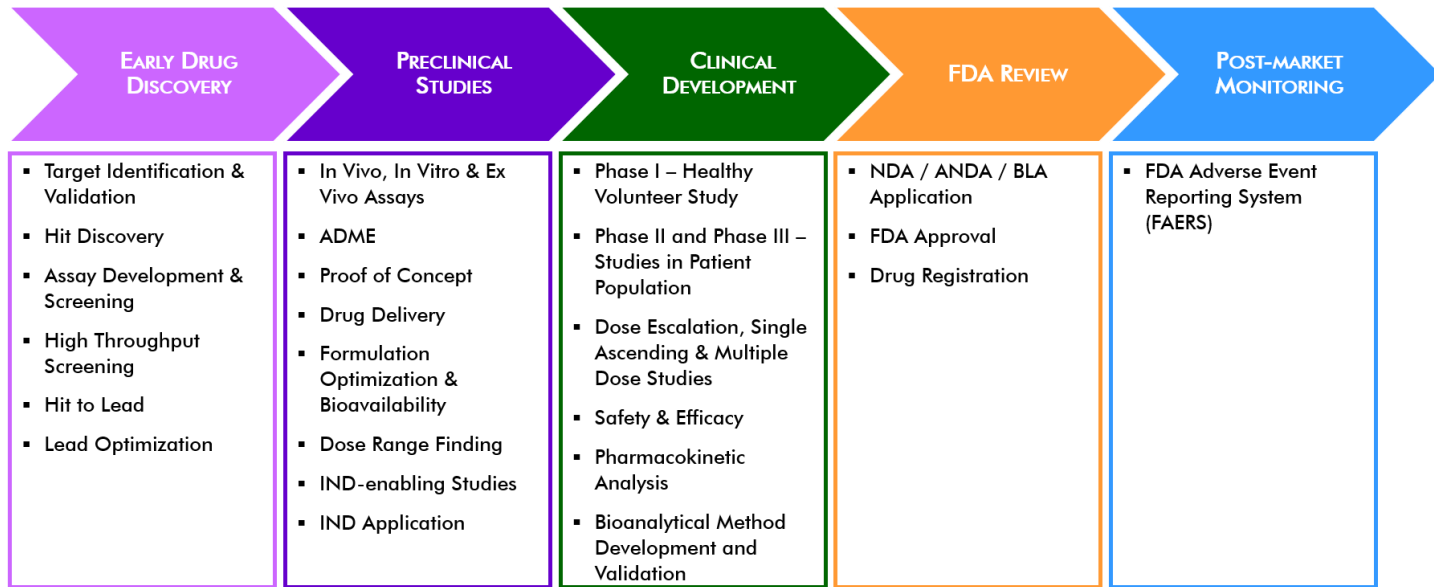
Οι μύες εμφανίζουν ως πλεονέκτημα το μικρό μέγεθος τους, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την ευκολότερη διατήρηση μεγάλου αριθμού ζώων σε μικρό σχετικά χώρο. Αυτό σε συνδυασμό με το σχετικά χαμηλό κόστος αγοράς τους, η ευκολία χειρισμών και η σύντομη πορεία προς τη σκελετική ωρίμανση ευνοούν την κυριαρχία αυτού του είδους γενικότερα στην

έρευνα. Ως μειονέκτημα, λόγω του μεγέθους τους, είναι αδύνατη η λήψη μεγάλης ποσότητας αίματος και άλλων βιολογικών υλικών και η εφαρμογή εμφυτευμάτων. Στη σύγχρονη εποχή χρησιμοποιείται κυρίως η μέθοδος χορήγησης κορτικοστεροειδών για την πρόκληση οστεοπόρωσης και οι μοντέρνες μέθοδοι τροποποίησης του γονιδιώματος των ζώων, που έχουν ως αποτέλεσμα την πρόκληση της νόσου. Για παράδειγμα η εμφάνιση αυτόματων καταγμάτων τα οποία προσομοιάζουν με αυτά του ανθρώπου<sup>68,69</sup>.

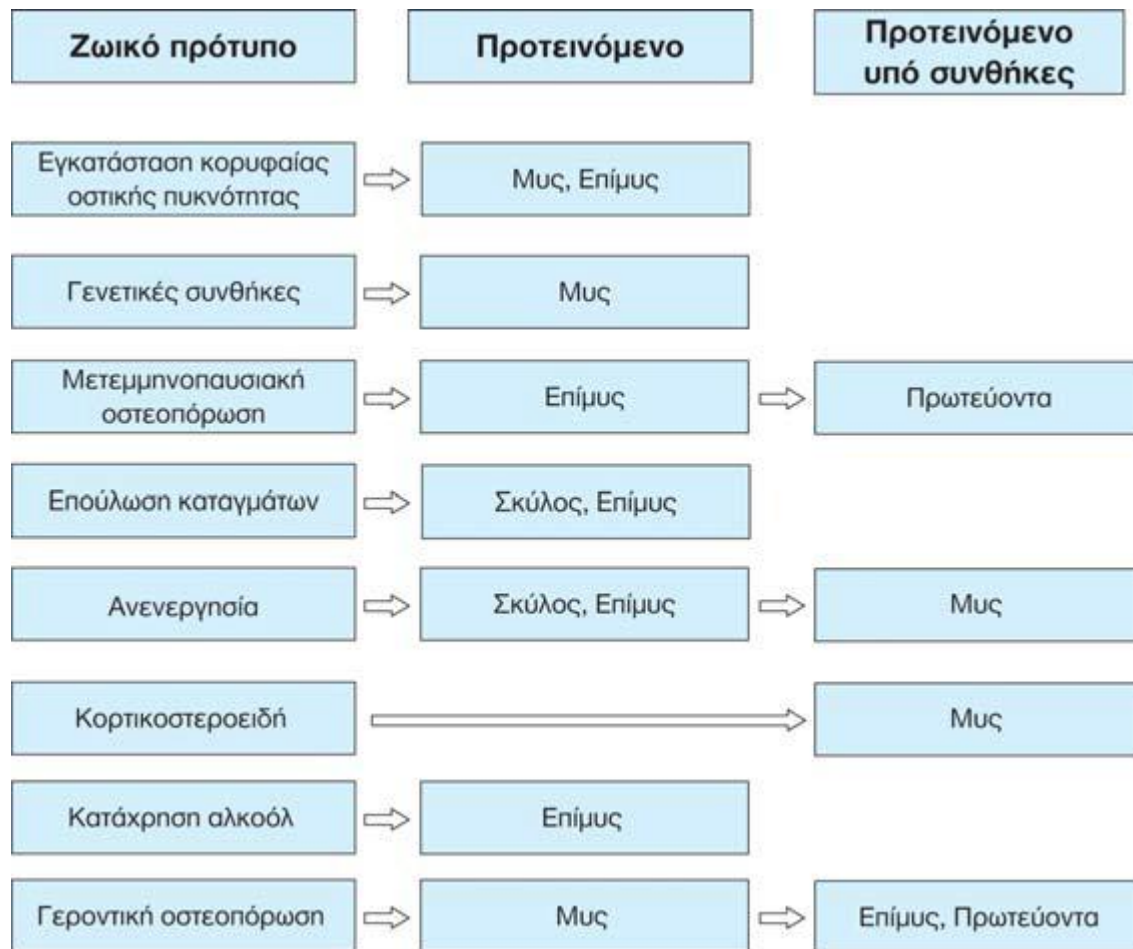
## Επίμυες

Ο επίμυς αποτελεί το κυριότερο ζωικό μοντέλο για την μελέτη της μετεμνηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης. Ο κύριος λόγος είναι το μέγεθος του, το οποίο ευνοεί τη λήψη μεγαλύτερης ποσότητας αίματος και βιολογικών υλικών από αυτή στους μύες, καθιστά εφικτή τη διατήρηση μεγάλων αριθμών ζώων σε μικρό χώρο, οι χειρισμοί τους είναι σχετικά απλοί και το κόστος αγοράς τους είναι σχετικά χαμηλό. Σε ό,τι αφορά την αναπαραγωγή της νόσου, σε ηλικία μεγαλύτερη των έξι μηνών ο επίμυς εμφανίζει "οστική ανακατασκευή" του οστού, όπως και ο άνθρωπος. Η κορυφαία οστική πυκνότητα αποκτάται στην ηλικία περίπου των 10 μηνών, σχετικά σύντομα. Κύρια μειονέκτημα αυτού του μοντέλου είναι η έλλειψη Haversian οστικής δομής, το οποίο μπορεί να θεωρηθεί λιγότερο σημαντικό μειονέκτημα σε σχέση με τα μειονεκτήματα που αναφέρθηκαν στα άλλα είδη (σκύλος και πρωτεύοντα). Επίσης η συνεχής ανάπτυξη των μακρών οστών οδηγεί στην υποχρεωτική χρήση ομάδας ελέγχου (Control). Σημαντικό πλεονέκτημα θεωρείται το αποτέλεσμα της ωθηκεκτομής στον επίμυ που οδηγεί σε συνθήκες παρόμοιες με αυτές της εμμηνόπαυσης ως προς την οστική ανακατασκευή και απώλεια. Το μειονέκτημα σχετικά με την έλλειψη αυτόματων καταγμάτων (χαρακτηριστικό της οστεοπόρωσης του ανθρώπου) στο συγκεκριμένο μοντέλο, θεωρείται λιγότερο σημαντικό, δεδομένο ότι μόνο σε συγκεκριμένα διαγονιδιακά μοντέλα είναι εφικτό να επιτευχθεί. Αυτά τα χαρακτηριστικά σε συνδυασμό με το γεγονός ότι μεγάλος αριθμός ερευνητικών πρωτοκόλλων έχουν διενεργηθεί με βάση τον ωθηκεκτομημένο επίμυ, με

αποτέλεσμα την ύπαρξη σημαντικού όγκου πληροφοριών και αποτελεσμάτων, καθιστούν το συγκεκριμένο μοντέλο ως κυρίαρχο στη σύγχρονη εποχή.<sup>55,69,70,71</sup>



Εικόνα 11. Σύντομη παράθεση των σταδίων ελέγχου των φαρμάκων μέχρι και την έγκρισή τους, ώστε να διοχετευθούν ή να παραμείνουν στην αγορά<sup>72</sup>.



Εικόνα 12. Αλγόριθμος των προτεινόμενων και υπό συνθήκες προτεινόμενων Ζωικών Προτύπων στην έρευνα της οστεοπόρωσης<sup>55</sup>.

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## Εισαγωγή

Η οστεοπόρωση αποτελεί την πιο συχνή μεταβολική διαταραχή των οστών και αφορά στη μείωση της οστικής πυκνότητας και διαταραχή της μικροαρχιτεκτονικής των οστών, που προκαλούν ελάττωση της μηχανικής αντοχής του οστού και την εμφάνιση καταγμάτων. Από πολλούς ειδικούς αποκαλείται η σιωπηλή νόσος <sup>73</sup> γιατί τα συμπτώματα αργούν να εμφανιστούν και αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά σύγχρονα προβλήματα δημόσιας υγείας. Περίπου 9 εκατομμύρια κατάγματα από οστεοπενικούς ασθενείς αριθμούνται κάθε χρόνο σε παγκόσμιο επίπεδο <sup>74</sup>. Αυτή η νόσος επηρεάζει κυρίως γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας, οι οποίες αντιμετωπίζουν κατάγματα σχετικά με οστεοπόρωση 1,6 φορές πιο συχνά από τους άνδρες και είναι μία από τις πιο σύγχρονες ασθένειες οι οποίες αναγκάζουν τους ανθρώπους να αποκλειστούν από τη δουλειά, όπως και από τις κοινωνικές τους υποχρεώσεις για μεγάλο χρονικό διάστημα <sup>74</sup>.

Μία μικρή απώλεια οστικής πυκνότητας ενός σπονδύλου ή του ισχίου μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο για κατάγματα 2 και 5 φορές αντίστοιχα <sup>75</sup>. Αυξημένος κίνδυνος για κάταγμα σχετίζεται με χαμηλό δείκτη οστικής πυκνότητας (BMD- Bone Mass Density), παρόλαυτα στην κλινική πράξη τα περισσότερα κατάγματα αναφέρονται από ανθρώπους που κατατάσσονται σε μέτριο κίνδυνο <sup>76</sup>. Παράγοντες οι οποίοι φαίνεται να οδηγούν σε χαμηλότερη οστική πυκνότητα (BMD) οπότε και σε υψηλότερο κίνδυνο για κάταγμα είναι το κάπνισμα, υψηλή κατανάλωση αλκοόλ εκτός ορίου, πολλές ώρες καθιστικής ζωής την ημέρα και η χρόνια χρήση κορτικοστεροειδών <sup>77,78,79</sup>. Από την άλλη πλευρά η άσκηση (π.χ. το περπάτημα και η άσκηση με βάρη), ο αθλητισμός, οι δουλειές του σπιτιού και η θεραπευτική άσκηση, κυρίως όταν ξεκινούν από νεαρή ηλικία, μετά την εμμηνόπαυση φαίνεται ότι είναι χρήσιμα για την διατήρηση ή την αύξηση της οστικής πυκνότητας <sup>80,81,82</sup>.

Η ύπαρξη αποτελεσματικών θεραπειών παίζει πολύ σημαντικό ρόλο για την πρόληψη καταγμάτων που έχει ως αποτέλεσμα και τη μείωση του κόστους των παρόχων υγείας (π.χ. εθνικά συστήματα υγείας και ασφαλιστικοί φορείς) <sup>83</sup>. Οι θεραπευτικές παρεμβάσεις που έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς κατά τη σύγχρονη εποχή, όπως η



καλιτονίνη, η ορμονική θεραπεία αντικατάστασης, οι selective estrogen receptor modulators (SERMs), τα διφωσφονικά, το denusomab, η πάραθυροειδική ορμόνη και το strontium ranelate σύμφωνα με σύγχρονες μελέτες έχουν κατηγορηθεί ότι μπορεί να προκαλέσουν ανεπιθύμητες ενέργειες, κυρίως κατά τη χρόνια χορήγηση τους <sup>43,84,85</sup>. Για παράδειγμα η μακροχρόνια χορήγηση οιστρογόνων έχει ενοχοποιηθεί για την πρόκληση διαφόρων μορφών καρκίνου, κυρίως στο μαστό και στη μήτρα, στεφανιαία νόσο, αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, χαμηλής βίας κατάγματα μηριαίου και η οστεονέκρωση της κάτω γνάθου <sup>53,86,87,88</sup>. Οι παραπάνω λόγοι, σε συνδυασμό με άλλες παθήσεις που σχετίζονται με την ηλικία συμβάλλουν συχνά στη μη-συμμόρφωση των ασθενών ή/και στην πρόωρη διακοπή της φαρμακευτικής θεραπείας. Αυτό δυσχεραίνει την αξιολόγηση της μακροχρόνιας αποτελεσματικότητας των φαρμακευτικών παρεμβάσεων και την έκταση των πιθανών παρενεργειών τους, με αποτέλεσμα την ύπαρξη μικρού αριθμού ερευνητικών μελετών που εξετάζουν αυτούς τους παράγοντες για μεγάλο χρονικό διάστημα και να επανεξετάζουν τα κλινικά περιστατικά (follow-up) <sup>43,89</sup>. Έτσι, διατροφικά μέτρα έχουν προταθεί ως εναλλακτικά ή συνδυαστικά των φαρμακευτικών θεραπειών για τις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, όπως η χορήγηση ασβεστίου και/ή βιταμίνης D, φρούτα και λαχανικά, και υψηλές πρωτεϊνικές δίαιτες <sup>90,91,92,93,94</sup>.

Σημαντικό κομμάτι της σύγχρονης έρευνας για την πρόληψη και την αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης κινείται προς την κατεύθυνση της χρησιμοποίησης ουσιών, κυρίως φυτικών, οι οποίες θα μπορούσαν να υποκαταστήσουν μερικώς ή πλήρως, υπό ορισμένες συνθήκες, τις φαρμακευτικές ουσίες που χρησιμοποιούνται σήμερα <sup>92,95,96</sup>. Αυτή η επιστημονική τάση έχει κινητοποιήσει τους ερευνητές να επικεντρωθούν σε φυτικά εκχυλίσματα, τα οποία έχουν συστατικά που έχουν απόδειξη την οιστρογονική και/ή αντιοξειδωτική τους δράση όπως και τη θετική τους επίδραση σχετικά με την πρόληψη ασθενειών, όπως και οστεοπόρωση, ο καρκίνος και τα καρδιαγγειακά νοσήματα <sup>97,98,99</sup>. Οι έρευνες που διενεργούνται σε επίπεδο ζωικών προτύπων (*in vivo, ex vivo*) ή σε κυτταρικό επίπεδο (*in vitro*) <sup>100,46</sup> έχουν αποδείξει την ευεργετική δράση των φυτικών κυρίως ουσιών, όπως η κατανάλωση εκχυλισμάτων καρπών, σε ό,τι αφορά στη μείωση της επικείμενης απώλειας οστικής πυκνότητας μετά την ωοθηκεκτομή η οποία στο συγκεκριμένο πρότυπο μιμείται τις συνέπειες της εμμηνόπαυσης

70,101,98,102. Μεταξύ αυτών των ουσιών είναι και τα συστατικά της ελιάς, ολευροπεΐνη και υδροξυτυροσόλη, για τις οποίες έχει ήδη αποδειχθεί ότι έχουν αντι-ισχαιμικές, αντιοξειδωτικές και υπολιπιδαιμικές ιδιότητες<sup>103,104,105,106,107</sup> και σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες (*ex vivo*)<sup>108</sup> και (*in vivo*)<sup>109,110</sup> θεωρείται ότι αυτά τα συστατικά της ελιάς είναι πολύ πιθανό να εμφανίσουν θετική επίδραση και ως προς την πρόληψη και διατήρηση της οστικής πυκνότητας στο πειραματικό πρότυπο μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης του ωθηκεκτομημένου επίμυος.

## Σκοπός της μελέτης

Βασικός σκοπός της μελέτης είναι η ανάδειξη της προστατευτικής δράσης του τυποποιημένου εκχυλίσματος καρπών ελιάς (επιτραπέζια ελιά), εφόσον αυτή υπάρχει, ύστερα από κατανάλωση από το στόμα, στην οστική πυκνότητα ωθηκεκτομημένων επίμυων, οι οποίοι αποτελούν αναγνωρισμένο πειραματικό πρότυπο μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης.

## Υλικά και Μέθοδοι

### Αδειοδότηση ερευνητικού πρωτοκόλλου

Η συγκεκριμένη μελέτη αξιολογήθηκε από την Επιτροπή Αξιολόγησης Πρωτοκόλλων (ΕΑΠ) του εργαστηρίου και στη συνέχεια εγκρίθηκε από την αρμόδια κτηνιατρική υπηρεσία του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης (Αριθμός αδειοδότησης: 3002 /15–05–2014), την επιστημονική επιτροπή του νοσοκομείου ΚΑΤ (ΕΣ 244-7661, 26.06.2014), όπως επίσης από τη

Γενική Συνέλευση της Ιατρικής Σχολής του Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (04-06-2014), σύμφωνα με την ελληνική νομοθεσία (Προεδρικό Διάταγμα 56/2013, σε εναρμόνιση με την κοινοτική νομοθεσία: Οδηγία 2010/63/EU). Πριν την έναρξη του πειράματος, κατά τη διάρκεια του πειραματικού σχεδιασμού και τέλος κατά την προετοιμασία της δημοσίευσης ακολουθήθηκαν οι αρχές και οι προτάσεις των 'PREPARE' and 'ARRIVE' guidelines<sup>111,112</sup>.

### Σχεδιασμός πειράματος (Experimental design)

Η συγκεκριμένη μελέτη έχει αξιολογηθεί και έχει λάβει έγκριση υλοποίησης από την Κτηνιατρική Υπηρεσία του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης (με αριθμό άδειας 3002/15-05-2014), την επιστημονική επιτροπή του νοσοκομείου ΚΑΤ (με αριθμό άδειας ΕΣ 244-7661, 26.06.2014) όπως επίσης και από τη Γενική Συνέλευση της Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ (με αριθμό απόφασης 04-06-2014) και έχει υλοποιηθεί σύμφωνα με τις απαιτήσεις του Προεδρικού Διατάγματος 56/2013, σε εφαρμογή της ευρωπαϊκής νομοθεσίας (Directive 2010/63/EE).

Η επιλογή του συγκεκριμένου αριθμού επιμύων που θα αποτελούν την κάθε ομάδα, έγινε με βάση την προηγούμενη εμπειρία που έχει προκύψει από παλαιότερες μελέτες στο Εργαστήριο Έρευνας Παθήσεων Μυοσκελετικού Συστήματος «Θ.Γαροφαλλίδης» στο Νοσοκομείο ΚΑΤ, με γνώμονα τη χρησιμοποίηση του μικρότερου αριθμού ζώων το δυνατό (Μείωση-Reduction), μετά από συνεννόηση και με την καθοδήγηση του εξειδικευμένου στατιστικολόγου του Εργαστηρίου.

Μετά τη διενέργεια sample size estimation εξάγαμε το συμπέρασμα ότι ένα δείγμα 10 ζώων ανά ομάδα μας προσφέρει 90% πιθανότητα να αναδειχθεί στατιστικά σημαντική διαφορά 15% (-25% versus -10%, SD 10) στην ποσοστιαία μεταβολή της **οστικής πυκνότητας** από την αρχική μέτρηση στους 6 μήνες ανάμεσα στις ομάδες OVX και εκχύλισματος καρπών ελιάς με επίπεδο σημαντικότητας 5%.

## Ομάδες ζώων

Ο συνολικός αριθμός των ζώων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 30 επίμυες, οι οποίες κατανεμήθηκαν σε 3 ομάδες των 10 ζώων η καθε μία, στις οποίες παρέμειναν μέχρι την ηλικία των 9 μηνών, οπότε η πρώτη πειραματική διαδικασία έλαβε χώρα (αρχική μέτρηση DEXA) .

α) η **ομάδα ελέγχου (Control)**, η οποία αποτελούνταν από 10 επίμυες. Οι επίμυες της συγκεκριμένης ομάδας είναι οι μόνοι οι οποίοι δεν υποβλήθηκαν σε ωθηκεκτομή ούτε και έλαβαν φαρμακευτική αγωγή. Αυτή η ομάδα επιλέχθηκε για την παρακολούθηση των ζώων στο ίδιο χρονικό διάστημα, στις ίδιες συνθήκες περιβάλλοντος και διατροφής, όπως δηλώνει και το όνομά της, με τα ζώα των υπόλοιπων ομάδων. Με αυτόν τον τρόπο μπορούμε να ελέγξουμε τι θα συνέβαινε στα ζώα χωρίς καμία παρέμβαση στις συγκεκριμένες συνθήκες και έτσι θα αξιολογήσουμε πιο σωστά και ασφαλέστερα τα αποτελέσματα των ομάδων που θα υποστούν παρέμβαση. Στη διεθνή βιβλιογραφία, φαίνεται ότι κρίνεται απαραίτητη η ύπαρξη της συγκεκριμένης ομάδας σε πειράματα μακροχρόνιας μελέτης επίδρασης ουσιών σε κάποια φυσιολογική λειτουργία, ιστό ή όργανο.

β) Η **ομάδα OVX** θα αποτελείται από 10 επίμυες, οι οποίες υποβλήθηκαν σε ωθηκεκτομή και δεν έλαβαν θεραπεία.

γ) Η **ομάδα του εκχύλισματος καρπών ελιάς-Olive extract (OE)**, από 10 επίμυες, οι οποίες υποβλήθηκαν σε ωθηκεκτομή και έλαβαν θεραπεία υποκατάστασης με εκχύλισμα καρπών ελιάς με χορήγηση από το στόμα μέσω του πόσιμου νερού.

## Εκχύλισμα επιτραπέζιας ελιάς

### Διαδικασία παραγωγής του εκχυλίσματος

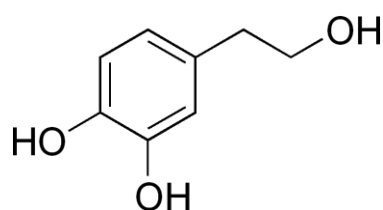
Το εκχύλισμα επιτραπέζιας ελιάς (ΟΕ) είναι τυποποιημένο εκχύλισμα καρπών ελιάς από την ελληνική ποικιλία Αμφίσσης (*Olea europaea* var. *rotunda*) και αποτελεί το κύριο υποπροϊόν από το φυσικό εκπίκνισμα της επιτραπέζιας ελιάς. Το εκχύλισμα παραλαμβάνεται με τεχνικές εκχύλισης φιλικές προς το περιβάλλον (παρασκευή υδατικού εκχυλίσματος ελαιοκάρπων, χρήση τεχνολογίας ρητινών προσρόφησης για την παραλαβή των φαινολικών ενώσεων, εξάτμιση του διαλύτη με την τεχνική spray-drying) και είναι πλούσιο σε φαινολικά παράγωγα. Πιο συγκεκριμένα, για την παρούσα μελέτη 10 L του ΟΕ υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία ρητινών προσρόφησης. Η ρητίνη που χρησιμοποιήθηκε, XAD-4, ήταν σύμφωνα με τις προδιαγραφές του κατασκευαστή ο κατάλληλος τύπος ρητίνης που συνίσταται για την αποτελεσματική προσρόφηση των φαινολικών συστατικών. Έπειτα από την αρχική υποχρεωτική ενεργοποίηση της ρητίνης με αιθανόλη και με νερό, και ύστερα από το πέρασμα του ΟΕ, η ρητίνη ξεπλύθηκε με νερό για να αφαιρεθούν υπολείμματα πολυσακχαριτών, λιπιδίων και αλάτων, καθώς οι φαινολικές ενώσεις παρέμεναν προσροφημένες. Έτσι, για την παραλαβή τους, 3 l αιθανόλης χρησιμοποιήθηκαν ως διαλύτης έκλουσης. Το τελικό ξηρό εκχύλισμα που παράχθηκε, ύστερα από εκρόφηση με αιθανόλη και εξάτμιση του διαλύτη, ήταν 112 g (απόδοση 1.12% w/v), παρόμοιο με αυτό που βρέθηκε στην βιβλιογραφία<sup>113</sup>.

### Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης

Τα δύο κύρια συστατικά που ταυτοποιήθηκαν στο ΟΕ είναι δύο φαινυλαλκοόλες, η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη. Η ποσοτικοποίηση αυτών των συστατικών επετεύχθη με βάση μία μέθοδο που έχει ήδη περιγραφεί στην βιβλιογραφία<sup>114</sup>. Στη συγκεκριμένη μελέτη,

χρησιμοποιήθηκαν δύο στήλες, μία Thermo Finnigan® HPLC-DAD system (P4000 Pump, AS3000 Autosampler, PDA Detector UV8000, Chromquest TM 4.1 Software) και μία Supelco® RP18 Discovery HS-C18 (250 mm, 4.6 mm, 5  $\mu$ m). Ένα σύστημα διπλού διαλύτη σταδιακής έκλυσης χρησιμοποιήθηκε με αρχικές συνθήκες 98% νερό με 0.2% οξικό οξύ (A) and 2% ακετονιτρίλιο (B). Η γραμμική κλίση στο 30% B επετεύχθη σε 40 λεπτά και διατηρήθηκε για 5 λεπτά. Οι αρχικές συνθήκες επετεύχθησαν σε ένα επιπλέον χρονικό διάστημα 5 λεπτών. Ακολούθως, το συνολικό χρονικό διάστημα εκτέλεσης ήταν 50 λεπτά με ρυθμό ροής 1 ml/min, καθώς ο όγκος έγχυσης ήταν σταθερός στα 20  $\mu$ l. Η θερμοκρασία διατηρήθηκε στους 25°C και η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε στα 280 nm.

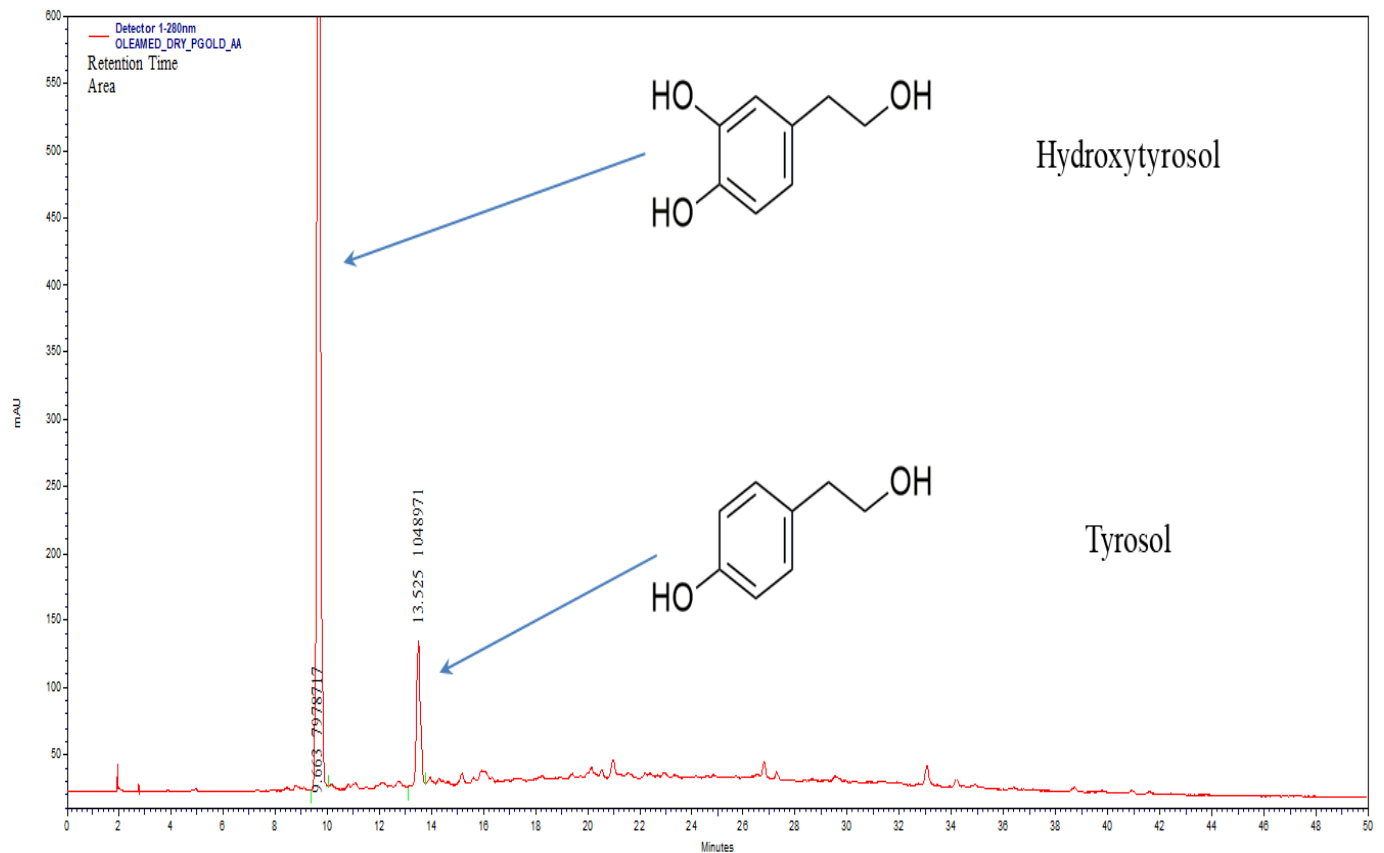
Το δείγμα ζυγίστηκε και διαλύθηκε στην τελική συγκέντρωση 2.4 mg/ml. Καμπύλες βαθμονόμησης πέντε σημείων δημιουργήθηκαν χρησιμοποιώντας διαθέσιμα εμπορικά σκευάσματα από την Extra Synthase (Hydroxytyrosol:  $y=87968x-11437$ ,  $R^2=0.9992$  & Tyrosol:  $y=55018x-29720$ ,  $R^2=0.9998$ ) και χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση των αναλυτών. Το καταγεγραμμένο χρωματογράφημα (εικόνα 13.) επιβεβαίωσε την ύπαρξη υδροξυτυροσόλης και τυροσόλης στο εκχύλισμα με περιεκτικότητα 9.75% (w/w) και 0.34% (w/w) αντίστοιχα.



Εικόνα 13. Χημικός τύπος υδροξυτυροσόλης.

Ιδιαίτερα τα περιεχόμενα συστατικά υδροξυτυροσόλη και τυροσόλη, έχουν αποδεδειγμένα αντιοξειδωτική δράση και προστατεύουν τα κύτταρα του οργανισμού και την LDL από οξειδωτικές βλάβες, δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου. Το εκχύλισμα είναι διαλυτό στο νερό, την αιθανόλη και σε μίγματα αλκοόλης/νερού. Επίσης, διαθέτει

αντιοξειδωτική ικανότητα, υπολογισμένη σύμφωνα με την τεχνική DPPH (2,2-diphenylpicrylhydrazyl assay)  $IC_{50} \leq 100 \mu\text{g/ml}$  και περιέχει ολικά φαινολικά παράγωγα  $\geq 17\%$ , υδροξυτυροσόλη  $\geq 7\%$ , λιπίδια 8-10%, πρωτεΐνες 2-4%.



Εικόνα 14. HPLC-DAD χρωματογράφημα του ΟΕ, καταγράφηκε στα 280 nm. Οι κορυφές (peaks) που ανιχνεύθηκαν ανταποκρίνονται στην υδροξυτυροσόλη και την τυροσόλη, HPLC-DAD: high-performance liquid chromatography with a diode-array detector, ΟΕ: εκχύλισμα επιτραπέζιας ελιάς.

## Χορήγηση του εκχυλίσματος

Το ΟΕ χορηγήθηκε για 6 μήνες, κατάλληλα αραιωμένο στις φιάλες των κλωβών των επιμύων και ύστερα από δύο μέρες ανάπαυσης των ζώων, από τη διενέργεια της ωοθηκεκτομής<sup>101</sup>. Κατά τις δύο πρώτες μέρες χορηγήθηκε το εκχύλισμα σε χαμηλή συγκέντρωση ώστε να επιτευχθεί ο εγκλιματισμός των ζώων χωρίς επιπλέον στρες. Αυτή η μέθοδος χορήγησης, κατά βούληση, από τις φυάλες των κλωβών επιλέχθηκε ως πιο βελτιωμένη μέθοδος (refinement) σε σχέση με τη χορήγηση με έυκαμπτο ή άκαμπτο σωλήνα (gavage).

Πιο συγκεκριμένα στην ομάδα OVX+ΟΕ χορηγήθηκε το ΟΕ για 6 μήνες σε συγκέντρωση 150 mg/l. Με αυτόν τον τρόπο, οι επίμυες της ομάδας αυτής λάμβαναν τη δόση των 1.28 mg/kg ανά επίμυ ανα ημέρα, το οποίο είναι αντίστοιχο των 12 mg υδροξυτυροσόλης ανά ημέρα κατά την χορήγηση σε ανθρώπους διά του στόματος<sup>115</sup>. Αυτή η δόση είναι υψηλότερη από τη μικρότερη ενδεικνυόμενη θεραπευτική δόση από την EFSA, η οποία ορίστηκε στα 5 mg ανά ημέρα<sup>116</sup>.

## Διατροφή και συνθήκες διατήρησης των ζώων

Όλοι οι επίμυες κατανάλωναν ειδική τροφή χωρίς προσθήκη σόγιας (Dieta Speciali 4RF21 modified, Mucedola, Italy) με σκοπό την αποφυγή πρόσληψης σόγιας, ένα επίσης φυτοοιστρογόνο, το οποίο θα επηρέαζε πιθανόν τα αποτελέσματά μας (cofounding factor).

Οι επίμυες Wistar ηλικίας 3 μηνών με σωματικό βάρος με μικρή απόκλιση από το μέσο όρο (300 +/-50 g) από τον ίδιο εκτροφέα των οποίων τα χαρακτηριστικά παραμένουν σχετικά σταθερά στην πάροδο του χρόνου, επιλέχθηκαν για την υλοποίηση του συγκεκριμένου πρωτοκόλου. Από την έναρξη του πειράματος, τα ζώα στεγάστηκαν τέσσερα μαζί σε διαφανείς κλωβούς (45x30x20 cm) κάτω από πρότυπες εργαστηριακές συνθήκες, υπό την εποπτεία του αρμόδιου κτηνιάτρου στο χώρο φύλαξης των ζώων Εργαστηρίου, με εναλλαγές ανά 12 ώρες



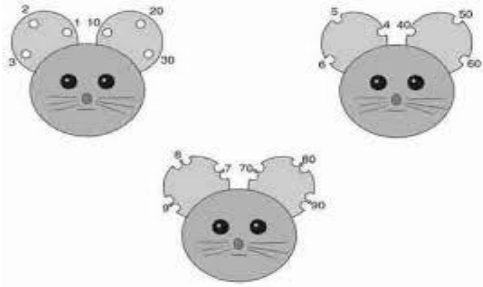
σκότους/φωτός, ελεγχόμενη θερμοκρασία στους 22°C, σχετική υγρασία μεταξύ 55% και 65% καθώς και 15 αλλαγές αέρα/ώρα.

Η κατανάλωση τροφής των ζώων επιλέχθηκε να περιοριστεί σύμφωνα με την κατανάλωση της ομάδας Control με σκοπό την αποφυγή πιθανής πρόκλησης παχυσαρκίας μετά την ωθηκεκτομή από την *ad libitum* κατανάλωση τροφής και των πιθανών συμποκαλούμενων αποτελεσμάτων της, τα οποία θα μπορούσαν να επηρεάσουν τα αποτελέσματα της μελέτης μας. Μετρήσεις της κατανάλωσης τροφής και νερού ή εκχύλισματος πραγματοποιήθηκαν δύο φορές ανά εβδομάδα καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Επίσης, κατά τη διάρκεια του πειράματος, δύο από τα ζώα της ομάδας Control εμφάνισαν συμπτώματα συμβατά με αναπνευστική λοίμωξη και έπρεπε να ευθανατωθούν. Παρ' όλο που η νεκροσκοπική εξέταση δεν ήταν εφικτό να οδηγήσει σε τελική διάγνωση αναπνευστικής λοίμωξης, τα αποτελέσματα αυτών των ζώων αποκλείστηκαν από τη στατιστική ανάλυση.

## Ταυτοποίηση ζώων

Αρχικά τα ζώα παρελήφθησαν από το ινστιτούτο Παστέρ σε νεαρή ηλικία, χωρίστηκαν σε ομάδες, αριθμήθηκαν καταλλήλως και παρέμειναν στις εγκαταστάσεις υπό την φροντίδα του τεχνικού προσωπικού και των κτηνιάτρων μέχρι την ηλικία των εννιά μηνών. Η ταυτοποίηση των ζώων γινόταν με μαρκάρισμα της ουράς, με τη χρήση κατάλληλων ανεξίτηλων, μη τοξικών μαρκαδόρων. Κατά την πρώτη αναισθητοποίηση των ζώων για την πρώτη μέτρηση οστικής πυκνότητας, έγινε η σήμανση των αυτιών των ζώων με τη χρήση κατάλληλου εξοπλισμού για την πρόκληση του ελάχιστα δυνατού τραυματισμού και πόνου. Ο τρόπος μαρκαρίσματος φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 15. Μεθοδολογία σήμανσης για την ταυτοποίηση των επιμύων που συμμετείχαν στο πειραματικό πρωτόκολλο.



Εικόνα 16. Εργαλείο για το τρύπημα με σκοπό τη σήμανση των επιμύων.

## Πειραματικές διαδικασίες

### Εκτίμηση οστικής πυκνότητας

Κατά την ηλικία των 9 μηνών, όλοι οι επίμυες υποβλήθηκαν σε προσδιορισμό της οστικής τους πυκνότητας με απορροφησιμετρία διπλής ενεργειακής δέσμης ακτινών X (Dual

Energy X-ray Absorptiometry/DEXA) ένα μήνα πριν την ωθηκεκτομή, στη συνέχεια στους 3 και τέλος στους 6 μήνες. Οι τιμές υπολογίστηκαν σε γραμμάρια ανά τετραγωνικό εκατοστό ( $\text{g}/\text{m}^2$ ).

Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Lunar Prodigy Advance Densitometer, το οποίο λειτουργεί με υψηλή ανάλυση, και περιλαμβάνει λογισμικό ειδικό για μικρά θηλαστικά. Οι μετρήσεις λαμβάνονταν μόνο από τον ίδιο έμπειρο χειριστή, ύστερα από το τέλος του πειραματικού πρωτοκόλλου. Για τη διενέργεια των μετρήσεων τα ζώα έλαβαν ενδομυϊκά ελαφρά ηρέμηση με χαμηλή δόση δεξμεδετομιδίνης, Dexdomitor, Zoetis (0.25 mg/kg) και κεταμίνης, Ketaset, Zoetis (50 mg/kg), που χορηγήθηκε από εξειδικευμένους κτηνιάτρους της ομάδας μας. Για τη γρηγορότερη και ασφαλέστερη ανάνηψη των ζώων από την ελαφρά ηρέμηση, χρησιμοποιήθηκε ενδομυϊκά ατιπαμεζόλη, Antisedan, Zoetis σε δόση (1 mg/kg) αντίστοιχη με το βάθος της αναισθησίας του κάθε ζώου. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε στους 3 και στους 6 μήνες για την εκτίμηση της οστικής πυκνότητας των επιμύων.<sup>8,9,10</sup> Κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων των μετρήσεων ο χειριστής καθόρισε δύο διαφορετικές περιοχές ενδιαφέροντος (Regions of Interest-ROI). Η μία περιοχή ενδιαφέροντος κάλυπτε ολόκληρη την κνήμη και η άλλη (διαστάσεων 2x2 mm) κάλυπτε την εγγύς μεσότητα της μετάφυσης της κνήμης, σε απόσταση 3 mm από το κνημιαίο πλατώ. Τα αποτελέσματα αποτυπώνονται ως αποτελέσματα ολόκληρης κνήμης και αποτελέσματα της εγγύς κνήμης αντίστοιχα<sup>101</sup>. Το σύστημα βαθμονομούνταν πριν από την κάθε μέτρηση της εκάστοτε ομάδας και η *in vitro* ακρίβεια (συντελεστής μεταβλητότητας) του συστήματος ήταν 0.5%.

Κατά την έναρξη της πειραματικής μελέτης, τα ζώα διανεμήθηκαν σε τρεις ομάδες, με βασικό κριτήριο, οι μέσοι όροι των σωματικών βαρών των ομάδων να μην εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Παρόλα αυτά, κατά την αρχική μέτρηση, ο μέσος όρος των απόλυτων τιμών της οστικής πυκνότητας των ζώων της ομάδας Control ήταν στατιστικά σημαντικά μειωμένος σε σύγκριση με τον αντίστοιχο μέσο όρο των ομάδων OVX και OVX+OE. Γι' αυτό το λόγο αποφασίσαμε ότι η ανάλυση και του ποσοστού του μεταβολής από την αρχική μέτρηση των τιμών της οστικής πυκνότητας για όλες τις ομάδες ήταν απαραίτητη με σκοπό να συγκρίνουμε με πιο αντικειμενικό τρόπο τις πιθανές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες και της ίδιας ομάδας ανά χρονική στιγμή ελέγχου.

## Ωθηκεκτομή

Ύστερα από χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των επτά ημερών από τη διενέργεια μέτρησης DEXA για τον προσδιορισμό της αρχικής οστικής πυκνότητας, τα ζώα υποβλήθηκαν σε χειρουργείο ωθηκεκτομής. Αρχικά, έλαβε χώρα η χορήγηση ενδομυϊκής γενικής αναισθησίας και παράγοντα γρήγορης ανάνηψης (δεξμεδετομιδίνη, Dexdomitor, Zoetis 0.25 mg/kg, σε συνδυασμό με κεταμίνη, Ketaset, Zoetis 50 mg/kg, και για την ανάνηψη ατιπαμεζόλη, Antisedan, Zoetis σε δόση 1 mg/kg), όπως και υποδόριας προεγχειρητικής αναλγησίας (καρπροφένη, carprofen, Rimadyl, Zoetis, 4 mg/kg) και υποδόριας χημειοπροφύλαξης (ενροφλοξασίνη, enrofloxacin, Baytril, Bayer, 10 mg/kg). Στη συνέχεια η προετοιμασία του εγχειρητικού πεδίου, πραγματοποιήθηκε τομή του δέρματος στη μέση γραμμή και σε μήκος ίσο με το μισό της απόστασης από τον ομφαλό ως την ηβοϊσχιακή σύμφυση. Με κυρτό ψαλίδι αποχωρίστηκε ο υποδόριος ιστός και αποκαλύφθηκε η λευκή γραμμή. Ακολούθησε τομή της λευκής γραμμής και είσοδος στην περιτοναϊκή κοιλότητα. Μετά την ανεύρεση της αριστερής ωθήκης διαχωρίστηκε ο πλατύς σύνδεσμος σε περιοχή όπου δεν υπάρχουν αγγεία. Στη συνέχεια και με απορροφήσιμο ράμμα 4-0 πραγματοποιήθηκαν δύο απολινώσεις. Η πρώτη στο ύψος του ίδιου συνδέσμου της ωθήκης και η δεύτερη κεφαλικά της ωθήκης στον κρεμαστήρα σύνδεσμο. Επανελήφθηκε η ίδια διαδικασία και για τη δεξιά ωθήκη. Η σύγκλειση των κοιλιακών τοιχωμάτων επετεύχθη με απλές χωριστές ραφές και απορροφήσιμο ράμμα 4-0. Στο δέρμα χρησιμοποιήθηκε μη απορροφήσιμο ράμμα και η σύγκλειση της χειρουργικής τομής διενεργήθηκε με Π οριζόντιες ραφές. Η χορήγηση αναλγησίας και χημειοπροφύλαξης επαναλήφθηκε για τρεις ημέρες μετεγχειρητικά.

## Ευθανασία

Όλοι οι επίμυες ευθανατώθηκαν, μετά από χορήγηση αναισθησίας με κεταμίνη και δεξμεδετομιδίνη και λήψη αίματος (τελική αιμοληψία-αφαίμαξη) από την οπίσθια κοίλη φλέβα. Το πλάσμα που συλλέχθηκε, διατηρήθηκε στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για μετρήσεις όσων βιοχημικών δεικτών οστικής παραγωγής και απορρόφησης, καθώς και δεικτών τοξικής επίδρασης των εκχυλισμάτων ήταν εφικτό με την υπάρχουσα ποσότητα πλάσματος. Επίσης, ακολούθησε η συλλογή των ακόλουθων οργάνων: ήπατος, εγκεφάλου, ουροδόχου κύστεως, καρδίας, δεξιού νεφρού, μήτρας, λεπτού εντέρου και μαστού όπου διαχωρίστηκαν στη μέση και το ένα μέρος παρασκευάστηκε και φυλάχθηκε στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για διενέργεια ιστολογικών εξετάσεων όταν καταστούν εφικτές στο μέλλον, ενώ το υπόλοιπο τοποθετήθηκε σε ειδικά δοχεία με διάλυμα φορμόλης για τη διενέργεια παθολογοανατομικών εξετάσεων για τον πιθανό έλεγχο της τοξικότητας των εκχυλισμάτων. Η δεξιά κνήμη, ύστερα από καθαρισμό από τους περιβάλλοντες ιστούς τέθηκε σε φιαλίδιο με οινόπνευμα, ενώ η αριστερή σε διάλυμα φορμόλης και εστάλη για ιστομορφομετρικές μετρήσεις όταν καταστούν εφικτές στο μέλλον. Το αριστερό και το δεξί μηριαίο οστόν, αφού τοποθετήθηκαν σε ειδικά δοχεία διπλωμένα με γάζες και εμποτισμένα με φυσιολογικό ορό, φυλάχθηκαν στους  $-20^{\circ}\text{C}$  και εστάλησαν στο Πολυτεχνείο για μετρήσεις μηχανικής αντοχής.

## Αιμοληψία

Κατά την ευθανασία των ζώων διενεργήθηκε αιμοληψία από την οπίσθια κοίλη φλέβα, ως τελική πειραματική διαδικασία χωρίς ανάνηψη. Το αίμα φυγοκεντρήθηκε άμεσα και το πλάσμα που συλλέχθηκε διατηρήθηκε στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για μετρήσεις βιοχημικών δεικτών.

## Πειραματική διαδικασία κάμψης τριών σημείων για τον προσδιορισμό της μηχανικής αντοχής των οστών

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω μετά την ευθανασία το αριστερό και το δεξιό μηριαίο οστό καθαρίστηκαν από τους γύρω ιστούς και καταψύχθηκαν σε θερμοκρασία  $-20^{\circ}\text{C}$ , τυλιγμένα σε εμποτισμένες γάζες με φυσιολογικό ορό και μεταφέρθηκαν στο Εργαστήριο Μηχανικής Αντοχής, της Σχολής Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών, του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου (Ε.Μ.Π.)<sup>117</sup>. Την ημέρα των πειραμάτων τα δοκίμια αποψύχθηκαν για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και παρέμειναν τυλιγμένα στις εμποτισμένες με φυσιολογικό ορό γάζες τους, εκτός από την χρονική περίοδο των μετρήσεων<sup>118</sup>. Κάθε ζεύγος οστών (αριστερό και δεξί του ίδιου πειραματόζωου) υποβλήθηκαν σε κάμψη την ίδια μέρα, ενώ η σειρά πειραμάτων κάθε ζευγαριού δοκιμίων είχε καθοριστεί από την ημερομηνία ευθανασίας, ξεκινώντας από αυτά που θανατώθηκαν πρώτα. Τα δοκίμια ήταν αποθηκευμένα σε κλειστά δοχεία στους  $-20^{\circ}\text{C}$ , διαδικασία που έχει αποδειχθεί ότι δεν επιφέρει σημαντικές αλλοιώσεις στα μηχανικά χαρακτηριστικά των δοκιμίων<sup>118</sup>.

Τα δοκίμια κωδικοποιήθηκαν με αποκλειστικό κωδικό που αντιστοιχεί στο πρωτόκολλο της εμβιομηχανικής RF (right femur) για τα δεξιά μηριαία οστά και LF (left femur) για τα αριστερά μηριαία οστά και αύξοντα αριθμό που αντιστοιχεί σε κάθε ζώο εργαστηρίου.

Αφού καθαρίστηκαν από τυχόν μαλακούς ιστούς που θα αλλοίωναν την λήψη των μετρήσεων έγινε η τεκμηρίωση του κάθε δοκιμίου με φωτογράφιση της εμπρόσθιας και της οπίσθιας πλευράς καθώς και η σημείωση οποιασδήποτε αξιολογής ανατομικής παρατήρησης. Έπειτα, επεβλήθη φόρτιση στο κέντρο της διάφυσης του οστού στο προσθιο-οπίσθιο επίπεδο μέσω της μετατόπισης εμβόλου υπό οιονεί στατικές συνθήκες (quasi-static loading conditions) και συγκεκριμένα με ρυθμό επιβολής της μετατόπισης ίσο με  $0.1 \text{ mm/min}$ . Ειδικός πλαστικός κύλινδρος διαμέτρου  $2 \text{ mm}$  είχε τοποθετηθεί στο έμβολο του πλαισίου φόρτισης, έτσι ώστε να ασκηθεί το φορτίο χωρίς να προκαλούνται βλάβες στο οστό κατά την επιβολή του φορτίου. Το πείραμα βιντεοσκοπούσαν καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας. Έπειτα η φόρτιση συνεχίστηκε μέχρι τη θραύση του δοκιμίου, η οποία σηματοδοτούσε και την

ολοκλήρωση της μέτρησης. Όλα τα δεδομένα του κάθε πειράματος καταγράφηκαν μέσω των προγραμμάτων TestWorks 4, το οποίο ελέγχει το πλαίσιο φόρτισης και το RTSS Control & Analysis Software, που ελέγχει το οπτικό μηκυνσιόμετρο. Τέλος, κάθε σπασμένο δοκίμιο φωτογραφήθηκε από την εμπρόσθια και την οπίσθια πλευρά, σημειώθηκαν οποιεσδήποτε αξιόλογες παρατηρήσεις σχετικά με το δοκίμιο και τη ροή της διαδικασίας και επανατοποθετήθηκαν στην κατάψυξη.

## Στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος±τυπική απόκλιση ( $MO\pm TA$ ) και η μέθοδος Shapiro-Wilks εξέτασε την κανονική διακύμανση των παραμέτρων.

Το two-way Mixed ANOVA μοντέλο χρησιμοποιήθηκε, ορίζοντας ως παράγοντες την 'παρέμβαση' (ανάμεσα στις ομάδες) και το 'χρόνο' (διαχρονικά στην κάθε ομάδα) για την ανάλυση των αποτελεσμάτων των μετρήσεων της οστικής πυκνότητας. Καθώς διαπιστώθηκε ότι υπήρχε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση ανάμεσα σε αυτούς τους παράγοντες, χρησιμοποιήσαμε μονοπαραγοντική ανάλυση, για παράδειγμα η σύγκριση ανάμεσα στις ομάδες για κάθε χρονικό σημείο ξεχωριστά και η σύγκριση των χρονικών σημείων για κάθε ομάδα ξεχωριστά. Με αυτόν τον τρόπο επιτύχαμε την κατάλληλη προσαρμογή των τιμών σημαντικότητας ( $p$ -values), με βάση το Bonferroni correction.

Πιο συγκεκριμένα, το μοντέλο One-factor-Repeated-Measures ANOVA χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση των διαφορετικών χρονικών μετρήσεων των παραμέτρων της οστικής πυκνότητας για κάθε ομάδα και το μοντέλο One-way ANOVA για τη σύγκριση μεταξύ των ομάδων σε κάθε χρονικό σημείο ξεχωριστά, κάνοντας όλες τις προσαρμογές των τιμών σημαντικότητας. Η αποτελεσματικότητα της θεραπείας κατά τη διάρκεια της περιόδου παρατήρησης αξιολογήθηκε με τον υπολογισμό των μέσων όρων του ποσοστού μεταβολής από την αρχική μέτρηση, μετά τους τρεις και μετά τους έξι μήνες αντίστοιχα. Η σύγκριση του ποσοστού μεταβολής από την αρχή μέτρηση των παραμέτρων οστικής πυκνότητας κατά τη

διάρκεια της περιόδου παρατήρησης ανάμεσα στις τρεις ομάδες αναλύθηκε χρησιμοποιώντας το μοντέλο One-way ANOVA και οι συγκρίσεις ανά ζεύγη πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το Bonferroni test. Τα Kruskal Wallis και Mann-Whitney τεστ χρησιμοποιήθηκαν στην περίπτωση που τα δεδομένα δεν εμφάνιζαν κανονική κατανομή.

Η σύγκριση των μετρήσεων της κάμψης τριών σημείων και του λόγου βάρους οργάνων προς το σωματικό βάρος πραγματοποιήθηκε, χρησιμοποιώντας το μοντέλο One-way ANOVA. Οι συγκρίσεις κατά ζεύγη πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το Bonferroni test. Όλα τα τεστ ήταν διπλής όψεως, και η στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε ως  $p < 0.05$ . Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το στατιστικό πακέτο SPSS nr 17.00 (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, Ill., USA).



## Αποτελέσματα

### Οστική Πυκνότητα

Οι μετρήσεις DEXA διενεργήθηκαν ένα μήνα πριν την ωθηκεκτομή (αρχική μέτρηση στην ηλικία των 9 μηνών), στη συνέχεια στους 3 και τέλος στους 6 μήνες μετά την ωθηκεκτομή. Τα αποτελέσματα αυτών των μετρήσεων παρουσιάζονται στους πίνακες 3. και 4.

### Μεταβολές της οστικής πυκνότητας κατά τη μέτρηση ολόκληρης της κνήμης

Παρόλο που τα ζώα δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς το βάρος τους κατά την κατανομή τους σε ομάδες στην ηλικία των τριών μηνών, κατά την αρχική μέτρηση DEXA (baseline), οι απόλυτες τιμές της ολικής κνήμης της Control ομάδας ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερες σε σύγκριση με την ομάδα OVX ( $p < 0.005$ ), όπως και σε σύγκριση με την ομάδα του εκχυλίσματος (OVX + OE) ( $p < 0.05$ ).

Κατά την διαχρονική ανάλυση της Control ομάδας οι τιμές οστικής πυκνότητας εμφανίστηκαν να αυξάνονται στους τρεις ( $p = 0.019$ ) και στους έξι μήνες αντίστοιχα ( $p = 0.016$ ). Αντίθετα για την ομάδα OVX η οστική πυκνότητα μειώθηκε στατιστικά σημαντικά σε σύγκριση με την αρχική μέτρηση στους τρεις μήνες ( $p < 0.005$ ) και στους έξι μήνες αντίστοιχα ( $p < 0.005$ ). Για την ομάδα του εκχυλίσματος OVX+OE η οστική πυκνότητα επίσης μειώθηκε στατιστικά σημαντικά από την αρχική μέτρηση στους 3 ( $p = 0.006$ ) και στους 6 ( $p = 0.05$ ) μήνες αντίστοιχα.

Στη συνέχεια αναλύσαμε τις ποσοστιαίες μεταβολές της οστικής πυκνότητας, όπου εντοπίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες από την αρχική μέτρηση στους τρεις μήνες και από τους τρεις μήνες στους έξι μήνες αντίστοιχα. Η ομάδα Control εμφάνισε λοιπόν αύξηση κατά  $5.65 \pm 4.27\%$  και στη συνέχεια επίσης αύξηση  $11.96 \pm 8.83\%$ . Η

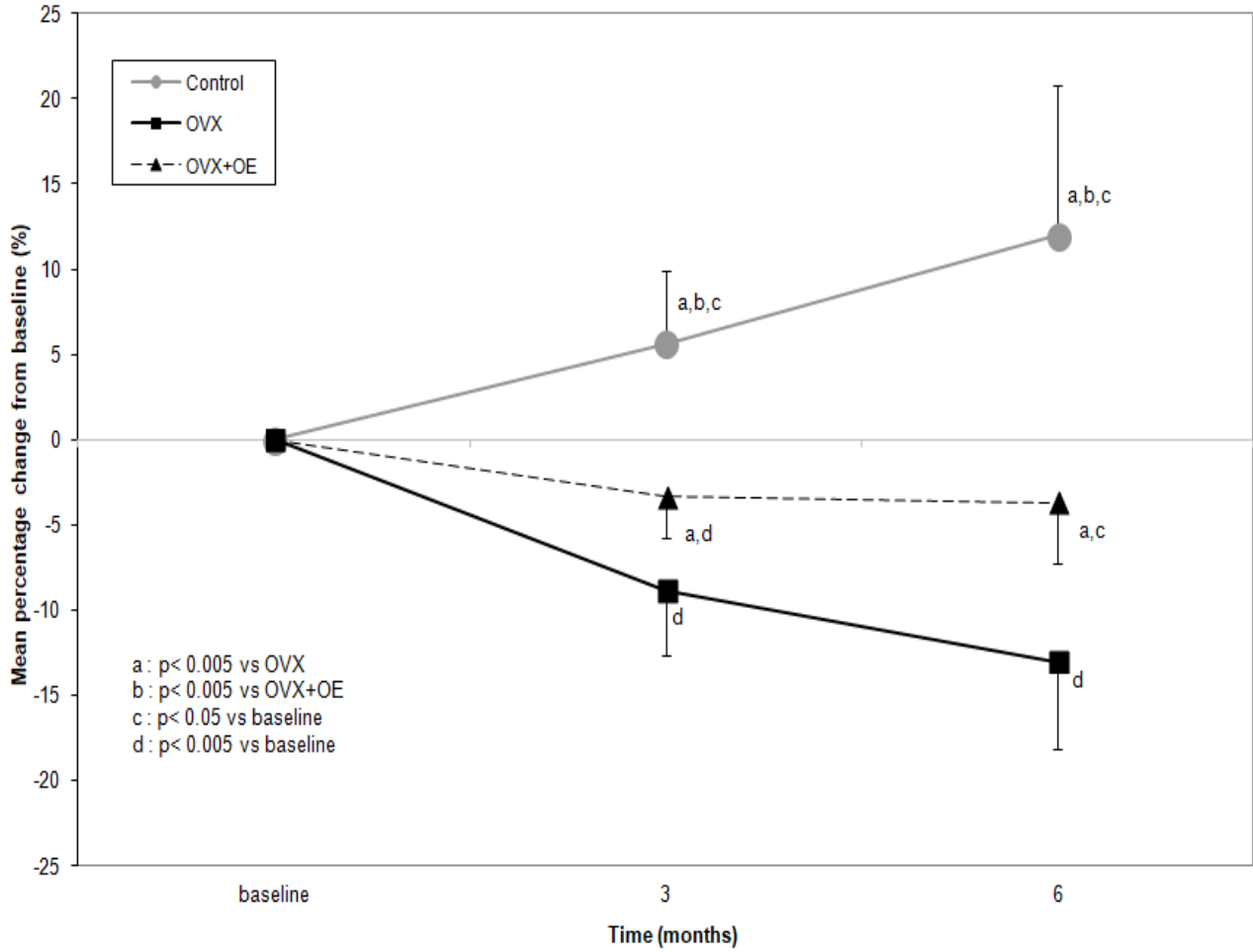
ομάδα ΟΝΧ μείωση  $-8.87 \pm 3.80\%$  και στη συνέχεια περαιτέρω μείωση  $-13.03 \pm 5.11\%$ . Η ομάδα ΟΝΧ+Ε μείωση  $-3.35 \pm 2.36\%$  και στη συνέχεια ελάχιστη μείωση κατά  $-3.68 \pm 3.56\%$ . Όπως φαίνεται και στον πίνακα 3. όλες οι ομάδες βρέθηκαν να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους σε όλες τις χρονικές περιόδους που μελετήθηκαν.

Ομάδες ζώων	Αρχική μέτρηση, (mean±SD)	3 μήνες, (mean±SD)	6 μήνες, (mean±SD)	p-value κατά τη διαχρονική σύγκριση ανά ομάδα	% μεταβολή Αρχικής μέτρησης- 3 μήνες, (mean±SD)	% μεταβολή Αρχικής μέτρησης- 6 μήνες, (mean±SD)
<b>Control</b>	0.204±0.009 <sup>b,c</sup>	0.215±0.010 <sup>a,e</sup>	0.228±0.015 <sup>b,c,e</sup>	0.001	5.65±4.27 <sup>b,d</sup>	11.96±8.83 <sup>b,d</sup>
<b>OVX</b>	0.225±0.015	0.204±0.007 <sup>f</sup>	0.195±0.009 <sup>d,f</sup>	<0.005	-8.87±3.80 <sup>d</sup>	-13.03±5.11 <sup>d</sup>
<b>OVX + OE</b>	0.220±0.009	0.212±0.006 <sup>f</sup>	0.211±0.006 <sup>e</sup>	0.001	-3.35±2.36	-3.68±3.56
p-value ανάμεσα στις ομάδες	0.002	0.021	<0.005		<0.005	<0.005

**Πίνακας 3.** Σύγκριση της οστικής πυκνότητας ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) της ολικής κνήμης, απόλυτες τιμές και μέσος όρος των ποσοστιαίων μεταβολών από την αρχική μέτρηση (baseline μέτρηση 1 μήνα πριν την ωθηκεκτομή), στους τρεις και στους έξι μήνες μετά την ωθηκεκτομή, ανάμεσα στις ομάδες κατά τη διάρκεια της περιόδου παρατήρησης των έξι μηνών.

<sup>a</sup>p<0.05 vs OVX, <sup>b</sup>p<0.005 vs OVX, <sup>c</sup>p<0.05 vs OVX+OE, <sup>d</sup>p<0.005 vs OVX+OE,

<sup>e</sup>p<0.05 vs baseline, <sup>f</sup>p<0.005 vs baseline



Γράφημα 1. Γραφική παρουσίαση των μέσων ποσοστιαίων BMD ολικής κνήμης από τη βασική μέτρηση (baseline) μέχρι τους 3 και 6 μήνες, και στις τρεις ομάδες.

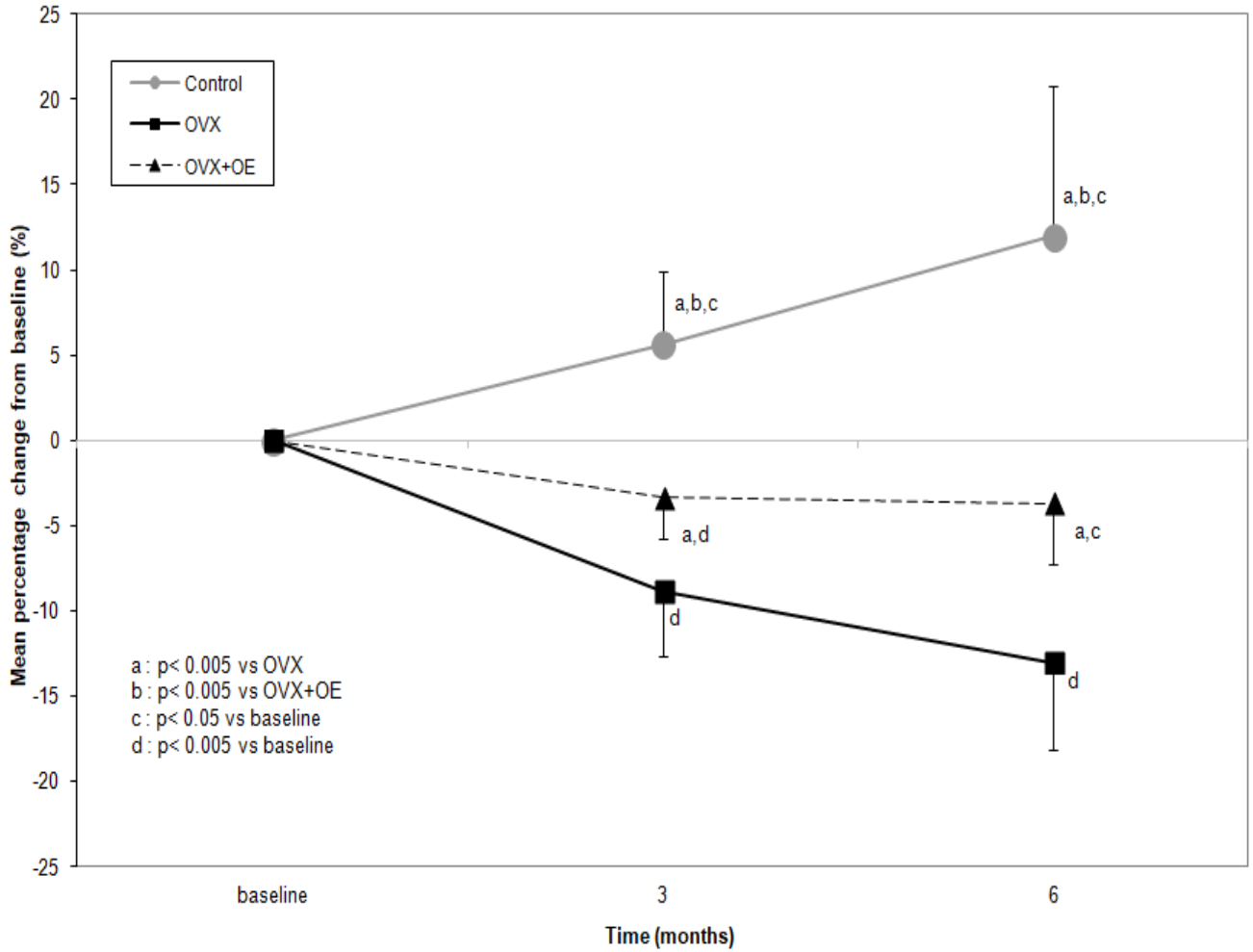
## Μεταβολές της οστικής πυκνότητας κατά τη μέτρηση της εγγύος μετάφυσης της κνήμης

Κατά την αρχική μέτρηση της εγγύος κνήμης οι τρεις ομάδες δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους. Κατά τη διαχρονική ανάλυση εντός της ομάδας, η ομάδα Control εμφάνισε στατιστικά σημαντική αύξηση από την αρχική μέτρηση στους 3 ( $p=0.041$ ) και 6 ( $p=0.004$ ) μήνες αντίστοιχα. Η ομάδα OVX μειώθηκε στατιστικά σημαντικά από την αρχική μέτρηση συγκρινόμενη με τους 3 ( $p<0.005$ ) και με τους 6 ( $p<0.005$ ) μήνες αντίστοιχα. Το ίδιο εύρημα παρουσιάστηκε για την ομάδα OVX+OE, η οποία εμφάνισε μείωση στους 3 ( $p<0.005$ ) και στους 6 ( $p<0.005$ ) μήνες αντίστοιχα.

Στη συνέχεια υπολογίστηκαν οι ποσοστιαίες μεταβολές της οστικής πυκνότητας της εγγύος μετάφυσης της κνήμης από την αρχική μέτρηση στους 3 μήνες και από τους 3 μήνες στους 6 μήνες. Η ομάδα Control εμφάνισε λοιπόν αύξηση κατά  $3.96\pm 3.57\%$  και στη συνέχεια επίσης αύξηση  $8.10\pm 4.58\%$  αντίστοιχα. Η ομάδα OVX εμφάνισε μείωση  $-18.42\pm 3.05\%$  και στη συνέχεια περαιτέρω μείωση  $-27.86\pm 3.69\%$  αντίστοιχα. Η ομάδα OVX+E εμφάνισε μείωση  $-9.27\pm 3.85\%$  και στη συνέχεια μικρή μείωση κατά  $-12.95\pm 4.49\%$  αντίστοιχα. Κατά την ανάλυση των ποσοστιαίων μεταβολών αναδείχθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές όταν συγκρίναμε τις παρακάτω ομάδες μεταξύ τους: Control με OVX ( $p<0.005$ ), Control με OVX+E ( $p<0.005$ ) όπως και OVX με OVX+OE ( $p<0.005$ ) αντίστοιχα.

Ομάδες ζώων	Αρχική μέτρηση, (mean±SD)	3 μήνες, (mean±SD)	6 μήνες, (mean±SD)	p-value κατά τη διαχρονική σύγκριση ανά ομάδα	% μεταβολή Αρχικής μέτρησης-3 μήνες, (mean±SD)	% μεταβολή Αρχικής μέτρησης-6 μήνες, (mean±SD)
<b>Control</b>	0.395±0.22	0.410±0.19 <sup>b,c,e</sup>	0.427±0.025 <sup>b,d,f</sup>	<0.005	3.96±3.57 <sup>b,d</sup>	8.1±4.58 <sup>b,d</sup>
<b>OVX</b>	0.407±0.020	0.332±0.19 <sup>c,f</sup>	0.293±0.011 <sup>d,f</sup>	<0.005	-18.42±3.05 <sup>d</sup>	-27.86±3.69 <sup>d</sup>
<b>OVX+ OE</b>	0.407±0.029	0.370±0.038 <sup>f</sup>	0.354±0.032 <sup>f</sup>	<0.005	-9.27±3.85	-12.95±4.49
p-value ανάμεσα στις ομάδες	0.495	<0.005	<0.005		<0.005	<0.005

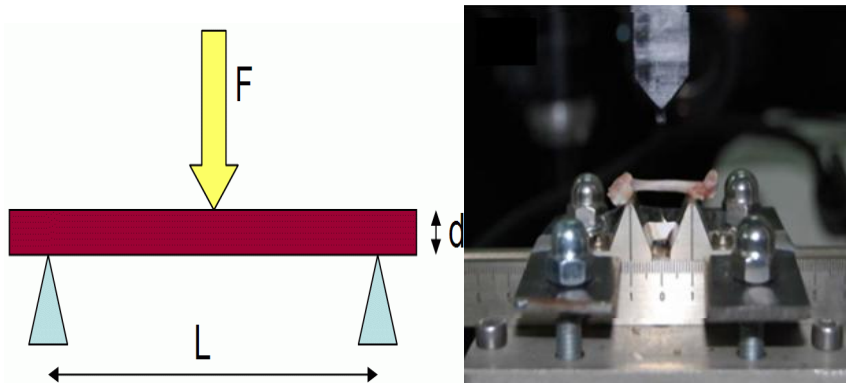
**Πίνακας 4.** Σύγκριση της οστικής πυκνότητας ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) της εγγύος κνήμης των απόλυτων τιμών και των μέσων ποσοστιαίων μεταβολών από την αρχική μέτρηση (baseline μέτρηση 1 μήνα πριν την ωθηκεκτομή), στους τρεις και στους έξι μήνες μετά την ωθηκεκτομή, ανάμεσα στις ομάδες κατά τη διάρκεια της περιόδου παρατήρησης των έξι μηνών.



**Γράφημα 2.** Γραφική παρουσίαση των μέσων ποσοστιαίων BMD εγγύος κνήμης από τη βασική μέτρηση (baseline) μέχρι τους 3 και 6 μήνες, και στις τρεις ομάδες.

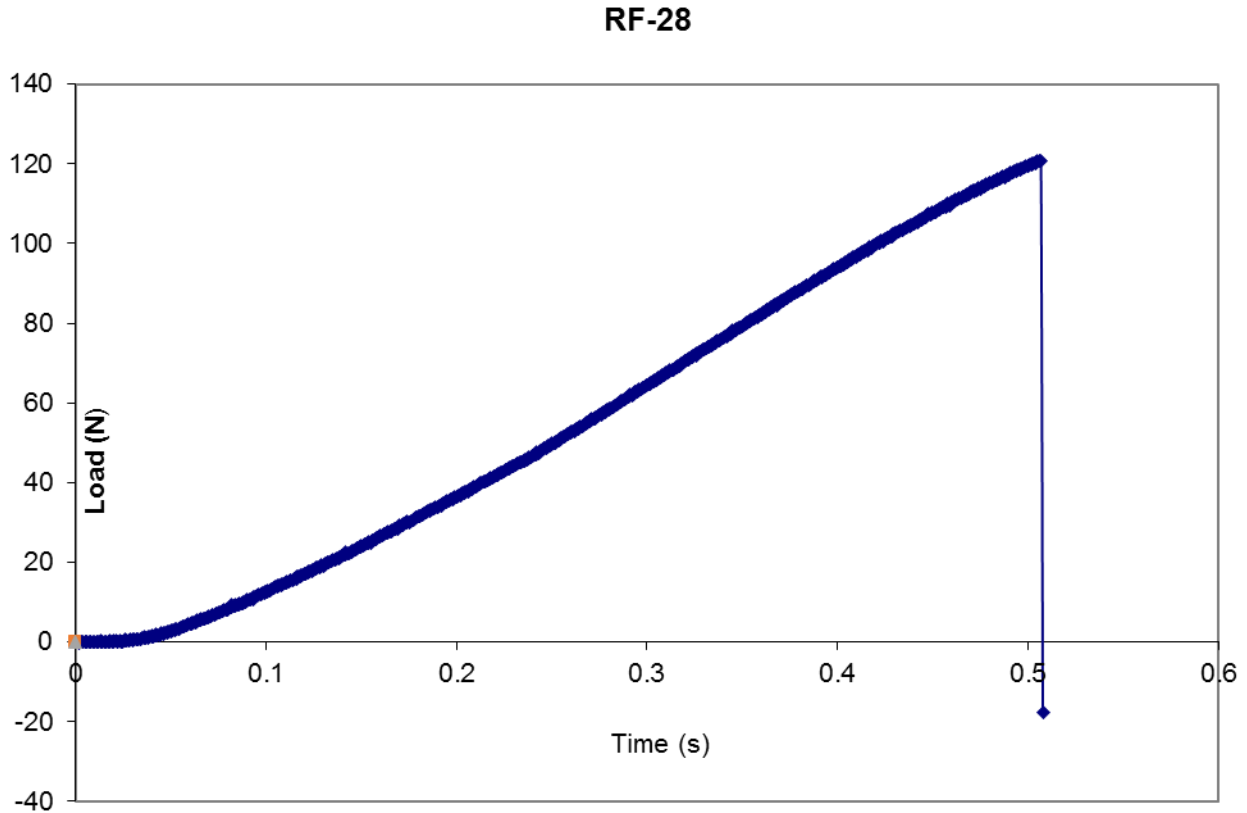
### Δοκιμές μηχανικής αντοχής των οστών

Μετά από το τέλος της πειραματικής διαδικασίας της κάμψης τριών σημείων (*ex vivo*), μπορέσαμε να προσδιορίσουμε την αντοχή και τη στιβαρότητα των οστών. Για τους υπολογισμούς αυτών των παραμέτρων ήταν απαραίτητη η χρησιμοποίηση παραμέτρων όπως: της μέγιστης δύναμης θραύσεως, της στιβαρότητας των δοκιμίων (N/mm), (από την καμπύλη φόρτισης-παραμόρφωσης, ως η κλίση του ευθύγραμμου τμήματος της καμπύλης), της τάσης θραύσης και της απορροφούμενης ενέργειας παραμορφώσεων ανά μονάδα όγκου ιστού (mJ), (υπολογίζεται από την καμπύλη φόρτισης-παραμόρφωσης, ως το εμβαδό που περικλείεται από την καμπύλη).



Εικόνα 17. Αναπαράσταση της δοκιμασίας κάμψης τριών σημείων (*ex vivo*).





Γράφημα 3. Υπόδειγμα καμπύλης φόρτισης-παραμόρφωσης που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της στιβαρότητας των δοκιμίων (N/mm) και της απορροφούμενης ενέργειας παραμορφώσεων ανά μονάδα όγκου ιστού (mJ).

Όλες οι παράμετροι υπολογίστηκαν στα δεξιά και στα αριστερά μηριαία οστά και η μέση τιμή τους ανά ομάδα παρατίθεται στον πίνακα 5. Στη συνέχεια, επιχειρήθηκε και η ανάλυσή τους ως σύνολο, αφού η στατιστική ανάλυση δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ δεξιού και αριστερού δοκιμίου (Πίνακας 6.).

ΟΜΑΔΕΣ	Μέγιστη Δύναμη (N)		Ενέργεια (mJ)		Στιβαρότητα (N/mm)	
	Δεξί μηριαίο	Αριστερό μηριαίο	Δεξί μηριαίο	Αριστερό μηριαίο	Δεξί μηριαίο	Αριστερό μηριαίο
<b>CONTROL</b>	116.18±18.3	122.47±18.10	25.98±8.89	29.89±9.02	307.87±38.34	306.63±48.90
<b>OVX</b>	120.86±22.22	111.92±11.25	28.68±7.10	27.55±7.57	297.56±42.21	271.19±21.45
<b>OVX + OE</b>	118.71±11.53	113.97±18.00	27.55±3.98	30.17±7.93	290.05±34.92	271.77±44.85

Πίνακας 5. Τιμές Μέγιστης Δύναμης, δαπανηθείσας Ενέργειας και Στιβαρότητας δεξιών και αριστερών μηριαίων οστών όλων των ομάδων ελέγχου. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας±τυπική απόκλιση μέσης τιμής.

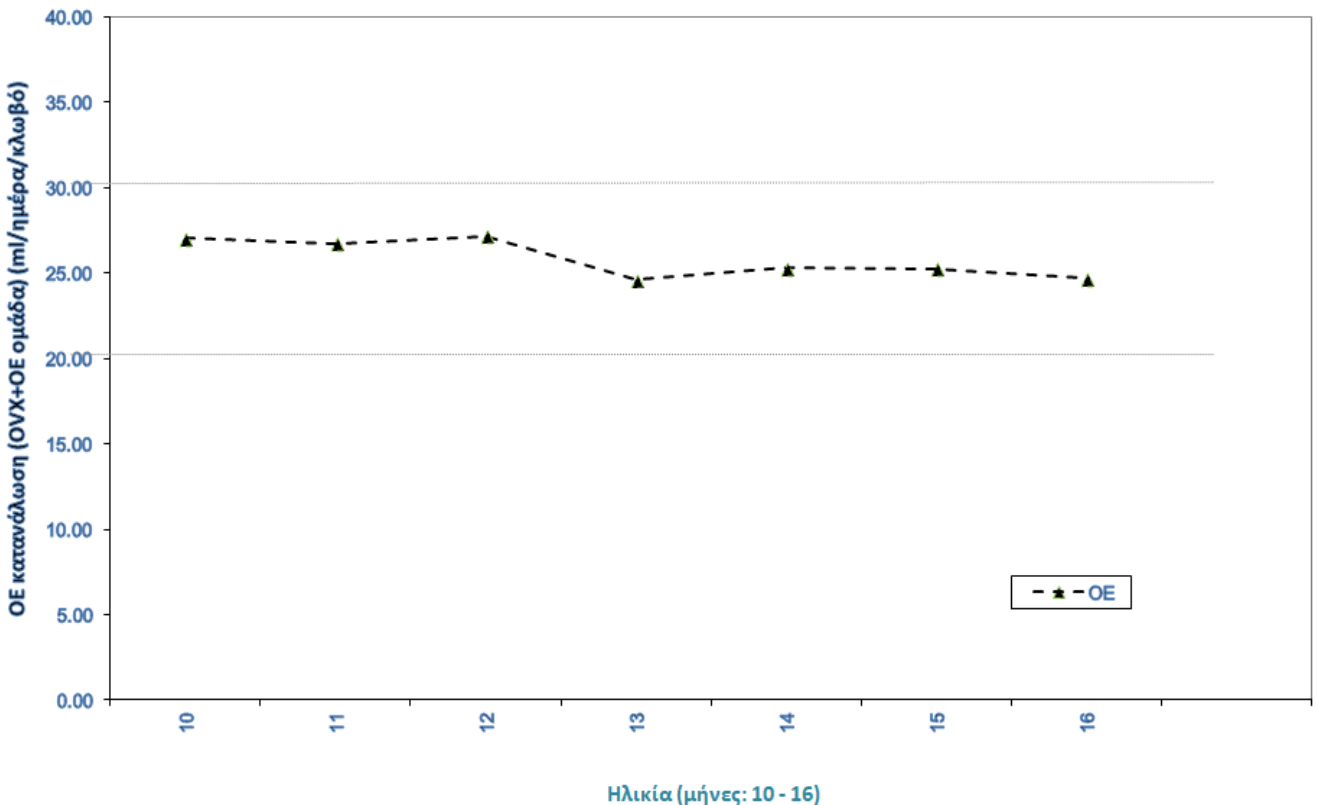
ΟΜΑΔΕΣ	Μέγιστη Δύναμη (N)	Ενέργεια (mJ)	Στιβαρότητα (N/mm)
CONTROL	119.32±4.62	27.94±1.92	307.25±11.33
OVX	116.39±4.13	28.12±1.72	284.37±10.13
OVX + OE	116.34±4.13	28.86±1.72	280.91±10.13

**Πίνακας 6. Τιμές Μέγιστης Δύναμης, Ενέργειας και Στιβαρότητας όλων των ομάδων ελέγχου συνολικά αριστερών και δεξιών μηριαίων. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση τιμή της ομάδας±τυπική απόκλιση μέσης τιμής.**

Η μέγιστη δύναμη που ασκήθηκε για την ομάδα Control 119.32±4.61 N, για την ομάδα OVX 116.38±4.13 N και για την ομάδα OVX+OE που έλαβε το εκχύλισμα 116.34±4.13 N. Αντίστοιχα η ενέργεια που χρειάστηκε να δαπανηθεί για την θραύση του δοκιμίου ήταν 27.94±1.92 mJ για την ομάδα Control 28.12±1.72 mJ για την ομάδα OVX και 28.86±1.72 mJ για την ομάδα OVX+OE. Τέλος η στιβαρότητα εμφανίσε τα εξής αποτελέσματα: Control 307.25±11.33 (N/mm), OVX: 284.37±10.13 (N/mm) και OVX+OE: 280.91±10.13 (N/mm). Η στατιστική ανάλυση δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων για τις παραμέτρους αυτές. Η αστοχία του υλικού εκδηλώθηκε με την εξάπλωση μιας σχεδόν κάθετης ρωγμής, η οποία ξεκινούσε από την αντίθετη πλευρά του οστού σε σχέση με την πλευρά που εφαρμοζόταν η φόρτιση (χαρακτηριστικό ψαθυρών υλικών, όπως τα οστά). Στις λίγες περιπτώσεις που οι ρωγμές ήταν επικλινείς σε σχέση με τον επιμήκη άξονα, τα οστά εξαιρέθηκαν από τη στατιστική ανάλυση.

## Έλεγχος κατανάλωσης εκχυλίσματος

Κατά τη διάρκεια της πειραματικής μελέτης, ελέγχουμε σε τακτικά διαστήματα την κατανάλωση του εκχυλίσματος του καρπού της ελιάς, 2 φορές την εβδομάδα, με σκοπό την επιβεβαίωση ότι τα ζώα λάμβαναν φυσιολογική ποσότητα υγρών ώστε να καλύψουν τις φυσιολογικές τους ανάγκες και ταυτόχρονα ότι προσελάμβαναν κανονική ποσότητα εκχυλίσματος, ώστε να μπορούμε να εκτιμήσουμε με αξιοπιστία τα αποτελέσματα της παρέμβασής μας. Η κατανάλωση του εκχυλίσματος από την αντίστοιχη ομάδα (ΟΝΧ+ΟΕ) παρέμεινε μέσα στα φυσιολογικά επίπεδα καθ'όλη τη διάρκεια της μελέτης (Γράφημα 4.). Τα ζώα κατανάλωναν κανονικά το εκχύλισμα χρησιμοποιώντας τις φιάλες των κλωβών τους και δεν εμφάνισαν κάποιο σύμπτωμα σε κανένα στάδιο του πρωτοκόλλου.



Γράφημα 4. Κατανάλωση ομάδας εκχυλίσματος ΟΕ κατά τη διάρκεια της περιόδου παρατήρησης.

## Έλεγχος Σωματικών βαρών

Δύο μετρήσεις σωματικών βαρών διενεργήθηκαν ανά εβδομάδα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 5 και στο γράφημα 5. Τα αρχικά σωματικά βάρη δεν ήταν διαφορετικά με στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 3 ομάδες.

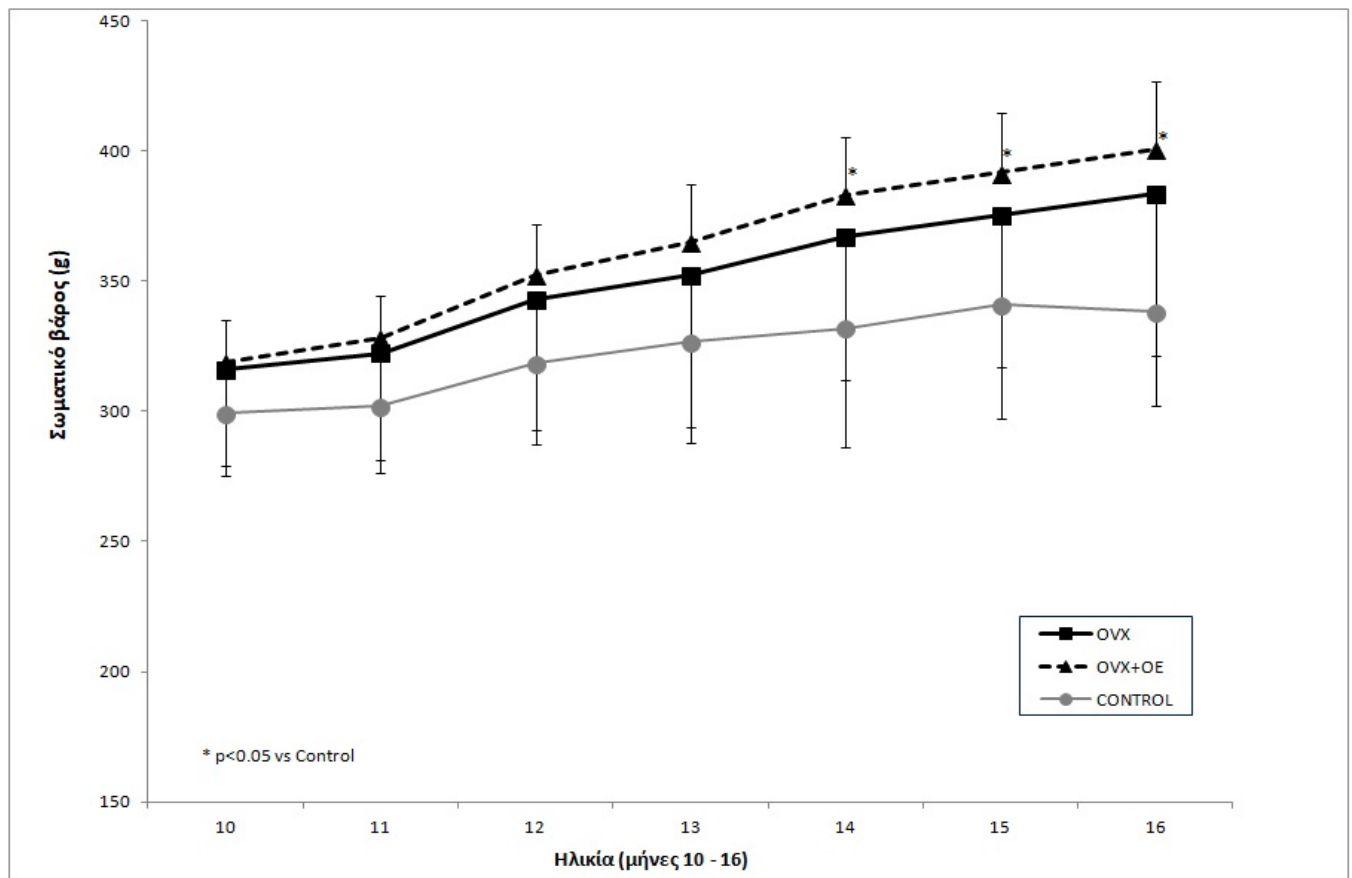
Στους 6 μήνες τα σωματικά βάρη της ομάδας Control με (μέσο όρο±τυπική απόκλιση) (338.4±36.3 g) ήταν σημαντικά μικρότερα από αυτά της ομάδας OVX (383.4±62.2 g) με  $p<0.05$  και από αυτά της ομάδας OVX+E (400.9±25.6 g) με  $p<0.05$ .

Τα σωματικά βάρη ανάμεσα στις ομάδες OVX και OVX+E δε διέφεραν με στατιστικώς σημαντική διαφορά, γεγονός που αναδεικνύει ότι η κατανάλωση εκχυλίσματος ελιάς υπό περιορισμένη δίαιτα (σε φυσιολογικά επίπεδα, σύμφωνα με την κατανάλωση των ζώων της ομάδας Ελέγχου) δεν προκάλεσε παχυσαρκία.

	Control	OVX	OVX+OE	Συνολικό p
Baseline	300.01±24.00	315.90±37.07	319.00±15.68	0.183
Month 1	302.25±25.98	322.20±40.91	328.40±15.86	0.083
Month 2	318.38±30.89	342.80±50.68	352.60±19.43	0.056
Month 3	326.63±38.85	352.10±58.91	365.10±22.43	0.084
Month 4	332.00±46.73	367.10±55.55	383.10±21.89*	<b>0.045</b>
Month 5	341.00±44.61	375.20±58.07	391.80±23.07*	<b>0.039</b>
Τελική μέτρηση	338.38±36.32	383.40±62.21	400.90±25.60*	<b>0.004</b>

Πίνακας 7. Διαχρονική εξέλιξη σωματικών βαρών ανά ομάδα και σύγκριση μεταξύ των ομάδων.

\* $p<0.05$  vs Control, OVX vs OVX+OE: Όλα τα  $p>0.05$ .



Γράφημα 5. Σωματικά Βάρη κατά τη διάρκεια της μελέτης

### Έλεγχος βάρους οργάνων και ολικού λίπους

Αμέσως μετά την ευθανασία αξιολογήθηκαν η γενική κατάσταση του ζώου και η μακροσκοπική εικόνα των οργάνων, τα οποία ζυγίσθηκαν αμέσως μετά από την αφαίρεσή τους. Στη συνέχεια υπολογίσθηκαν οι λόγοι του βάρους των οργάνων και του ολικού λίπους ως προς το τελικό σωματικό βάρος (%) και αναλύθηκαν στατιστικά και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Οι λόγοι της καρδιάς, του ήπατος και του γαστροκνημίου μυός δεν επέδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες, γεγονός που αναδεικνύει ότι η ωθηκεκτομή ή η χορήγηση του εκχυλίσματος δεν επηρέασε αρνητικά τα όργανα αυτά.

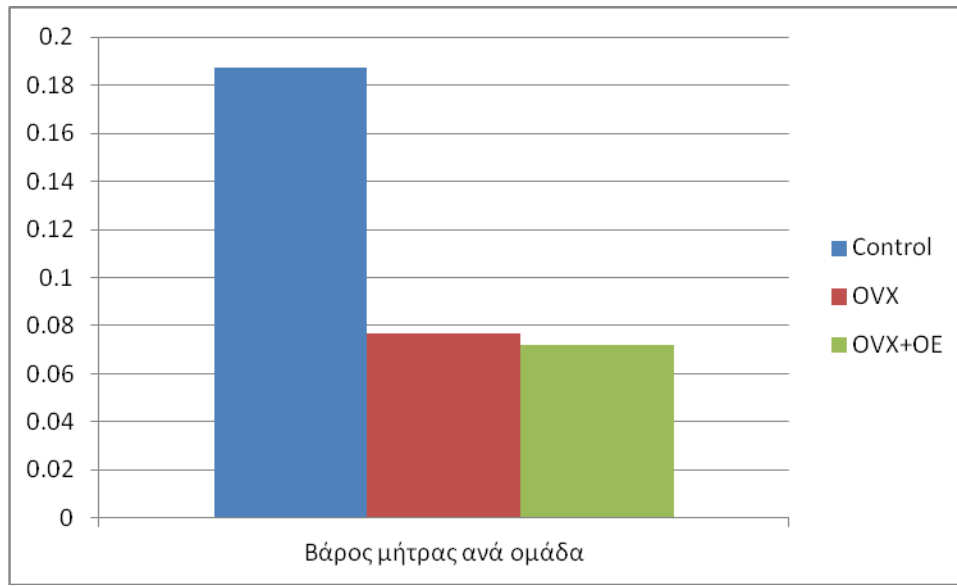
Στατιστικά σημαντικές διαφορές αναδείχθηκαν στα παρακάτω:

- Στη μήτρα ανάμεσα στην ομάδα Control συγκρινόμενη με την ομάδα OVX όπως και με την OVX+E με **p<0.001** και στις δύο περιπτώσεις. Αυτό το γεγονός αποδεικνύει την επιτυχή διεξαγωγή του χειρουργείου της ωθηκεκτομής. Ταυτόχρονα, ανάμεσα στις ομάδες OVX και OVX+E με **p>0.05**, δεν αναδείχθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, γεγονός που υποδεικνύει την απουσία αρνητικής επίδρασης του εκχυλίσματος στη μήτρα (γράφημα 6.).
- Στο ολικό λίπος ανάμεσα στην ομάδα Control συγκρινόμενη με την ομάδα OVX (ισχυρή τάση με **p=0.094**) όπως και με την OVX+E με **p=0.04**, αναμενόμενο σε ζώα που έχουν υποστεί ωθηκεκτομή ακόμα και σε συνθήκες περιορισμού τροφής.
- Στον αριστερό νεφρό ανάμεσα στην ομάδα Control συγκρινόμενη με την ομάδα OVX όπως και με την OVX+E με **p<0.05** και στις δύο περιπτώσεις. Γεγονός που σχετίζεται με το χαμηλότερο σωματικό βάρος της ομάδας ελέγχου, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα παραπάνω.

Όργανο/ Σωματικό βάρος (%)	Control	OVX	OVX+OE	Συνολικό p
<b>Καρδιά</b>	0.281±0.025	0.257±0.042	0.246±0.041	0.182
<b>Νεφρός</b>	0.291±0.016	0.250±0.048*	0.240±0.028*	<b>0.011</b>
<b>Εγκέφαλος</b>	0.562±0.068	0.480±0.091	0.465±0.068*	<b>0.046</b>
<b>Μήτρα</b>	0.187±0.034	0.077±0.047**	0.072±0.070**	<b>&lt;0.005</b>
<b>Ήπαρ</b>	2.682±0.244	2.495±0.374	2.476±0.375	0.403
<b>Γαστροκνήμιος μυς</b>	0.521±0.036	0.437±0.147	0.430±0.098	0.172
<b>Ενδοκοιλιακό λίπος</b>	7.737±0.556	9.038±2.370	9.303±0.941	0.094
<b>Ενδοκοιλιακό λίπος / Γαστροκνήμιος μυς</b>	14.960±2.004	20.655±5.397*	23.065±7.379*	<b>0.003</b>

Πίνακας 8. Λόγοι οργάνων και του ενδοκοιλιακού λίπους προς τελικό σωματικό βάρος και σύγκριση ανάμεσα στις ομάδες. \*p<0.05 vs Control, \*\*p<0.005 vs Control, OVX vs OVX+OE: Όλα τα p>0.05.





**Γράφημα 6.** Λόγοι της μήτρας προς τελικό σωματικό βάρος και σύγκριση ανάμεσα στις ομάδες. Control vs OVX και Control vs OVX+OE:  $p < 0.005$ , ενώ OVX vs OVX+OE:  $p > 0.05$ .

**Αποτελέσματα Βιοχημικών Εξετάσεων**

Η στατιστική ανάλυση δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις ομάδες, γεγονός που καταδεικνύει και σε αυτό το επίπεδο των βιοχημικών παραμέτρων στο αίμα ότι η χορήγηση του συγκεκριμένου εκχυλίσματος επιτραπέζιας ελιάς δεν επηρέασε αρνητικά τον οργανισμό των επιμύων. Όμως παρατηρήθηκε ότι υπάρχει κάποια ένδειξη για διαφορά για το δείκτη αλκαλική τρανσαμινάση (ALT) ανάμεσα στην Control ομάδα και στις ομάδες OVX ( $p=0.174$ ) και OVX+OE ( $p=0.159$ ) και για το δείκτη του ασβεστίου (Ca) ανάμεσα στην OVX+OE ομάδα και στις ομάδες Control ( $p=0.146$ ) και OVX ( $p=0.120$ ).

	Control	OVX	OVX+OE	Συνολικό p
ALT (u/l)	40.91±11.69	54.94±19.32	60.41±28.34	0.083
GGT (u/l)	1.07±0.51	0.99±1.00	1.89±1.68	0.444
Ολική Χοληστερόλη (mg/dl)	101.81±21.49	108.64±10.42	114.35±35.06	0.624
HDL (mg/dl)	64.48±13.75	69.36±6.84	67.91±19.97	0.776
LDL (mg/dl)	9.68±3.57	9.20±2.02	10.49±3.11	0.614
Ασβέστιο (mg/dl)	9.56±1.04	9.54±1.58	7.87±2.23	0.065
Φώσφορος (mg/dl)	6.32±2.81	6.09±2.59	6.54±2.14	0.923

**Πίνακας 9. Βιοχημικοί δείκτες από την ανάλυση του πλάσματος.**

## Συζήτηση

Στη σύγχρονη εποχή υπάρχουν διαθέσιμες πολλές επιλογές σχετικά με τη θεραπεία και την πρόληψη της οστεοπόρωσης. Οι φαρμακευτικές θεραπείες είναι πολύ αποτελεσματικές, επιτυγχάνοντας την αύξηση της οστικής πυκνότητας των ασθενών γεγονός το οποίο έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του πιθανού κινδύνου πρόκλησης κατάγματος. Όμως ορισμένες από αυτές τις θεραπείες, όπως η ορμονική θεραπεία υποκατάστασης (ΟΘΥ), σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, θεωρείται ότι είναι πιθανό να προκαλέσουν αύξηση του κινδύνου θρομβοεμβολής, μυοσκελετικούς πόνους όπως και καρκίνο του μαστού και του ενδομητρίου κατά τη χρονία χορήγησή τους <sup>43</sup>. Άλλες θεραπείες, όπως ορισμένα διφωσφονικά που χορηγούνται από το στόμα, συχνά παρουσιάζουν παρενέργειες όπως γαστρεντερικές επιπτώσεις και ως συνέπεια χαμηλά ποσοστά συμμόρφωσης με τις απαιτήσεις της θεραπείας <sup>119,120</sup>.

Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι ερευνητές και οι ασθενείς να στραφούν στην έρευνα εναλλακτικών, φυσικών μεθόδων με σκοπό να αντιμετωπίσουν τις επιπτώσεις, ως προς τα οστά, από την έλλειψη οιστρογόνων, όπως επίσης και τις παρενέργειες από κάποιες από τις φαρμακευτικές θεραπείες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα από αυτές τις μεθόδους είναι η χρησιμοποίηση ουσιών όπως τα φυτοοιστρογόνα, στην κατηγορία των οποίων ανήκουν πολλά φαινολικά και πολυφαινολικά παράγωγα με αντιοξειδωτική δράση (παραδείγματα αποτελούν η ολευροπεΐνη, η τυροσόλη και η υδρόξυ-τυροσόλη). Η ευεργετική δράση αυτών των φυτοοιστρογόνων έχει ήδη αποδειχθεί με μεθόδους *in vitro* και *in vivo*, η ολευροπεΐνη έχει δείξει προστατευτική δράση στην επαγόμενη από φλεγμονή οστεοπόρωση *in vivo* <sup>109</sup>, ενώ η τυροσόλη και η υδρόξυ-τυροσόλη έχουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση <sup>110,107</sup>. Το εκχύλισμα επιτραπέζιας ελιάς (OE-olive extract) που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη είναι πλούσιο στις ουσίες, γι' αυτό το λόγο θελήσαμε να ελέγξουμε την αποτελεσματικότητά τους στην προστασία και από την αναμενόμενη οστική απορρόφηση και απώλεια οστικής πυκνότητας του επίμοιους, ως μοντέλου της οστεοπόρωσης. Έτσι όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, η χορήγηση του εκχυλίσματος ξεκίνησε αμέσως μετά την ωθηκεκτομή <sup>101,121,122,123</sup>.

Στο ξεκίνημα της μελέτης τα ζώα διανεμήθηκαν σε ομάδες με βασικό κριτήριο το μέσο όρο του σωματικού τους βάρους, ώστε οι ομάδες να μην έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Παρόλα αυτά, η απόλυτη τιμή της οστικής πυκνότητας της ολικής κνήμης της ομάδας των Control ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη σε σχέση με τις άλλες δύο ομάδες (baseline μέτρηση). Γι' αυτό το λόγο, αποφασίσαμε ότι η ανάλυση του ποσοστού μεταβολής από την αρχική μέτρηση ήταν απαραίτητη, ώστε να δείξουμε αντικειμενικά τις διαφορές που προέκυψαν μέσα στην κάθε ομάδα όπως και μεταξύ των ομάδων στις διαφορετικές χρονικές περιόδους. Η "συμπεριφορά" της οστικής πυκνότητας των δύο ομάδων που υπέστησαν ωθηκεκτομή (OVX και OVX+OE) ανέδειξε και την επιτυχία του χειρουργείου της ωθηκεκτομής. Η ολική και η εγγύς οστική πυκνότητα και των δύο αυτών ομάδων κατά την αρχική μέτρηση, ήταν παρόμοιες με αυτή της ομάδας των Control. Κατά τη διάρκεια της μελέτης, όπως και αναμενόταν, οι τιμές αυτές των ομάδων που υποβλήθηκαν σε ωθηκεκτομή υπέστησαν μείωση, γεγονός που σχετίζεται με την απώλεια των οιστρογόνων, των οποίων βασική δράση αποτελεί η προστασία του οστού. Η επιτυχία του χειρουργείου της ωθηκεκτομής επιβεβαιώθηκε επίσης και κατά τη διάρκεια της ευθανασίας και της νεκροσκοπικής εξέτασης των ζώων των αντίστοιχων ομάδων (OVX και OVX+OE), όπου παρατηρήθηκε, επιβεβαιώθηκε και καταγράφηκε η αναμενόμενη ατροφία στον ιστό και στα αγγεία της μήτρας, όπως και η μη-παρουσία ιστού ωθηκών.

Όπως αναμενόταν στο χρονικό σημείο ελέγχου των τριών μηνών μετά από την ωθηκεκτομή (που όπως αναφέρθηκε συμπίπτει με την έναρξη της κατανάλωσης του εκχυλίσματος), η ομάδα ωθηκεκτομής (OVX) έδειξε μεγαλύτερη ποσοστιαία μείωση στην οστική πυκνότητα στην εγγύς περιοχή ( $-18.42 \pm 3.05\%$ ) της κνήμης από ό,τι στην ολική κνήμη ( $-8.87 \pm 3.80\%$ ). Αυτό το εύρημα είναι αποτέλεσμα των λιγότερο άμεσων αλλαγών που λαμβάνουν χώρα στην ολική κνήμη, οστό το οποίο περιλαμβάνει την διάφυση που είναι πλούσιο σε φλοιώδη ουσία<sup>69</sup>. Αντίθετα η εγγύς κνήμη αποτελείται κυρίως από σπογγώδη ουσία.

Στο ίδιο χρονικό σημείο η ποσοστιαία μεταβολή της οστικής πυκνότητας της ολικής κνήμης της ομάδας που έλαβε το εκχύλισμα (OVX+OE) ήταν  $-3.35 \pm 2.36\%$ , δηλαδή μεγαλύτερη

από αυτή της αντίστοιχης μεταβολής που εμφανίστηκε στην ομάδα που υπέστη ωθηκεκτομή (OVX:  $-8.87 \pm 3.80\%$ ). Στο χρονικό σημείο των έξι μηνών, η ομάδα OVX+OE παρουσίασε ποσοστιαία μεταβολή  $-3.68 \pm 3.56\%$ , σχεδόν παρόμοια με την ποσοστιαία μεταβολή στους τρεις μήνες, γεγονός που υποδηλώνει σημαντικά περιορισμένο ρυθμό οστικής απώλειας σε σχέση με αυτήν της ομάδας OVX ( $-13.03 \pm 5.11\%$ ). Όλοι οι συντελεστές βεβαιότητας (p) στις ανωτέρω συγκρίσεις είναι μικρότεροι του 0.05%, αναδεικνύοντας τις διαφορές αυτές ως στατιστικά σημαντικές.

Παρόμοια ευρήματα, τα οποία επίσης υπογραμμίζουν την προστατευτική δράση του εκχυλίσματος της επιτραπέζιας ελιάς εμφανίστηκαν στην ποσοστιαία μεταβολή της οστικής πυκνότητας της εγγύος κνήμης. Πιο συγκεκριμένα στους τρεις μήνες η οστική πυκνότητα της ομάδας OVX+OE μειώθηκε κατά  $-9.27 \pm 3.85\%$ , ενώ η οστική πυκνότητα της ομάδας OVX εμφάνισε πολύ μεγαλύτερη μείωση κατά  $-18.42 \pm 3.05\%$ . Στους 6 μήνες η οστική πυκνότητα της ομάδας OVX+OE μειώθηκε κατά  $-12.95 \pm 4.49\%$  ενώ η οστική πυκνότητα της ομάδας OVX εμφάνισε ακόμη μεγαλύτερη μείωση κατά  $-27.86 \pm 3.69\%$ . Όλοι οι συντελεστές βεβαιότητας στις ανωτέρω συγκρίσεις είναι μικρότεροι του 0.005%, αναδεικνύοντας τις διαφορές αυτές ως στατιστικά σημαντικές.

Προηγούμενες μελέτες που διενεργήθηκαν επίσης μέσω της δια του στόματος χορήγησης φυτοοιστρογονικών ουσιών όπως τα εκχυλίσματα των *Amphimas pterocarpoïdes*, *Sideritis euboëa* και από τις πολυ-φαινόλες κόκκινου κρασιού απεικονίζουν παρόμοια προστατευτική δράση ως προς το οστό<sup>122,101,121</sup>. Είναι πολύ ενδιαφέρον από τα ευρήματα μας ότι το εκχύλισμα καρπού ελιάς (OE) περιορίζει σημαντικά την απώλεια του οστού, περισσότερο από ότι αυτά τα εκχυλίσματα στο χρονικό σημείο των **6 μηνών**, όπου το ποσοστό μεταβολής της οστικής πυκνότητας της εγγύς κνήμης ήταν  **$-12.95 \pm 4.49\%$** , όταν το εκχύλισμα *Amphimas pterocarpoïdes* εμφάνισε ποσοστό μεταβολής  $-22.41 \pm 5.53\%$ , το εκχύλισμα *Sideritis euboëa*  $-16.57\%$  (σε αυτήν τη μελέτη παρουσιάζονται οι διάμεσοι) και το εκχύλισμα από τις πολυ-φαινόλες κόκκινου κρασιού  $-18.57\% \pm 7.80\%$ . Πρόσφατα δημοσιεύτηκε μία εργασία, κατά την οποία το εκχύλισμα από ρίζες γλυκύρριζας (*Glycyrrhiza glabra* roots) εμφάνισε μόνο

-0.84±7.63% ποσοστό μεταβολής από το αρχικό σημείο μέτρησης, γεγονός που καταδεικνύει περισσότερο δραστικό αποτέλεσμα προστασίας<sup>123</sup>. Η Puel και συνεργάτες περιγράφουν ότι σε μία μελέτη που διήρκεσε 80 ημέρες με έξι μηνών Wistar επίμυες, δηλαδή νεότερους ηλικιακά από τους επίμυες στη δική μας μελέτη, όπου η διατροφή τους ενισχύθηκε με ολευροπεΐνη ή ελαιόλαδο, δεν επέδειξε επιτυχή αποτελέσματα ως προς την πρόληψη της οστικής απώλειας του μηριαίου οστού στα ωθηκεκτομημένα ζώα<sup>109</sup>. Ο Liu και οι συνεργάτες έδειξαν ότι το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο σε έξι μηνών Sprague Dawley επίμυες κατάφερε να επιβραδύνει τη μείωση της οστικής πυκνότητας των ισχιακών σπονδύλων και του αριστερού μηριαίου οστού σε σύγκριση με τα ωθηκεκτομημένα ζώα μετά από τρεις μήνες χορήγησης, το οποίο αποτελεί μικρότερο χρονικό διάστημα από αυτό της δικής μας μελέτης<sup>124</sup>.

Τα αποτελέσματα από τις εμβιομηχανικές δοκιμές ανέδειξαν ότι το Μέγιστο φορτίο (Max Load) της ομάδας ελέγχου (Control) ήταν υψηλότερο (119.32±4.61 N) σε σύγκριση με αυτό της ομάδας OVX (116.38±4.13 N) και με αυτό της ομάδας OVX+OE (116.34±4.13 N), χωρίς καμία από τις συγκρίσεις να εμφανίζει στατιστικά σημαντικές διαφορές. Αυτό το αποτέλεσμα πιθανόν σχετίζεται με το γεγονός ότι στη διάφυση του μηριαίου οστού (το οποίο χρησιμοποιήθηκε για αυτή τη δοκιμή) κυριαρχεί το φλοιώδες οστό και έτσι η θετική επίδραση του εκχυλίσματος του καρπού ελιάς σχετικά με την προστασία οστικής απώλειας εμφανίζεται με πιο αργό ρυθμό από ότι σε οστά όπου κυριαρχεί το σπογγώδες οστό. Σύμφωνα με τους Jee και Yao ύστερα από την ωθηκεκτομή στους επίμυες, οι αλλαγές στο φλοιώδες οστό εμφανίζονται με μεγαλύτερη καθυστέρηση σε σχέση με αυτές του σπογγώδους οστού, στοιχείο το οποίο έρχεται σε συμφωνία με τα ευρήματά μας<sup>69</sup>. Παρόμοια ευρήματα με αυτό παρουσιάζονται από τον Γαλάνη και τους συνεργάτες, όπου το εκχύλισμα *Glycyrrhiza glabra* έδειξε πολύ καλά αποτελέσματα ως προς την οστική πυκνότητα, αλλά δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές σε ό,τι αφορά στην αξιολόγηση των εμβιομηχανικών παραμέτρων<sup>123</sup>. Παρόμοια αποτελέσματα, με επίτευξη υψηλών τιμών οστικής πυκνότητας, δίχως αντίστοιχα αποτελέσματα εμβιομηχανικών παραμέτρων, παρουσιάζονται και σε άλλες μελέτες όπου χρησιμοποιήθηκαν φυτοοιστρογόνα, όπως το Diarylheptanoid από *Curcuma comosa Roxb.*, το *Drynariae rhizoma* και ένας εκλεκτικός τροποποιητής των οιστρογονικών υποδοχέων (SERM) ο CHF 4227.01<sup>125,126,127</sup>. Η Puel και οι συνεργάτες σε δύο (80- και 84-ημερών) μελέτες με έξι

μηνών ωθηκεκτομημένους Wistar επίμυες, οι οποίοι λάμβαναν δίαιτα ενισχυμένη με ολευροπεΐνη ή ελαιόλαδο, δίαιτα ενισχυμένη είτε με τυροσόλη είτε με υδροξυτυροσόλη αντίστοιχα, υπολείμματα ή εκχύλισμα υποπροϊόντων ελαιοτριβείου, περιγράφει ότι δεν εμφανίστηκαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές κατά την αξιολόγηση στις εμβιομηχανικές παραμέτρους των οστών<sup>128</sup>. Από την άλλη πλευρά, μελέτες με εκχυλίσματα φυτοοιστρογόνων όπως το *Amphimas pterocarpoides*, το *Sideritis euboica*, το εκχύλισμα από τις πολυφαινόλες κόκκινου κρασιού και το *Pachyrhizus erosus* εμφάνισαν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα στις εμβιομηχανικές δοκιμές αντοχής του οστού<sup>122,101,121,129</sup>. Αυτό το γεγονός είναι πολύ πιθανό να υποδεικνύει ταχύτερη επίδραση στην αντοχή του οστού αυτών των εκχυλισμάτων σε σχέση με το εκχύλισμα καρπού ελιάς (OE). Τέλος, ο Prodinger και οι συνεργάτες προτείνουν ότι το εύρος της τυπικής απόκλισης στα αποτελέσματα μπορεί να μειωθεί αν προσαρμόζουμε για κάθε οστό ξεχωριστά τον εξοπλισμό των μετρήσεων εμβιομηχανικών δοκιμών, γεγονός που δύναται να αυξήσει την ακρίβεια της μεθόδου σημαντικά<sup>130</sup>.

Η κατανάλωση κατά βούληση (*ad libitum*) του εκχυλίσματος καρπού ελιάς (OE) ήταν σταθερή σύμφωνα με τις μετρήσεις κατά τη διάρκεια των 6 μηνών, και συγκρινόμενη σε κάθε αλλαγή/γέμισμα των φυαλών των ζώων της ομάδας Control, ήταν καθ'όλη τη διάρκεια του πειράματος σε φυσιολογικά επίπεδα για ενήλικες θυληκούς επίμυες<sup>131</sup>. Το σωματικό βάρος της ομάδας OVX+OE στο τέλος της μελέτης ήταν στατιστικά υψηλότερο από αυτό της ομάδας Control ( $p=0.003$ ) και μη στατιστικά υψηλότερο από αυτό της ομάδας OVX ( $p=0.697$ ). Αυτή η αύξηση του σωματικού βάρους μπορεί να σχετίζεται με την ωθηκεκτομή, η οποία φυσιολογικά αναμένεται να προκαλέσει παχυσαρκία. Αυτό το εύρημα έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες όπου χρησιμοποιήθηκαν ωθηκεκτομημένοι επίμυες, όπως το εκχύλισμα *Amphimas pterocarpoides*, το εκχύλισμα *Sideritis euboica* και το εκχύλισμα από τις πολυφαινόλες κόκκινου κρασιού<sup>122,101,121</sup>. Στη δική μας περίπτωση του εκχυλίσματος OE θεωρείται πολύ πιθανό η αύξηση του βάρους των ζώων να ενισχύθηκε και από την αυξημένη θερμιδική σύσταση του καρπού ελιάς. Κατά αντιστοιχία με τα ευρήματα σχετικά με το σωματικό βάρος των ζώων, ο λόγος λίπους προς γαστροκνήμιο μυ, εξαιτίας της επίδρασης της ωθηκεκτομής, ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερος στην ομάδα OVX+OE σε σύγκριση με την ομάδα των Control, άλλο όχι στατιστικά σημαντικά υψηλότερος από την ομάδα OVX ( $p=0.688$ ). Το

συγκεκριμένο εύρημα καταδεικνύει ότι η χορήγηση του υψιθερμιδικού ΟΕ<sup>132,133,134</sup> δεν συνεισέφερε επιπρόσθετα στην ανάπτυξη παχυσαρκίας στους επίμυες, οι οποίοι ελάμβαναν συγκεκριμένη ποσότητα τροφής καθημερινά καθ'όλη τη διάρκεια της μελέτης μας, σύμφωνα με την κατανάλωση των ζώων της ομάδας Control.

Σε ό,τι αφορά στα βάρη των οργάνων, ο λόγος μήτρας/σωματικό βάρος ήταν στατιστικά σημαντικά μειωμένος στις ομάδες ωθηκεκτομής (OVX+OE και OVX), όπως ήταν αναμενόμενο επακόλουθο της επέμβασης της ωθηκεκτομής. Ενώ, ανάμεσα στις ομάδες OVX και OVX+E, δεν αναδείχθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, γεγονός που υποδεικνύει την απουσία αρνητικής επίδρασης του εκχυλίσματος στη μήτρα (όπως υπερτροφία ή άλλες αρνητικές επιδράσεις που σχετίζονται με οιστρογονική δράση). Ο λόγος του νεφρού και του εγκεφάλου ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερος στις ομάδες OVX+OE και OVX συγκρινόμενες με την ομάδα Control, χωρίς όμως να ανιχνεύσουμε στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες OVX+OE ( $p=0.011$ ) και OVX ( $p=0.799$ ). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι απόλυτες τιμές των οργάνων (νεφροί, καρδιά, γαστροκνήμιος μυς, εγκέφαλος και ήπαρ) δεν ανέδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες. Έτσι, η στατιστικά σημαντική αύξηση στο λόγο του νεφρού και του εγκεφάλου μπορεί να ερμηνευτεί ως αποτέλεσμα των στατιστικά σημαντικών διαφορών ως προς το βάρος, ανάμεσα στις ομάδες ωθηκεκτομής σε σύγκριση με την ομάδα των Control. Όλοι οι υπόλοιποι λόγοι των οργάνων ως προς το βάρος εμφάνισαν παρόμοιες τιμές ανάμεσα στις ομάδες, χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές. Αυτά τα αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των μελετών όπως αυτής της Πατσάκη και συνεργατών και της ομάδας Min Cheng, όπου η χορήγηση ενός φυτοοιστρογονικού εκχυλίσματος δεν ανέδειξε αρνητική επίδραση στα συγκεκριμένα όργανα<sup>122,135</sup>. Από τις παραμέτρους του αίματος που ελέγχθηκαν, αξίζει να σημειωθεί ότι το λιπιδικό προφίλ των OVX επιμύων, μετά από έξι μήνες χορήγησης ΟΕ, δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντικές διαφορές κατά τη σύγκριση με τις άλλες ομάδες, γεγονός που υποδεικνύει ουδέτερη επίδραση. Επιπρόσθετα, η φυσιολογική εμφάνιση του ήπατος, κατά τη μακροσκοπική εξέταση, κατά τη διάρκεια της νεκροτομής, σε συνδυασμό με την έλλειψη στατιστικά σημαντικών διαφορών των ηπατικών βιοχημικών παραμέτρων του αίματος ανάμεσα στις ομάδες, υποδεικνύει την ουδέτερη δράση του εκχυλίσματος ως προς το ηπατικό



σύστημα. Αυτή η παρατήρηση είναι πιθανό να είναι εφικτό να επιβεβαιωθεί και ιστολογικά σε επόμενες μελέτες.

## Περιορισμοί

Παρόλο που η τοποθέτηση των επιμύων στις ομάδες κατά την έναρξη της μελέτης βασίστηκε στο στόχο να έχουν όλες οι ομάδες παρόμοιο μέσο όρο σωματικών βαρών, η αρχική μέτρηση της οστικής πυκνότητας BMD εμφάνισε στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες. Αυτό το εμπόδιο ξεπεράστηκε με την απόφαση να μελετήσουμε και το ποσοστό μεταβολής της οστικής πυκνότητας της κάθε ομάδας ως προς την αρχική μέτρηση.

Η μελέτη μας είχε σχεδιαστεί ώστε να διαρκέσει έξι μήνες, σύμφωνα με το μοντέλο του ωθηκεκτομημένου επίμυος που ακολουθείται σε πολλές περιπτώσεις κατά τη βιβλιογραφία. Ύστερα από την εμπειρία μας σχετικά με τη σχεδόν σταθεροποίηση της οστικής πυκνότητας κατά τον έκτο μήνα της ομάδας OVX+OE, προτείνεται σε επόμενες μελέτες, οι οποίες ακολουθούν το ίδιο μοντέλο, να προσθέσουν ένα επιπρόσθετο χρονικό σημείο ελέγχου, για παράδειγμα στους εννέα μήνες, το οποίο είναι πολύ πιθανό να φανεί χρήσιμο ώστε να αξιολογηθεί με περισσότερη ασφάλεια εάν το εκχύλισμα συνεχίζει να διατηρεί τη θετική προστατευτική του επίδραση σχετικά με την απώλεια του οστού, όπως επίσης την περίπτωση να δείχνει τη θετική επίδραση ως προς την αντοχή του οστού (εμβιομηχανικές δοκιμές) σε επόμενο στάδιο από αυτό των έξι μηνών.

Επιπρόσθετα, προτείνεται στις μελλοντικές εργασίες σχετικά με το συγκεκριμένο εκχύλισμα, να περιλαμβάνονται περισσότερες ομάδες με διαφορετικές δόσεις, με σκοπό την υπόδειξη μέγιστης και ελάχιστης αποτελεσματικής και ασφαλούς δόσης χορήγησης. Τέλος, θα θέλαμε να αναγνωρίσουμε ότι περισσότερες παράμετροι όπως οι οστικοί βιοδείκτες και η οστική ιστομορφομετρία, αν ήταν εφικτό να χρησιμοποιηθούν, θα είχαν προσδώσει περισσότερες πληροφορίες σχετικά με την αποτελεσματικότητα και το μηχανισμό δράσης του εκχυλίσματος.

## Συμπεράσματα

Η μελέτη αυτή αναδεικνύει ότι η κατανάλωση του ΟΕ παρέχει προστασία από την μετεμμηνοπαυσιακή απώλεια της οστικής πυκνότητας, χωρίς να προκαλεί αρνητική επίδραση στις παραμέτρους του αίματος που εξετάστηκαν ή ως προς τη μήτρα. Η κατανάλωση αυτού του εκχυλίσματος, ως ασφαλές συμπλήρωμα μίας ισορροπημένης διατροφής θα μπορούσε να ενισχύσει την πρόληψη της εγκατάστασης της οστεοπόρωσης, ενώ ταυτόχρονη προσοχή απαιτείται σχετικά με τη συνολική ημερήσια θερμιδική πρόσληψη. Περισσότερες μελέτες, οι οποίες εξετάζουν την επίδραση αυτού του εκχυλίσματος ως θεραπεία της ήδη εγκατεστημένης οστικής απώλειας, κρίνονται ως χρήσιμες.

## Περίληψη

Σύγχρονες προσπάθειες για εναλλακτικές μη φαρμακευτικές θεραπείες για τη μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση επικεντρώνονται στα διατροφικά μέτρα. Ο σκοπός αυτής μελέτης ήταν να αξιολογήσει την επίδραση της δια του στόματος χορήγησης του εκχυλίσματος καρπού ελιάς (OE) στην οστική πυκνότητα και την εμβιομηχανική αντοχή του οστού στο πειραματικό μοντέλο του ωθηκεκτομημένου επίμυος. Τριάντα ώριμοι επίμυες Wistar ηλικίας 10 μηνών χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες των δέκα ζώων: Control, OVX (ωθηκεκτομημένοι) και OVX+OE (ωθηκεκτομημένοι+OE). Η οστική πυκνότητα μετρήθηκε πριν την ωθηκεκτομή, στους τρεις και στους έξι μήνες μετά την ωθηκεκτομή. Στο τέλος της μελέτης συλλέχθηκαν αίμα, τα δύο μηριαία, οι δύο κνήμες, εσωτερικά όργανα και το ενδοκοιλιακό λίπος. Μετά το πρώτο τρίμηνο τα ποσοστά μεταβολής της οστικής πυκνότητας από την αρχική μέτρηση της ολικής και της εγγύος κνήμης της ομάδας OVX+OE ήταν και τα δύο υψηλότερα συγκρινόμενα με αυτά της ομάδα OVX ( $p < 0.005$ ). Οι εμβιομηχανικές δοκιμές των μηριαίων οστών δεν ανέδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες. Τα σωματικά βάρη κατά τη διάρκεια της μελέτης, ο λόγος του ενδοκοιλιακού λίπους ως προς το τελικό σωματικό βάρος, τα αποτελέσματα των αιματολογικών παραμέτρων (ALT,  $\gamma$ -GT, ολική χοληστερόλη, HDL-χοληστερόλη, LDL-χοληστερόλη, ασβέστιο και φώσφορο) ήταν μέσα στα φυσιολογικά όρια και δεν ανέδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες. Συμπερασματικά, η χορήγηση του OE για έξι μήνες προστάτευσε την απώλεια οστικής πυκνότητας της κνήμης σε σύγκριση με την ομάδα OVX που δεν έλαβε το εκχύλισμα, χωρίς να προκαλέσει ανεπιθύμητες ενέργειες.

Λέξεις-κλειδιά: επίμυος / οστεοπόρωση / ωθηκεκτομή / οστική πυκνότητα / κάμψη τριών σημείων

## Abstract

Recent efforts for alternative non-pharmaceutical treatments for postmenopausal osteoporosis are focused on nutritional measures. The aim of this study was to investigate the effect of table olive wastewater extract (OE) administration on bone mineral density (BMD) and biomechanical strength in ovariectomized rats. Thirty mature 10-month-old female Wistar rats were separated into 3 groups of ten; Control, Ovariectomized (OVX) and OVX+OE. BMD was measured before ovariectomy, 3 and 6 months afterwards. At the end of the study, blood, both femurs, internal organs and abdominal fat were collected. After the first trimester, the percentage changes from baseline of the total and proximal tibial BMD of the OVX+OE group were both higher compared to the OVX group ( $p < 0.005$ ). Similar results were found after the first semester, when the percentage changes from baseline of the total and proximal tibial BMD of the OVX+OE group were both higher compared to the OVX group ( $p < 0.005$ ). Biomechanical testing of the femurs did not reveal any statistically significant difference between the groups. Body weights throughout the study, abdominal fat ratios to final body weight, blood results (alanine aminotransferase; ALT, Gamma-glutamyltransferase;  $\gamma$ -GT, total cholesterol, high-density lipoprotein; HDL-cholesterol, low-density lipoprotein; LDL-cholesterol, calcium, phosphorus) were within normal limits and did not show any significant difference between the treated and untreated groups. As a conclusion, the administration of table olive wastewater extract for 6 months protected tibial BMD loss in comparison to the untreated OVX group without causing adverse effects.

Key words: rat, osteoporosis, ovariectomy, bone mineral density, olive extract

## Παραπομπές

BMD- Bone Mineral Density

OVX-Ovariectomy; Ωθηκεκτομή

OE-εκχύλισμα επιτραπέζιας ελιάς

## Βιβλιογραφία

1. World Health Organization. Who Scientific Group on the Assessment of Osteoporosis At Primary Health. *World Health*. 2007;May(May 2004):1-13. doi:10.1016/S0140-6736(02)08761-5
2. NHS. NHS Osteoporosis. 2019. <https://www.nhs.uk/conditions/osteoporosis/>.
3. IOF International osteoporosis. <https://www.iofbonehealth.org/what-is-osteoporosis>.
4. HADJIDAKIS DJ, ANDROULAKIS II. Bone Remodeling. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1092(1):385-396. doi:10.1196/annals.1365.035
5. Τροποποιημένη εικόνα οστίτη ιστού. <https://www.slideshare.net/georgearlapanos/ss-55292544>. <https://www.slideshare.net/georgearlapanos/ss-55292544>.
6. Διατριβη Δ. Τροποποιημένη φωτογραφία από τμηματοποίηση , Ευθυγράμμιση και Αυτόματη Ταξινόμηση Ιατρικών Δεδομένων Μίκρο - Τομογραφίας Σπογγώδους Οστού Ταξινόμηση Ιατρικών Δεδομένων Μίκρο - Τομογραφίας. 2016. <http://artemis.cslab.ece.ntua.gr:8080/jspui/bitstream/123456789/9072/1/PD2017-0004.pdf>.
7. Τροποποιημένη εικόνα σπογγώδους οστού. <https://training.seer.cancer.gov/anatomy/skeletal/tissue.html>.
8. Τροποποιημένη εικόνα συστήματος Harvers από την παρουσίαση της Lonna Nicole. <https://www.slideserve.com/lonna/haversian-system>.
9. Keen GC and RW. *Osteoporosis (Oxford Rheumatology Library) (2 Ed.) Oxford University Press.*; 2014.
10. Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling \*. 2010;285(33):25103-25108. doi:10.1074/jbc.R109.041087

11. Sims NA, Martin TJ. Coupling the activities of bone formation and resorption : a multitude of signals within the basic multicellular unit. 2014;481(January):1-10. doi:10.1038/bonekey.2013.215
12. Gallagher, J. Christopher, Tella SH. Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014;142(1):155-170. doi:10.1016/j.jsbmb.2013.09.008
13. Baldock PA, Thomas GP, Hodge JM, et al. Vitamin D action and regulation of bone remodeling: Suppression of osteoclastogenesis by the mature osteoblast. *J Bone Miner Res.* 2006;21(10):1618-1626. doi:10.1359/jbmr.060714
14. Fleet JC. The role of vitamin D in the endocrinology controlling calcium homeostasis. *Mol Cell Endocrinol.* 2017;453(3):36-45. doi:10.1016/j.mce.2017.04.008
15. Manolagas SC. Birth and Death of Bone Cells : Basic Regulatory. *Endocr Rev.* 2000;21(2):115-137.
16. Neyro Bilbao JL, Cano Sánchez A PG-AS. Bone metabolism regulation through RANK-RANKL-OPG system. *Rev Osteoporos Metab Miner.* 2011;3(2):105-112.
17. Kohli SS, Kohli VS. Role of RANKL-RANK/osteoprotegerin molecular complex in bone remodeling and its immunopathologic implications. *Indian J Endocrinol Metab.* 2011;15(3):175-181. doi:10.4103/2230-8210.83401
18. EEMMO. No Title. [http://www.eemmo.gr/PLHROFORIES\\_GIA\\_ASTHENEIS/4.php](http://www.eemmo.gr/PLHROFORIES_GIA_ASTHENEIS/4.php). Accessed August 8, 2019.
19. Foundation NO, Barlow, Wren, and Wren BG. *Menopause.* 2nd ed. Oxford: Health Press; 2005.
20. Bono CM, Einhorn TA. Overview of osteoporosis: Pathophysiology and determinants of bone strength. *Eur Spine J.* 2003;12(SUPPL. 2):90-96. doi:10.1007/s00586-003-0603-2
21. Demontiero O, Vidal C, Duque G. Aging and bone loss: New insights for the clinician. *Ther*



- Adv Musculoskelet Dis.* 2012;4(2):61-76. doi:10.1177/1759720X11430858
22. Beral V, Bull D, Doll R, Key T, Peto R, Reeves G. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. *Lancet.* 1997;350:1047-1059.
  23. Society MM. the Use of Estrogens and Progestins and the Risk of Breast Cancer in. 1995;332(24).
  24. Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, et al. Postmenopausal Estrogen Therapy and Cardiovascular Disease. *N Engl J Med.* 1991;325(11):756-762. doi:10.1056/NEJM199109123251102
  25. Stampfer MJ, Willett WC, Colditz GA, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH. A Prospective Study of Postmenopausal Estrogen Therapy and Coronary Heart Disease. *N Engl J Med.* 1985;313(17):1044-1049. doi:10.1056/NEJM198510243131703
  26. Grady D, Herrington D, Bittner V, et al. Cardiovascular Disease Outcomes During 6.8 Years of Hormone TherapyHeart and Estrogen/Progestin Replacement Study Follow-up (HERS II). *JAMA.* 2002;288(1):49-57. doi:10.1001/jama.288.1.49
  27. Hulley S, Furberg C, Barrett-Connor E, et al. Noncardiovascular Disease Outcomes During 6.8 Years of Hormone TherapyHeart and Estrogen/Progestin Replacement Study Follow-up (HERS II). *JAMA.* 2002;288(1):58-64. doi:10.1001/jama.288.1.58
  28. Hulley S, Grady D, Bush T, et al. Randomized Trial of Estrogen Plus Progestin for Secondary Prevention of Coronary Heart Disease in Postmenopausal Women. *JAMA.* 1998;280(7):605-613. doi:10.1001/jama.280.7.605
  29. Committee\* TWHIS. Effects of Conjugated Equine Estrogen in Postmenopausal Women With HysterectomyThe Women's Health Initiative Randomized Controlled Trial. *JAMA.* 2004;291(14):1701-1712. doi:10.1001/jama.291.14.1701

30. Investigators WG for the WHI. Risks and Benefits of Estrogen Plus Progestin in Healthy Postmenopausal Women Principal Results From the Women's Health Initiative Randomized Controlled Trial. *JAMA*. 2002;288(3):321-333. doi:10.1001/jama.288.3.321
31. Wren BG. The benefits of oestrogen following menopause: Why hormone replacement therapy should be offered to postmenopausal women. *Med J Aust*. 2009;190(6):321-325.
32. Compston J, Genant H. Epidemiology and diagnosis of postmenopausal osteoporosis. In: Rizzoli R, ed. *Atlas of Postmenopausal Osteoporosis*. Tarporley: Springer Healthcare Ltd.; 2010:33-60. doi:10.1007/978-1-907673-28-3\_2
33. De Laet CE, Pols HA. Fractures in the elderly: epidemiology and demography. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2000;14(2):171-179. doi:10.1053/beem.2000.0067
34. Cosman F, Krege JH, Looker AC, et al. Spine fracture prevalence in a nationally representative sample of US women and men aged ≥40 years: results from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2013-2014. *Osteoporos Int a J Establ as result Coop between Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA*. 2017;28(6):1857-1866. doi:10.1007/s00198-017-3948-9
35. O'Neill TW, Felsenberg D, Varlow J, Cooper C, Kanis JA, Silman AJ. The prevalence of vertebral deformity in european men and women: the European Vertebral Osteoporosis Study. *J bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 1996;11(7):1010-1018. doi:10.1002/jbmr.5650110719
36. Services H. Bone Health and Osteoporosis A Report of the Surgeon General.
37. International Society for Clinical Densitometry (ISCD). 2010 Official Positions of the ISCD/IOF on the Interpretation and Use of FRAX in Clinical Practice. 2010. <http://www.iscd.org/wp-content/uploads/2012/10/Official-Positions-ISCD-IOF-FRAX.pdf>.
38. No Title. <https://americanbonehealth.org/bone-density/understanding-the-bone-density-t-score-and-z-score/>.

39. <https://www.iscd.org/resources/fracture-risk-models/>.
40. Κατευθυντήριες Γραμμές Οστεοπόρωσης Για Τη Διάγνωση Και Αντιμετώπιση Της Στην Ελλάδα. 2018th ed. doi:10.1038
41. Eastell R, Walsh JS, Watts NB, Siris E. Bisphosphonates for postmenopausal osteoporosis. *Bone*. 2011;49(1):82-88. doi:10.1016/j.bone.2011.02.011
42. Eriksen EF, Díez-Pérez A, Boonen S. Update on long-term treatment with bisphosphonates for postmenopausal osteoporosis: A systematic review. *Bone*. 2014;58:126-135. doi:10.1016/j.bone.2013.09.023
43. Cooper C, Reginster J-Y, Cortet B, et al. Long-term treatment of osteoporosis in postmenopausal women: a review from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO) and the International Osteoporosis Foundation (IOF). *Curr Med Res Opin*. 2012;28(3):475-491. doi:10.1185/03007995.2012.663750
44. Gambacciani M. Selective estrogen modulators in menopause. *Minerva Ginecol*. 2013;65(6):621-630.
45. Pinkerton J V., Thomas S. Use of SERMs for treatment in postmenopausal women. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014;142:142-154. doi:10.1016/j.jsbmb.2013.12.011
46. Komm BS, Mirkin S. An overview of current and emerging SERMs. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014;143:207-222. doi:10.1016/j.jsbmb.2014.03.003
47. Duque G, Troen BR. Understanding the Mechanisms of Senile Osteoporosis: New Facts for a Major Geriatric Syndrome. *J Am Geriatr Soc*. 2008;56(5):935-941. doi:10.1111/j.1532-5415.2008.01764.x
48. Sunycz JA. The use of calcium and vitamin D in the management of osteoporosis. *Ther Clin Risk Manag*. 2008;4(4):827-836. doi:10.2147/tcrm.s3552
49. Haas A V., LeBoff MS. Osteoanabolic agents for osteoporosis. *J Endocr Soc*.

- 2018;2(8):922-932. doi:10.1210/JS.2018-00118
50. Bodenner D, Redman C, Riggs A. Teriparatide in the management of osteoporosis. *Clin Interv Aging*. 2007;2(4):499-507. doi:10.2147/cia.s241
51. Stevenson M, Davis S, Lloyd-Jones M, Beverley C. The clinical effectiveness and cost-effectiveness of strontium ranelate for the prevention of osteoporotic fragility fractures in postmenopausal women. *Health Technol Assess (Rockv)*. 2007;11(4):1-80. doi:10.3310/hta11040
52. Lewiecki EM. Safety and tolerability of denosumab for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Drug Healthc Patient Saf*. 2011;79. doi:10.2147/dhps.s7727
53. Nelson HD, Humphrey LL, Nygren P, Teutsch SM, Allan JD. Postmenopausal Hormone Replacement TherapyScientific Review. *JAMA*. 2002;288(7):872-881. doi:10.1001/jama.288.7.872
54. Renoux C, Dell’Aniello S, Garbe E, Suissa S. Transdermal and oral hormone replacement therapy and the risk of stroke: a nested case-control study. *BMJ*. 2010;340(jun03 4):c2519-c2519. doi:10.1136/bmj.c2519
55. Δοντά ΙΑ, Λελόβας ΠΠ. *Πειραματικά Πρότυπα Οστεοπόρωσης*. Ελληνικό Ίδρυμα Οστεοπόρωσης; 2011.
56. Smith SY, Jollette J, Turner CH. Skeletal health: Primate model of postmenopausal osteoporosis. *Am J Primatol*. 2009;71(9):752-765. doi:10.1002/ajp.20715
57. Jerome CP, Peterson PE. Nonhuman primate models in skeletal research. *Bone*. 2001;29(1):1-6. doi:10.1016/S8756-3282(01)00477-X
58. Declaration of the European Parliament on primates in scientific experiments. 2007:1-3.
59. ΟΔΗΓΙΑ 2010/63/ΕΕ ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 22ας Σεπτεμβρίου 2010 περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς. 2010;2010:33-79.

60. Home Office. *Guidance on the Operation of the Animals (Scientific Procedures) Act 1986*; 2014. doi:ISBN 1474100287- 9781474100281
61. Turner AS. The sheep as a model for osteoporosis in humans. *Vet J.* 2002;163(3):232-239. doi:10.1053/tvj.2001.0642
62. Oheim R, Schinke T, Amling M, Pogoda P. Can we induce osteoporosis in animals comparable to the human situation? *Injury.* 2016;47:S3-S9. doi:10.1016/S0020-1383(16)30002-X
63. Egermann M, Goldhahn J, Holz R, Schneider E, Lill CA. A sheep model for fracture treatment in osteoporosis: Benefits of the model versus animal welfare. *Lab Anim.* 2008;42(4):453-464. doi:10.1258/la.2007.007001
64. Reinwald S, Burr D. Review of nonprimate, large animal models for osteoporosis research. *J Bone Miner Res.* 2008;23(9):1353-1368. doi:10.1359/jbmr.080516
65. Kim S-W, Kim K-S, Solis CD, Lee M-S, Hyun B-H. Development of osteoporosis animal model using micropigs. *Lab Anim Res.* 2013;29(3):174. doi:10.5625/lar.2013.29.3.174
66. Permuy M, López-Peña M, Muñoz F, González-Cantalapiedra A. Rabbit as model for osteoporosis research. *J Bone Miner Metab.* 2019;37(4):573-583. doi:10.1007/s00774-019-01007-x
67. Wanderman NR, Mallet C, Giambini H, et al. An ovariectomy-induced rabbit osteoporotic model: A new perspective. *Asian Spine J.* 2018;12(1):12-17. doi:10.4184/asj.2018.12.1.12
68. Galie TL, Lynch ME, Main RP, Van Der Meulen MCH. The ovariectomized mouse as a model for osteoporosis. *Proc 2010 IEEE 36th Annu Northeast Bioeng Conf NEBEC 2010.* 2010. doi:10.1109/NEBC.2010.5458136
69. Jee WS, Yao W. Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2001;1(3):193-207. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15758493>.

70. Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas I a. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med*. 2008;58(5):424-430.  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2707131&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
71. Yousefzadeh N, Kashfi K, Jeddi S, et al. Review article : ovariectomised rat model of osteoporosis. *EXCLI J*. 2020;19:89-107.
72. <https://www.fda.gov/>.
73. Borrelli J. Taking control: The osteoporosis epidemic. *Injury*. 2012;43(8):1235-1236.  
doi:10.1016/j.injury.2012.06.001
74. Johnell O, Kanis JA. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporos Int*. 2006;17(12):1726-1733.  
doi:10.1007/s00198-006-0172-4
75. Klotzbuecher CM, Ross PD, Landsman PB, Abbott TA, Berger M. Patients with Prior Fractures Have an Increased Risk of Future Fractures: A Summary of the Literature and Statistical Synthesis. *J Bone Miner Res*. 2010;15(4):721-739.  
doi:10.1359/jbmr.2000.15.4.721
76. Abbott TA, Miller PD, Berger ML, et al. Bone Mineral Density Thresholds for Pharmacological Intervention to Prevent Fractures. *Arch Intern Med*. 2004;164(10):1108.  
doi:10.1001/archinte.164.10.1108
77. Kanis JA, Johnell O, Oden A, et al. Smoking and fracture risk: A meta-analysis. *Osteoporos Int*. 2005;16(2):155-162. doi:10.1007/s00198-004-1640-3
78. Felson DT, Kiel DP, Anderson JJ, Kannel WB. Alcohol consumption and hip fractures: the Framingham Study. *Am J Epidemiol*. 1988;128(5):1102-1110.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3189283>.
79. Reid IR. Glucocorticoid osteoporosis--mechanisms and management. *Eur J Endocrinol*.

- 1997;137:209-217. doi:10.1530/eje.0.1370209
80. Feskanich D, Willett W, Colditz G. Walking and leisure-time activity and risk of hip fracture in postmenopausal women. *JAMA*. 2002;288(18):2300-2306. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.288.18.2300>.
81. Howe TE, Shea B, Dawson LJ, et al. Exercise for preventing and treating osteoporosis in postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011;(7). doi:10.1002/14651858.CD000333.pub2
82. Shatrugna V, Kulkarni B, Kumar PA, et al. Relationship between women's occupational work and bone health: A study from India. *Br J Nutr*. 2008;99(6):1310-1315. doi:10.1017/S0007114507868504
83. Pike CT, Birnbaum HG, Schiller M, Swallow E, Burge RT, Edgell ET. Prevalence and costs of osteoporotic patients with subsequent non-vertebral fractures in the US. *Osteoporos Int*. 2011;22(10):2611-2621. doi:10.1007/s00198-010-1494-9
84. Solomon DH, Rekedal L, Cadarette SM. Osteoporosis treatments and adverse events. *Curr Opin Rheumatol*. 2009;21(4):363-368. doi:10.1097/BOR.0b013e32832ca433
85. Cosman F. Combination therapy for osteoporosis: a reappraisal. *Bonekey Rep*. 2014;3(December 2013):1-8. doi:10.1038/bonekey.2014.13
86. Lenart BA, Neviasser AS, Lyman S, et al. Association of low-energy femoral fractures with prolonged bisphosphonate use: A case control study. *Osteoporos Int*. 2009;20(8):1353-1362. doi:10.1007/s00198-008-0805-x
87. Tomková S, Telepková D, Vanuga P, et al. Therapeutic adherence to osteoporosis treatment. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2014;52(08):663-668. doi:10.5414/CP202072
88. Kyrgidis A, Vahtsevanos K. Osteonecrosis of the jaw in patients receiving oral bisphosphonates. *Osteoporos Int*. 2010;21(3):535-536. doi:10.1007/s00198-009-1089-5
89. Langdahl BL. Management of endocrine disease: Treatment breaks in long-term

- management of osteoporosis. *Eur J Endocrinol*. January 2019;R29-R35. doi:10.1530/EJE-18-0282
90. Kemmler W, Lauber D, Weineck J, Hensen J, Kalender W, Engelke K. Benefits of 2 years of intense exercise on bone density, physical fitness, and blood lipids in early postmenopausal osteopenic women: Results of the erlangen fitness osteoporosis prevention study (efops). *Arch Intern Med*. 2004;164(10):1084-1091. <http://dx.doi.org/10.1001/archinte.164.10.1084>.
91. Shea B, Wells G, Cranney A, et al. VII. Meta-analysis of calcium supplementation for the prevention of postmenopausal osteoporosis. *Endocr Rev*. 2017;23(2):552-559. doi:10.5588/ijtld.16.0716.Isoniazid
92. Higgs J, Derbyshire E, Styles K. Nutrition and osteoporosis prevention for the orthopaedic surgeon: A wholefoods approach. *EFORT Open Rev*. 2017;2(6):300-308. doi:10.1302/2058-5241.2.160079
93. Kouhnavard M, Nasli Esfahani E, Montazeri M, et al. Effects of vitamin d and calcium supplementation on micro-architectural and densitometric changes of rat femur in a microgravity simulator model. *Iran Red Crescent Med J*. 2014;16(6):5-10. doi:10.5812/ircmj.18026
94. Mustafa RA, Alfky NAA, Hijazi HH, Header EA, Azzeh FS. Biological effect of calcium and Vitamin D dietary supplements against osteoporosis in ovariectomized rats. *Prog Nutr*. 2018;20(1):86-93. doi:10.23751/pn.v20i1.5223
95. Leung PC, Ko ECH, Siu SWS, Pang ESY, Cheng KF, Chan YH. Developing an effective food supplement for the prevention of osteoporosis. *Funct Foods Heal Dis*. 2011;1(9):379-388. doi:10.31989/ffhd.v1i9.120
96. Lappe J, Kunz I, Bendik I, et al. Effect of a combination of genistein, polyunsaturated fatty acids and vitamins D3 and K1 on bone mineral density in postmenopausal women: A randomized, placebo-controlled, double-blind pilot study. *Eur J Nutr*. 2013;52(1):203-



215. doi:10.1007/s00394-012-0304-x
97. Patisaul HB, Jefferson W. The pros and cons of phytoestrogens. *Front Neuroendocrinol.* 2010;31(4):400-419. doi:10.1016/j.yfrne.2010.03.003
98. Kassi E, Papoutsis Z, Fokialakis N, Messari I, Mitakou S, Moutsatsou P. Greek plant extracts exhibit Selective Estrogen Receptor Modulator (SERM)-like properties. *J Agric Food Chem.* 2004;52(23):6956-6961. doi:10.1021/jf0400765
99. Psaltopoulou T, Naska A, Orfanos P, Trichopoulos D, Mountokalakis T, Trichopoulou A. Olive oil, the Mediterranean diet, and arterial blood pressure: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Am J Clin Nutr.* 2004;80(0002-9165 (Print)):1012-1018. doi:80/4/1012 [pii]
100. Hemachandra LPMP, Patel H, Chandrasena REP, et al. SERMs attenuate estrogen-induced malignant transformation of human mammary epithelial cells by upregulating detoxification of oxidative metabolites. *Cancer Prev Res.* 2014;7(5):505-515. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-13-0296
101. Dontas IA, Lelovas PP, Kourkoulis SK, et al. Protective effect of *Sideritis euboica* extract on bone mineral density and strength of ovariectomized rats. *Menopause.* 2011;18(8):915-922. doi:10.1097/gme.0b013e31820ce580
102. Dontas I, Halabalaki M, Moutsatsou P, et al. Protective effect of plant extract from *Onobrychis ebenoides* on ovariectomy-induced bone loss in rats. *Maturitas.* 2006;53(2):234-242. doi:10.1016/j.maturitas.2005.05.007
103. Andreadou I, Iliodromitis EK, Mikros E, et al. The olive constituent oleuropein exhibits anti-ischemic, antioxidative, and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits. *J Nutr.* 2006;136(8):2213-2219.
104. Barbaro B, Toietta G, Maggio R, et al. Effects of the olive-derived polyphenol oleuropein on human health. *Int J Mol Sci.* 2014;15(10):18508-18524. doi:10.3390/ijms151018508

105. Santiago-Mora R, Casado-Díaz A, De Castro MD, Quesada-Gómez JM. Oleuropein enhances osteoblastogenesis and inhibits adipogenesis: The effect on differentiation in stem cells derived from bone marrow. *Osteoporos Int*. 2011;22(2):675-684. doi:10.1007/s00198-010-1270-x
106. Bulotta S, Celano M, Lepore SM, Montalcini T, Pujia A, Russo D. Beneficial effects of the olive oil phenolic components oleuropein and hydroxytyrosol: Focus on protection against cardiovascular and metabolic diseases. *J Transl Med*. 2014;12(1):1-9. doi:10.1186/s12967-014-0219-9
107. Marković AK, Torić J, Barbarić M, Brala CJ. Hydroxytyrosol, tyrosol and derivatives and their potential effects on human health. *Molecules*. 2019;24(10). doi:10.3390/molecules24102001
108. Nouis L, Doulias P-T, Aligiannis N, et al. DNA protecting and genotoxic effects of olive oil related components in cells exposed to hydrogen peroxide. *Free Radic Res*. 2005;39(7):787-795. doi:10.1080/10715760500045806
109. Puel C, Quintin A, Agalias A, et al. Olive oil and its main phenolic micronutrient (oleuropein) prevent inflammation-induced bone loss in the ovariectomised rat. *Br J Nutr*. 2004;92(1):119-127. doi:10.1079/bjn20041181
110. Chin KY, Ima-Nirwana S. Olives and bone: A green osteoporosis prevention option. *Int J Environ Res Public Health*. 2016;13(8):1-11. doi:10.3390/ijerph13080755
111. Smith AJ, Clutton RE, Lilley E, Hansen KEA, Brattelid T. PREPARE: guidelines for planning animal research and testing. *Lab Anim*. 2018;52(2):135-141. doi:10.1177/0023677217724823
112. Kilkeny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving Bioscience Research Reporting : The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *PLoS Biol*. 2010;8(6):6-10. doi:10.1371/journal.pbio.1000412
113. Xynos N, Abatis D, Argyropoulou A, Polychronopoulos P, Aligiannis N, Skaltsounis A-L.

- Development of a Sustainable Procedure for the Recovery of Hydroxytyrosol from Table Olive Processing Wastewater Using Adsorption Resin Technology and Centrifugal Partition Chromatography. *Planta Med.* 2015;81(17):1621-1627. doi:10.1055/s-0035-1558111
114. Nardi M, Bonacci S, De Luca G, et al. Biomimetic synthesis and antioxidant evaluation of 3,4-DHPEA-EDA [2-(3,4-hydroxyphenyl) ethyl (3S,4E)-4-formyl-3-(2-oxoethyl)hex-4-enoate]. *Food Chem.* 2014;162:89-93. doi:10.1016/j.foodchem.2014.04.015
115. Nair A, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J Basic Clin Pharm.* 2016;7(2):27. doi:10.4103/0976-0105.177703
116. Panel E, Nda A. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865), maintenance of normal blood HDL cholesterol concentrations (ID 1639), mainte. *EFSA J.* 2011;9(4):1-25. doi:10.2903/j.efsa.2011.2033
117. Steiner M, Volkheimer D, Meyers N, et al. Comparison between different methods for biomechanical assessment of ex vivo fracture callus stiffness in small animal bone healing studies. *PLoS One.* 2015;10(3):1-16. doi:10.1371/journal.pone.0119603
118. Kaye B. The Effects of Freezing on the Mechanical Properties of Bone. *Open Bone J.* 2012;4(1):14-19. doi:10.2174/1876525401204010014
119. Knopp-Sihota JA, Cummings GG, Homik J, Voaklander D. The association between serious upper gastrointestinal bleeding and incident bisphosphonate use: A population-based nested cohort study. *BMC Geriatr.* 2013;13(1):1-12. doi:10.1186/1471-2318-13-36
120. Fatoye F, Smith P, Gebrye T, Yeowell G. Real-world persistence and adherence with oral bisphosphonates for osteoporosis: A systematic review. *BMJ Open.* 2019;9(4):1-18. doi:10.1136/bmjopen-2018-027049
121. Passali C, Patsaki A, Lelovas P, et al. Red wine polyphenols modulate bone loss in the ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis. *J Hell Vet Med Soc.*

- 2019;70:1541. doi:10.12681/jhvms.20860
122. Patsaki A, Tchoumtchoua J, Passali C, et al. The Protective Effect of *Amphimas pterocarpoides* Plant Extract on Bone Mineral Density and Strength in Estrogen Deficient Ovariectomized Wistar Rats. *Med Aromat Plants*. 2016;5(5). doi:10.4172/2167-0412.1000269
123. Galanis D, Soultanis K, Lelovas P, et al. Protective effect of *Glycyrrhiza glabra* roots extract on bone mineral density of ovariectomized rats . *BioMedicine*. 2019;9(2):8. doi:10.1051/bmdcn/2019090208
124. Liu H, Huang H, Li B, et al. Olive oil in the prevention and treatment of osteoporosis after artificial menopause. *Clin Interv Aging*. December 2014:2087. doi:10.2147/CIA.S72006
125. Tantikanlayaporn D, Wichit P, Weerachayaphorn J, et al. Bone sparing effect of a novel phytoestrogen diarylheptanoid from *Curcuma comosa* Roxb. in ovariectomized rats. *PLoS One*. 2013;8(11):4-11. doi:10.1371/journal.pone.0078739
126. Song S hong, Zhai Y kun, Li C qin, et al. Effects of total flavonoids from *Drynariae Rhizoma* prevent bone loss in vivo and in vitro. *Bone Reports*. 2016;5:262-273. doi:10.1016/j.bonr.2016.09.001
127. Armamento-Villareal R, Sheikh S, Nawaz A, et al. A new selective estrogen receptor modulator, CHF 4227.01, preserves bone mass and microarchitecture in ovariectomized rats. In: *Journal of Bone and Mineral Research*. Vol 20. ; 2005:2178-2188. doi:10.1359/JBMR.050801
128. Puel C, Mardon J, Kati-Coulibaly S, et al. Black Lucques olives prevented bone loss caused by ovariectomy and talc granulomatosis in rats. *Br J Nutr*. 2007;97(5):1012-1020. doi:10.1017/S0007114507659030
129. Nurrochmad A, Leviana F, Wulancarsari CG, Lukitaningsih E. Phytoestrogens of *Pachyrhizus erosus* prevent bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *Int J Phytomedicine*. 2010;2(4):363-372. doi:10.5138/ijpm.2010.0975.0185.02051

130. Prodinge PM, Bürklein D, Foehr P, et al. Improving results in rat fracture models: Enhancing the efficacy of biomechanical testing by a modification of the experimental setup. *BMC Musculoskelet Disord*. 2018;19(1):1-8. doi:10.1186/s12891-018-2155-y
131. Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL. The Laboratory Rat. 2006:151.
132. Patsios SI, Papaioannou EH, Karabelas AJ. Long-term performance of a membrane bioreactor treating table olive processing wastewater. *J Chem Technol Biotechnol*. 2016;91(8):2253-2262. doi:10.1002/jctb.4811
133. Parinos CS, Stalikas CD, Giannopoulos TS, Pilidis GA. Chemical and physicochemical profile of wastewaters produced from the different stages of Spanish-style green olives processing. *J Hazard Mater*. 2007;145(1-2):339-343. doi:10.1016/j.jhazmat.2006.12.061
134. Katsoni A, Frontistis Z, Xekoukoulotakis NP, Diamadopoulou E, Mantzavinou D. Wet air oxidation of table olive processing wastewater: Determination of key operating parameters by factorial design. *Water Res*. 2008;42(14):3591-3600. doi:10.1016/j.watres.2008.05.007
135. Cheng M, Wang Q, Fan Y, et al. A traditional Chinese herbal preparation, Er-Zhi-Wan, prevent ovariectomy-induced osteoporosis in rats. *J Ethnopharmacol*. 2011;138(2):279-285. doi:10.1016/j.jep.2011.09.030